

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ELÁSTICOS E
ELÁSTICO-MAGNÉTICOS PARA ADMINISTRAÇÃO TRANSDÉRMICA DE
MOLÉCULAS BIOATIVAS.**

Raquel de Melo Barbosa

Autora

Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP.

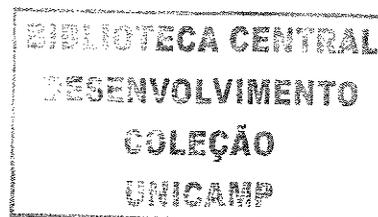
Prof.^a. Dr.^a. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Co-orientadora

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

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

Campinas, Junho de 2005



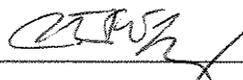
Tese de Mestrado defendida por Raquel de Melo Barbosa e aprovada em
06 de junho de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

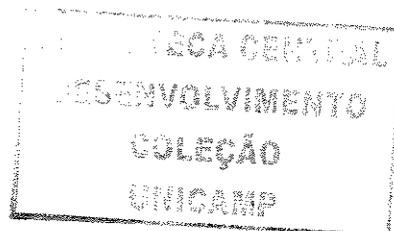


Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

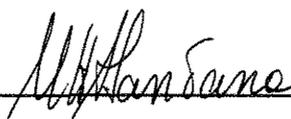


Profa. Dra. Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

588290079



Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Farmacêutica com habilitação em Indústria de Medicamentos, Raquel de Melo Barbosa, e aprovada pela comissão julgadora em Junho de 2005.



Orientadora: Prof.^ª. Dr.^ª. Maria Helena Andrade Santana

“Alem dos laços que se formam entre um pesquisador e seus contemporâneos, há sempre os que ligam àqueles que, antes deles, tiveram igual interesse pela ciência. Ele continua o caminho desbravado pelos seus antecessores... É como se olhasse para trás e se sentisse preso aos que antecederam, como se fizesse parte de uma família ligada não pelo sangue, mas pelos liames afetivos do mesmo ideal científico...(Cannon, W.B. The Way of an Investigator).”

Portanto, a todos aqueles que são responsáveis por minha formação científica, e também aos meus familiares e amigos que me apoiaram durante o decorrer desta caminhada dedico este trabalho; em especial ao meu pai, minha mãe e meu marido por exemplos de fortaleza, amor e humildade.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana, pelos momentos em que trabalhamos juntas, por sua orientação e dedicação.

À Prof^a Dr^a Maria Vitória pela sua co-orientação e colaboração necessária para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Donatila, por todo amor, confiança e grande incentivo durante a realização deste trabalho, e as minhas queridas irmãs Lára e Karine pela amizade e pelo exemplo marcante de companheirismo em minha vida.

Ao meu grande amor e marido Marcelo Fernandes, por seu carinho, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana por conceder a utilização de equipamentos de seu laboratório.

As Prof^{as} Dr^{as} Eneida de Paula e Shirley Schreier pela colaboração na execução dos espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

Ao Prof. Dr. Carlos Ramos por permitir a utilização do DSC no Laboratório Nacional Luz Sincrotron.

Aos professores de Pós-graduação em Engenharia Química, pela maneira competente e dedicada com que transmitiram seus conhecimentos ao longo do meu aprendizado nesta instituição.

Ao amigo Paulo Castilho por sua atenção, amizade e auxílio nas medidas de EPR.

A todos os colegas do curso, em especial a Elaine, Lucimara, Christiane, Classius, Tatiana, Reinaldo, Amós, Christine, Guiliana, Fernanda, Ana Paula, Vinícius, Ivanildo Jr. e Edler pela amizade e apoio nas horas difíceis. Ao Gilson Jr. por sua amizade e auxílio nos experimentos.

A todos aqueles que anônimos e despretensiosamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudos.

Meu agradecimento, acima de tudo a Deus.

Sumário

Lista de Quadros	xix
Lista de Tabelas	xxi
abreviaturas	xxii
Nomenclatura	xxv
RESUMO	xxix
Abstract	xxxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Anatomia, fisiologia e composição química da pele.	8
3.2 Administração transdérmica de fármacos	10
3.3 Transporte transdérmico	11
3.4 Veiculação de bioativos em sistemas particulados	20
3.4.1 Lipossomas	20
3.4.1.1. Lipossomas elásticos	23
3.4.1.1.1 Determinação do parâmetro de ordem da bicamada lipídica por Ressonância Paramagnética Eletrônica	31
3.4.1.1.2 Permeação de lipossomas através de membranas	36
3.4.2 Magnetolipossomas	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Materiais	39
4.2 Métodos	42
4.2.1 Preparação dos lipossomas convencionais e elásticos	42
4.2.2 Homogeneização do tamanho das vesículas	43
4.2.3 Caracterização dos lipossomas	44
4.2.3.1 Dosagem do teor total de fosfolipídios	44
4.2.3.2 Medida da tensão superficial e determinação da concentração micelar crítica	45

4.2.3.3	Curva de calibração na presença de lipossomas vazios	46
4.2.3.4	Determinação da concentração de tensoativos incorporada na bicamada lipídica	47
4.2.3.5	Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das vesículas	48
4.2.3.6	Calorimetria exploratória de varredura	49
4.2.3.7	Estabilidade dos lipossomas durante estocagem	50
4.2.3.8	Determinação dos espectros de RPE	50
4.2.3.9	Estimativa da elasticidade e deformação dos lipossomas	51
4.2.4	Síntese e estabilização da magnetita coloidal	54
4.2.5	Caracterização da magnetita coloidal	55
4.2.5.1	Dosagem do teor de Ferro	55
4.2.6	Preparação dos magnetolipossomas e dos lipossomas elástico-magnéticos	56
4.2.7	Homogeneização do tamanho das vesículas magnéticas	58
4.2.8	Caracterização dos lipossomas elástico-magnéticos	58
4.2.9	Separação dos fosfolipídios não-adsorvidos	58
4.2.10	Montagem e calibração do sistema magnético de permeação.	59
4.2.11	Ensaio de permeação de lipossomas magnéticos utilizando o sistema magnético.	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Preparação dos lipossomas	63
5.2	Caracterização dos lipossomas com incorporação do PEG8L durante preparação das vesículas	63
5.2.1	Diâmetro médio e distribuição de tamanhos	63
5.2.2	Determinação da percentagem incorporada de tensoativos na membrana lipídica	66
5.2.2.1	Determinação da CMC dos tensoativos em presença de lipossomas	66
5.2.2.2	Percentagem incorporada de tensoativo	67
5.2.3	Análises da temperatura de transição de fases e entalpia	71
5.2.4	Estabilidade física dos lipossomas	73
5.2.5	Fluxos e elasticidade dos lipossomas	77
5.3	Caracterização dos lipossomas com incorporação do PEG8L em lipossomas pré-formados	84

5.3.1 Cinética de incorporação do tensoativo PEG8L em lipossomas de DMPC	84
5.3.1.1 Diâmetro principal e polidispersidade	84
5.3.1.2 Percentagem incorporada de tensoativo	85
5.3.1.3 Parâmetro de ordem	88
5.3.1.4 Fluxos e elasticidade dos lipossomas	91
5.3.2 Cinética de incorporação do tensoativo PEG8L em lipossomas de lecitina de ovo	93
5.3.2.1 Diâmetro médio e polidispersidade	94
5.3.2.2 Percentagem incorporada de tensoativo e absorbância	95
5.3.3 Permeação de lipossomas através de membranas	96
5.3.3.1 Fluxo	96
5.3.3.2 Elasticidade	98
5.3.4 Ensaio <i>in vitro</i> com célula de Franz modificada	102
5.4 Preparação e caracterização dos magnetolipossomas	103
5.4.1 Influência da amplitude e tempo de sonicação no diâmetro e incorporação da magnetita	104
5.4.2 Caracterização dos magnetolipossomas com incorporação do PEG8L das vesículas.	106
5.4.2.1 Diâmetro médio, polidispersidade, percentagem incorporada de tensoativos e absorbância.	106
5.4.3 Ensaio de permeação dos magnetolipossomas e lipossomas elástico-magnéticos	108
5.4.3.1 Ensaio de permeação na ausência de campo magnético	108
5.4.3.2 Ensaio de permeação sob ação do campo magnético	109
6. Conclusões	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8. Sugestões para trabalhos futuros	125
ANEXOS	127
Anexo I	127
Anexo II	135
Anexo III	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele, apêndices cutâneos e sistema vascular.....	10
Figura 2: Representação esquemática do estrato córneo, ilustrando duas possíveis vias para difusão.....	14
Figura 3: Métodos utilizados para facilitar o transporte transdérmico de fármacos.....	17
Figura 4: Estrutura típica de lipossomas.....	21
Figura 5: Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina.....	21
Figura 6: Representação esquemática da transição de fases dos lipídios.....	22
Figura 7: Representação esquemática do movimento dos lipossomas elásticos.....	24
Figura 8: Perfil de Lipossomas convencionais (DSPC:DMPE:COL, 33:20:47,1mM) sonificados em função da concentração de tensoativo C ₁₂ E ₅	30
Figura 9: Modelo do processo contínuo de relaxamento de lipossomas.....	31
Figura 10: Molécula de marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL).....	33
Figura 11: Espectro de RPE do marcador 5-SASL em membrana eritrocitária.....	34
Figura 12: Representação esquemática do tensoativo PEG8L.....	40
Figura 13: Representação esquemática do tensoativo PEG8DL.....	40
Figura 14: Representação esquemática do tensoativo PEG4L.....	40
Figura 15: Representação esquemática do tensoativo PEG4DL.....	40
Figura 16: Representação esquemática das etapas da medida da tensão superficial utilizando o método da placa.....	46
Figura 17: Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho das vesículas por espalhamento de luz.....	49
Figura 18: Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz modificada.....	53
Figura 19: Representação esquemática da síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico.....	55
Figura 20: Fórmula estrutural do complexo vermelho (Cateato sulfonado de sódio) formado pela reação do ferro III com o Tiron.....	56
Figura 21: Representação esquemática do sistema de magnetoforese.....	59
Figura 22: Sistema de permeação em membranas acoplado a um campo	

magnético.....	60
Figura 23: Percentagem de incorporação dos tensoativos na membrana lipídica dos lipossomas logo após a preparação.....	68
Figura 24: Percentagem de incorporação dos PEGs na membrana lipídica dos lipossomas logo após a preparação.....	69
Figura 25: Percentagem de incorporação de tensoativos na bicamada lipídica durante a estocagem dos lipossomas elásticos.....	70
Figura 26: Percentagem de incorporação do tensoativo PEG8L (com diferentes concentrações iniciais: 20, 40 e 70Mol%) na bicamada lipídica durante a estocagem dos lipossomas elásticos.....	70
Figura 27: Espectros de calorimetria exploratória de varredura para lipossomas contendo DMPC:Tensoativo.....	72
Figura 28: Perfis de estabilidade dos lipossomas convencionais (DMPC 100Mol%) e elásticos (DMPC:Tensoativo, 60:40) durante treze dias de estocagem..	75
Figura 29: Estabilidade durante a estocagem dos lipossomas convencionais (DMPC 100Mol%) e elásticos (DMPC:PEG8L, 60:40), determinados pela variação dos seus diâmetros.....	76
Figura 30: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC e C ₁₂ E ₅	81
Figura 31: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC:PEG (60:40).....	82
Figura 32: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC:PEG8L com diferentes proporções molares.....	83
Figura 33: Cinética de incorporação de PEG8L em lipossomas convencionais compostos de DMPC avaliada através das variações no diâmetro médio e polidispersidade.....	86
Figura 34: Cinética de incorporação de PEG8L em lipossomas convencionais compostos de DMPC avaliada através das percentagens de PEG8L incorporada e por espalhamento de luz (340nm) em função do tempo.....	87
Figura 35: Espectro de RPE do 5-SASL.....	89
Figura 36: Espectro de RPE do 5-SASL em membranas de lipossomas (DMPC) sem e com PEG8L em função do tempo de incubação.....	90

Figura 37: Fluxo e elasticidade dos lipossomas preparados por diferentes métodos	93
Figura 38: Cinética de incorporação do PEG8L em lipossomas convencionais compostos por lecitina de ovo através de medidas de diâmetro médio e polidispersidade.....	94
Figura 39: Cinética de incorporação do PEG8L em lipossomas convencionais compostos de lecitina de ovo através de medidas por espalhamento de luz (340nm) e percentagem de incorporação de tensoativo.....	95
Figura 40: Fluxo de lipossomas convencionais compostos por fosfatidilcolina de ovo utilizando duas membranas com poros nominais de 30nm em função da pressão.....	97
Figura 41: Fluxo de lipossomas elásticos compostos por fosfatidilcolina de ovo utilizando 2 membranas com poros nominais de 30nm em função da pressão.....	97
Figura 42: Elasticidade dos lipossomas convencionais em função da concentração de fosfolipídios e da pressão aplicada.....	99
Figura 43: Elasticidade dos lipossomas contendo PEG8L em função da concentração de fosfolipídios e da pressão aplicada	99
Figura 44: Diâmetro principal dos lipossomas convencionais em função da concentração de fosfolipídio e da pressão.....	100
Figura 45: Diâmetro principal dos lipossomas elásticos em função da concentração de fosfolipídio e da pressão.....	101
Figura 46: Concentração de fosfolipídios após ensaio de elasticidade para os lipossomas convencionais e elásticos em função da concentração de lipídios e da pressão.....	102
Figura 47: Influência da amplitude e do tempo de sonicação no diâmetro e distribuição populacional dos magnetolipossomas.....	105
Figura 48: Influência da amplitude e do tempo de sonicação no diâmetro e na relação da concentração de lipídio/g de ferro.....	106
Figura 49: Cinética de incorporação do 40Mol% de PEG8L magnetolipossomas compostos por dimiristoilfosfatidilcolina (60Mol% de DMPC) através de medidas de espalhamento de luz (340nm), percentagem de incorporação de tensoativo, diâmetro médio e distribuição de tamanhos (polidispersidade).....	107

Figura 50: Portas-amostra após cerca de 2,5 minutos no sistema de permeação acoplado a um campo magnético.....	110
Figura 51: Curva de calibração da análise do fosfolipídio.	127
Figura 52: CMC para o tensoativo C ₁₂ E ₅ em tampão HEPES.....	128
Figura 53: CMC para o tensoativo C ₁₂ E ₅ presença de 1mM de lipossomas convencionais.....	129
Figura 54: CMC para o tensoativo PEG4L presença de 1mM de lipossomas convencionais.....	130
Figura 55: CMC para o tensoativo PEG8L presença de 1mM de lipossomas convencionais.....	131
Figura 56: CMC para o tensoativo PEG4DL presença de 1mM de lipossomas convencionais.....	132
Figura 57: CMC para o tensoativo PEG8DL presença de 1mM de lipossomas convencional.....	133
Figura 58: Curva de calibração da análise de ferro.	134
Figura 59: Distribuição de tamanho de lipossomas unilamelares convencionais.	135
Figura 60: Distribuição de tamanho de lipossomas unilamelares elásticos.	136
Figura 61: Distribuição de tamanho de magnetolipossomas antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de 50nm.....	137
Figura 62: Distribuição de tamanho de lipossomas elásticos magnéticos antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de 50nm. .	138
Figura 63: Distribuição de tamanho de lipossomas elásticos magnéticos durante o processo de incubação com tensoativo.....	139
Figura 64: Curva de calibração da intensidade de campo magnético com a corrente elétrica.....	140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Funções desempenhadas pelo tecido cutâneo.....	8
Quadro 2: Semelhanças e diferenças da administração de fármacos pelas vias oral e transdérmica usando sistemas de liberação controlada.	12
Quadro 3: Densidade e tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele.....	15
Quadro 4: Condições empregadas para realização de experimentos utilizando membranas com poros irregulares em célula de Franz modificada.....	54
Quadro 5: Condições empregadas para realização de experimentos utilizando membranas de policarbonato e pele animal em sistema permeação com campo magnético.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composições dos lipossomas preparados pelo método de hidratação de filme seco de lipídios.	43
Tabela 2: Composições dos Magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de filme seco de lipídios.	57
Tabela 3: Diâmetro médio, percentagem populacional e polidispersidade de lipossomas convencionais (Epk e DMPC 100%) e elásticos (com lipídio e tensoativo).	64
Tabela 4: Diâmetro médio, percentagem populacional e polidispersidade das amostras contendo PEG8L em diferentes concentrações molares.	66
Tabela 5: Concentração micelar crítica para os tensoativos em presença de lipossomas convencionais (1mM).	67
Tabela 6: Temperatura de transição de fases (T_m) e entalpias (ΔH) para as lipossomas contendo DMPC e diferentes tensoativos.	74
Tabela 7: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com $C_{12}E_5$	78
Tabela 8: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes PEGs.	79
Tabela 9: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes proporções molares de PEG8L.	80
Tabela 10: Parâmetros de Ordem (S) medidos com o marcador de spin 5-SASL incorporados em lipossomas e micelas do PEG8L.	91
Tabela 11: Diâmetros médios, fluxos, elasticidade e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes proporções molares de PEG8L.	92
Tabela 12: Concentração de ferro e fosfolipídio após a preparação dos magnetolipossomas com sua posterior separação em sistema de magnetoforese.	104
Tabela 14: Diâmetro médio antes e depois do ensaio de permeação, fluxo e percentagem de fosfato permeado para magnetolipossomas e lipossomas elástico-magnéticos.	109

ABREVIATURAS

Abs: absorvância

CMC: concentraçãõ micelar crítica

C_xE_y: tensoativos não iônicos do tipo polioxietileno

C₁₂E₅: polioxielileno 5 lauril éter

COL: colesterol

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DSC: calorimetria exploratória de varredura

DSPC: distearoilfosfatidilcolina

Epk: epikuron 200SH (fosfatidilcolina hidrogenada de soja)

Fe₃O₄: magnetita

HEPES: N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]

LUV's: lipossomas unilamelares grandes

MAG: magnetoforese de alto gradiente

MLV's: lipossomas multilamelares

PC: fosfatidilcolina

PEGs: tensoativos não iônicos do tipo polietilenoglicol

PEG4L: polietilenoglicol 4 lauril ester

PEG8L: polietilenoglicol 8 lauril ester

PEG4DL: polietilenoglicol 4 dilauril ester

PEG8DL: polietilenoglicol 8 dilauril ester

POPC: palmitoiloleilfosfatidilcolina

QLS: espalhamento de luz laser

RPE: ressonância paramagnética eletrônica

SUV's: lipossomas unilamelares pequenos

TIRON: 1,3-ácido benzenossulfônico-4,5-dihidroxi

5-SASL: 5-doxil esteárico

NOMENCLATURA

T_m : temperatura de transição de fases

ΔH : variação de entalpia

σ : tensão superficial

P_w : força

L_b : molhabilidade do líquido

C_i : concentração molar de tensoativo incorporada na bicamada

C_t : concentração molar total de tensoativo

C_e : concentração molar de tensoativo na solução

C_i^* : quantidade de tensoativo incorporada na bicamada

K : constante de Boltzmann

T : temperatura absoluta

η : viscosidade da solução dispersante

J : fluxo da dispersão coloidal

V_f : volume permeado

T : tempo

d_p : diâmetro do poro da membrana de policarbonato

d_v : diâmetro médio antes da permeação

D_L : deformação

E : módulo de elasticidade das vesículas

C_o : concentração inicial do fármaco no veículo

K : coeficiente de partição do soluto entre a membrana e a solução

D : coeficiente de difusão

ε : espessura da membrana.

A_{poros} : área total ocupada pelos poros na membrana

$\sigma_v(r_v)$: coeficiente de refratividade da membrana ao agregado

α : constante dependente do tipo de vesículas com valor próximo de 1

β : constante dependente do tipo de membrana com valor próximo de 1

δ : função que leva em consideração a influência das composições

\bar{C} : concentração média de vesículas

P_w : permeabilidade da membrana à água

$P_{a,i}$: permeabilidade da membrana ao agregado

$\Delta\Pi_i$: gradiente de pressão osmótica causada por espécies independentes da vesícula permeante

d_i : tamanho relativo entre a saída e a entrada do poro da membrana

N_A : número de Avogadro

h : constante de Planck;

$G_{\text{deform}}^{\#}$: energia livre de deformação do agregado

k_c : módulo de energia elástica da membrana

γ_{ruptura} : tensão de ruptura da bicamada

\bar{A}_a : área média dos agregados

$K_{a,\text{eff}}$: módulo de compressibilidade lateral da bicamada

ν : frequência da radiação incidente

g : fator característico do elétron

β : magneton de Bohr

H : campo magnético externo

A_{\parallel} : desdobramento hiperfino referente à orientação do eixo longo molecular do marcador paralelo ao campo magnético externo

A_{\perp} : desdobramento hiperfino referente a orientação do eixo longo molecular do marcador perpendicular ao campo magnético externo

h_{+1} : alturas dos picos de campo baixo

h_0 : alturas dos picos de campo médio

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a preparação e caracterização de lipossomas elásticos e elástico-magnéticos projetados para facilitar o transporte transdérmico de moléculas bioativas. Os lipossomas preparados foram do tipo unilamelar, compostos de dimiristoilfosfatidilcolina sintética (DMPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada ou fosfatidilcolina de ovo (PCovo) como componentes estruturais e dos tensoativos derivados do ácido láurico: C₁₂E₅ (polioxietileno-5-lauril éter), PEG4L (polioxietilenoglicol-4-lauril ester), PEG4DL (polioxietilenoglicol-4-dilauril ester), PEG8L (polioxietilenoglicol-8-lauril ester) e PEG8DL (polioxietilenoglicol-8-dilauril ester), como componentes elásticos. As propriedades magnéticas foram adicionadas aos lipossomas através da incorporação da magnetita coloidal. A incorporação dos tensoativos nos lipossomas foi feita por dois procedimentos: durante a hidratação do filme lipídico ou por incubação com lipossomas pré-formados. Os lipossomas elásticos foram caracterizados através da quantificação do teor de fosfolipídios, diâmetro médio e distribuição de tamanhos, incorporação dos tensoativos, capacidade de permeação em membranas artificiais com poros de 50 e 30nm, elasticidade e estabilidade física de estocagem. Nos lipossomas elástico-magnéticos foi também caracterizada a incorporação da magnetita coloidal. Os resultados experimentais mostraram que a temperatura de transição de fases do fosfolipídio, a fluidez da bicamada lipídica produzida pela incorporação do tensoativo e a preservação da integridade da partícula foram fatores que determinaram o desempenho dos lipossomas elásticos na permeação através de membranas nanoporosas. Nesse contexto, os fosfolipídios DMPC e fosfatidilcolina de ovo e os tensoativos PEG8L e PEG8DL foram os constituintes que apresentaram melhor desempenho. O escoamento através de membranas dos lipossomas elásticos compostos de PCovo e PEG8L obedeceu à lei de Darcy e apresentou características semelhantes às da água. Esses resultados demonstram a potencialidade dos lipossomas elásticos para a administração transdérmica de compostos bioativos.

Palavras chave: lipossomas, tensoativos, aplicações transdérmicas.

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the preparation and characterization of elastic and elastic-magnetic liposomes designed to facilitate the transdermal transport of drugs. The prepared liposomes were unilamellar, composed by synthetic dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), hydrogenated soy phosphatidylcholine or egg phosphatidylcholine (PCegg) as structural components and by the derivative lauric acid surfactants: C₁₂E₅ (polyoxyethylene-5-lauryl ether), PEG4L (polyethyleneglycol-4-lauryl ester), PEG4DL (polyethylenoglycol-4-dilauryl ester), PEG8L (polyethyleneglycol-8-lauryl ester) e PEG8DL polyethyleneglycol-8-dilauryl ester) as elastic components. Magnetic properties were added to elastic liposomes by incorporation of colloidal magnetite. The incorporation of surfactants to liposomes was done by two procedures: during hydration of lipid film or by incubation with preformed liposomes. The elastic liposomes were characterized through their phospholipid contents, mean diameter and size distribution, incorporation of surfactants, capability for permeation through artificial membranes containing 50 or 30 nm porous, elasticity and storage stability. The incorporation of colloidal magnetite was also characterized in elastic-magnetic liposomes. The experimental results show that the phospholipid phase transition temperature, the fluidity of the lipid bilayer generated by surfactant incorporation and the preservation of particle integrity were factors determining the performance of elastic liposomes on permeation through nanoporous membranes. In this context, DMPC and PCegg phospholipids and the surfactants PEG8L and PEG8DL were the best compounds. The flowing through membranes of elastic liposomes composed by PCegg and PEG8L obeyed the Darcy law with similar characteristics compared to water. These results demonstrate the potentiality of elastic liposomes for transdermal administration of drugs.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a administração de fármacos através de rotas não invasivas, como as vias oral, pulmonar e transdérmica têm se destacado pela facilidade de aplicação e por proporcionar conforto ao paciente. Particularmente, a via transdérmica tem sido bastante estudada e, recentemente, considerada uma das vias mais inovadoras para administração de fármacos.

As vantagens da administração de fármacos pela rota transdérmica em relação às demais são: atividade metabólica reduzida quando comparada ao trato gastrointestinal e fígado (efeito de primeira passagem) (Bouwstra *et al.*, 2003) e a comodidade de aplicação pelo paciente. No entanto, o grande problema da utilização desta via é imposta pela limitação da pele à entrada e saída de substâncias no organismo, visto que funciona, principalmente, como um órgão protetor.

Várias estratégias físicas e químicas têm sido empregadas para melhorar o transporte de fármacos através da pele, como a utilização dos métodos de sonoforese (Mitragotri *et al.*, 2000 e Merino *et al.*, 2003), iontoforese (Li *et al.*, 2002), eletroporação (Prausnitz, 1999), magnetoforese (Murthy e Hiremath, 2001), uso de promotores de absorção cutânea tais como tensoativos (Monti *et al.*, 2001 e Karande *et al.* 2004), lipossomas (Cecv *et al.*, 1998 e Bouwstra *et al.*, 1999) e mais recentemente o uso de domínios peptídicos de transdução (PTD), peptídeos catiônicos capazes de penetrar através de membranas celulares carregando macromoléculas (Schwarze *et al.*, 1999).

Dentre os vários tipos de lipossomas, somente os elásticos, compostos de fosfolipídios e tensoativos, apresentam alta fluidez e elasticidade, que os tornam capazes de atravessar poros virtuais entre os corneócitos sob a influência do gradiente de água transepidermal, sendo possível o transporte de fármacos até as camadas mais profundas da pele.

A característica de elasticidade dos lipossomas é produzida pela utilização de fosfolipídios de baixa transição de fases, que se encontrem no estado líquido-

cristalino à temperatura ambiente (25°C), juntamente com tensoativos cuja função é aumentar a fluidez da bicamada lipídica. Lipossomas ultradeformáveis, chamados de transferssomas, contendo o tensoativo colato de sódio, foram desenvolvidos por Cevc *et al.* (1991, 1995 e 1997). A utilização de tensoativos não iônicos de cadeia simples foi introduzida por Bouwstra *et al.* (1999) e Van den Bergh *et al.* (1998, 1999, 2001), com os ésteres de sacarose derivados dos ácidos esteárico e palmítico, uma mistura de mono, di e tri-ésteres derivados do ácido láurico ou o éster de polioxietileno também derivado do ácido láurico, PEG8L.

O uso de lipossomas elásticos associados com ferrofluidos, lipossomas elástico-magnéticos, pode combinar as propriedades de fluidez da bicamada lipídica e captura magnética pela presença do ferrofluido, devendo assim promover mais eficientemente o transporte transdérmico de fármacos.

A abordagem do transporte transdérmico usando lipossomas elástico-magnéticos é inovadora, uma vez que até então, o campo magnético tem sido usado somente para a permeação de fármacos na forma livre em um processo chamado de magnetoforese (Murthy e Hiremath, 2001).

As propriedades magnéticas conferidas aos lipossomas intensificaram aplicações importantes em processos biotecnológicos. Pode-se citar a imobilização de enzimas em membranas e utilização em processos contínuos (De Cuyper e Joniau, 1990 e 1993), estudo de membranas biológicas (De Cuyper e Joniau, 1992, De Cuyper *et al.*, 2004), e adsorção de anticorpos (Zollner *et al.*, 2003, Rocha *et al.* 2001).

Dentro deste contexto, a aplicação de lipossomas elásticos e elástico-magnéticos no transporte de fármacos por via transdérmica é promissora, uma vez que combinam vantagens desta via para administração de fármacos, com a potencialidade das vesículas elásticas e elástico-magnéticas para transpor as barreiras da pele. As propriedades elásticas desses lipossomas também são promissoras para aplicações na área de cosméticos.

As características citadas motivaram a realização deste trabalho, o qual compreende inicialmente o estudo da preparação e caracterização das

propriedades físico-químicas dos lipossomas elásticos, seguida da preparação dos lipossomas elástico-magnéticos na melhor condição anteriormente obtida.

Neste trabalho, a elasticidade nos lipossomas foi produzida pela associação do fosfolípido estrutural de baixa temperatura de transição de fases, dimiristoilfosfatidilcolina sintético (DMPC) com os tensoativos derivados do ácido láurico nas formas de: éter, $C_{12}E_5$, de ésteres de cadeia simples, PEG4L e PEG8L, e de cadeia dupla, PEG4DL e PEG8DL, como componentes elásticos. Lipossomas de lecitina de soja hidrogenada (média temperatura de transição de fases) contendo os tensoativos $C_{12}E_5$ e PEG8L foram usados para comparação. Lecitina de ovo foi usada na melhor condição obtida, para o estudo do comportamento de escoamento em membranas de policarbonato. A incorporação do tensoativo PEG8L nos lipossomas foi estudada por dois métodos: adição durante a hidratação do filme seco de lipídio para a formação dos lipossomas e incorporação aos lipossomas pré-formados.

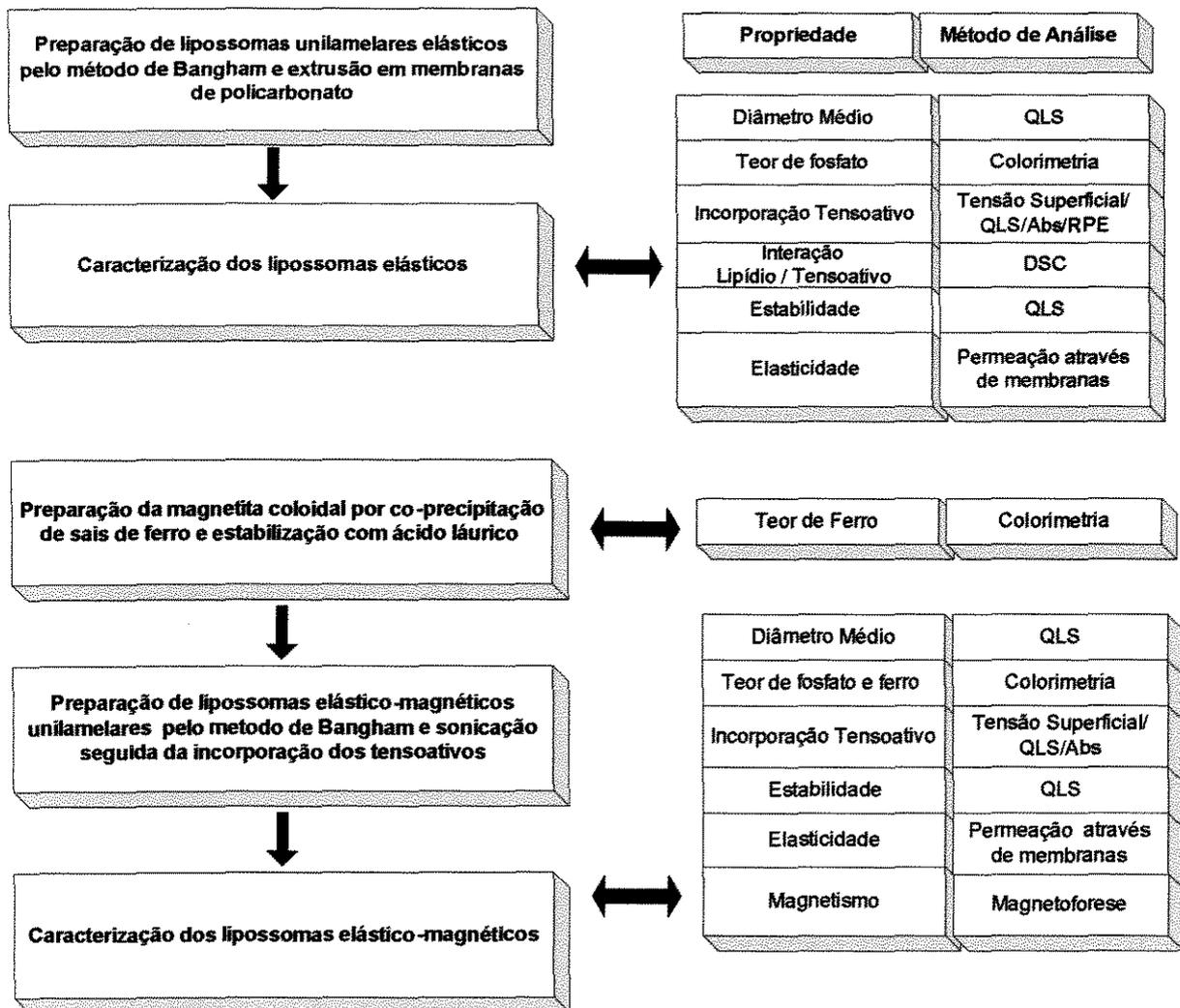
As propriedades magnéticas foram adicionadas aos lipossomas elásticos pela incorporação da magnetita coloidal como ferrofluido.

Os lipossomas foram caracterizados através da sua composição, propriedades físicas, de elasticidade e estabilidade durante estocagem. Os resultados obtidos foram analisados em termos de potencialidades destes lipossomas para o transporte transdérmico de moléculas bioativas.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da preparação e caracterização de lipossomas elásticos e elástico-magnéticos e a análise da sua potencialidade como veículo facilitador do transporte transdérmico de moléculas bioativas.

O desenvolvimento do trabalho foi feito nas seguintes etapas:

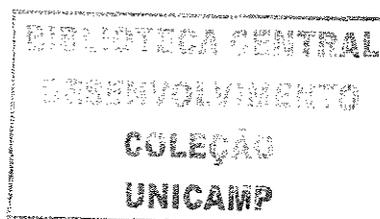


3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pele que recobre a superfície do corpo é constituída por uma porção epitelial, epiderme, e uma porção conjuntiva, a derme. Considerada o órgão mais pesado do corpo humano, a pele juntamente com seus anexos, são responsáveis por cerca de 16% do peso corporal e com espessura de apenas alguns milímetros (cerca de 3mm) apresenta múltiplas funções (Quadro 1), entre as quais a de atuar como interface entre o meio interno e o meio ambiente protegendo o organismo contra a perda de água, atrito e infecções (Junqueira e Carneiro, 1995, Redelmeier e Kitson, 1999).

Este tecido é dotado de elevada resistência e flexibilidade, apresentando baixa permeabilidade e notável possibilidade, em circunstâncias normais, de auto-regeneração. Além disso, possui extraordinária capacidade sensorial e imunológica, desempenhando funções relevantes na conservação da homeostasia (concentração adequada de substâncias químicas) ao assegurar a regulação hemodinâmica (pressão) e a termorregulação corporal.

Como a pele é o tecido mais acessível, freqüentemente é exposta a abrasões, radiações, solventes, detergentes, resíduos químicos, poluentes e produtos potencialmente tóxicos e alergênicos produzidos por fungos, leveduras, bactérias e plantas. Produtos cosméticos e farmacêuticos de uso tópico ou transdérmico podem conter substâncias químicas que aumentam o risco de dermatite de contato, a qual pode ser ocasionada por irritação ou alergia. Desta forma, para que possamos controlar as propriedades biofarmacêuticas das formulações dermatológicas é fundamental o conhecimento das características anatômicas, fisiológicas e químicas da pele (Ramachandran e Fleisher, 2000).



Quadro 1: Funções desempenhadas pelo tecido cutâneo (Costa *et al.*, 1993, Guyton, 1988, Vilela, 2005).

Funções da Pele	
<p>1. Invólucro dos tecidos e fluidos corporais,</p> <p>2. Proteção do meio externo (função de barreira),</p> <p> 2.1. Barreira microbiana</p> <p> 2.2. Barreira química</p> <p> 2.3. Barreira contra radiações</p> <p> 2.4. Barreira térmica</p> <p> 2.5. Barreira elétrica</p> <p>3. Recepção dos estímulos externos,</p>	<p>3.1. Táctil (pressão)</p> <p>3.2. Dor</p> <p>3.3. Térmica</p> <p>4. Conservação da homeostase,</p> <p> 4.1. Síntese e metabolismo</p> <p> 4.2. Regulação hemodinâmica</p> <p> 4.3. Regulação térmica</p> <p>5. Excreções glandulares,</p> <p>6. Secreções apócrinas.</p>

3.1. Anatomia, fisiologia e composição química da pele.

A pele é composta por várias camadas anatomicamente distintas, mas mutuamente dependentes: a epiderme, estratificada e avascular, a derme e o tecido subcutâneo (hipoderme) (Guyton, 1988, Junqueira e Carneiro, 1995).

A epiderme é a camada mais externa da pele com espessura variável de acordo com a região do corpo (0,04 a 0,20mm) sendo mais espessa nos locais de maior atrito e capaz de se regenerar em condições normais. Apresenta-se estratificada formando as camadas basal, responsável pela constante renovação celular, germinativa, que oferece resistência ao atrito, granulosa, capaz de secretar substâncias fosfolipídicas associadas a glicosaminoglicanos, e o estrato córneo que é uma membrana de espessura variável, resistente e que, quase sempre, representa a principal resistência à difusão, sendo considerada o passo limitante no processo da absorção percutânea (Junqueira e Carneiro, 1995).

Uma visão mais sofisticada do estrato córneo foi sugerida mostrando os queratinócitos, células compostas principalmente por queratina, circundados por domínios lipídicos multilamelares e tridimensionais. As células do estrato córneo (estágio final de diferenciação celular), os corneócitos, não possuem núcleos e organelas citoplasmáticas. Evidências também demonstram que o colesterol e lipídios de cadeias longas saturadas, como ácidos graxos livres e ceramidas predominam no estrato córneo e, juntos, são capazes de diminuir a permeabilidade dessa camada (Golden *et al.*, 1987, Marjukka Suhonen *et al.*, 1999, Bouwstra *et al.* 2003). Micrografias eletrônicas de varredura revelaram que o empacotamento dos corneócitos favorece a coesão adequada e a elasticidade do estrato córneo (Redelmeier e Kitson, 1999). Esta camada caracteriza-se por ser levemente permeável à água, cerca de 1000 vezes menos que outras membranas biológicas e mais higroscópica se comparada com outros materiais queratinosos, como cabelo e unhas (Marjukka Suhonen *et al.*, 1999).

Um filme ácido composto por lipídios emulsificados (material sebáceo) que cobre a superfície do estrato córneo apresenta pH em torno de 4,8 a 6,0 dependendo da área avaliada (Ramachandran e Fleisher, 2000).

A função essencial dos lipídios (matriz lipídica) do estrato córneo sobre a baixa permeabilidade da pele foi demonstrada através do aumento na perda de água transepidermal e maximização da permeação de substâncias na pele quando os lipídios foram extraídos com solventes (Marjukka Suhonen *et al.*, 1999).

O limite entre a derme e a epiderme não é regular, mas caracteriza-se pela presença de saliências e reentrâncias das duas camadas que se ajustam entre si através das papilas dérmicas. Na pele observam-se várias estruturas anexas (pêlos, unhas, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) que representam aproximadamente 0,1% da sua superfície total (Junqueira e Carneiro, 1995).

A derme, localizada abaixo da epiderme, apresenta-se como camada mais espessa que a epiderme (de 10 a 20 vezes) e gelificada, envolvendo matrizes de proteínas fibrosas (colágeno, elastina, reticulina, entre outras). Esta camada sustenta e interage com a epiderme facilitando o perfeito ajuste aos músculos e ossos. Vasos sanguíneos, linfáticos e nervos são encontrados na derme, e as

fibras nervosas só alcançam a região germinativa da epiderme através da derme (Guyton, 1988). A Figura 1 ilustra, de modo esquemático, a pele humana com suas camadas e estruturas anexas.

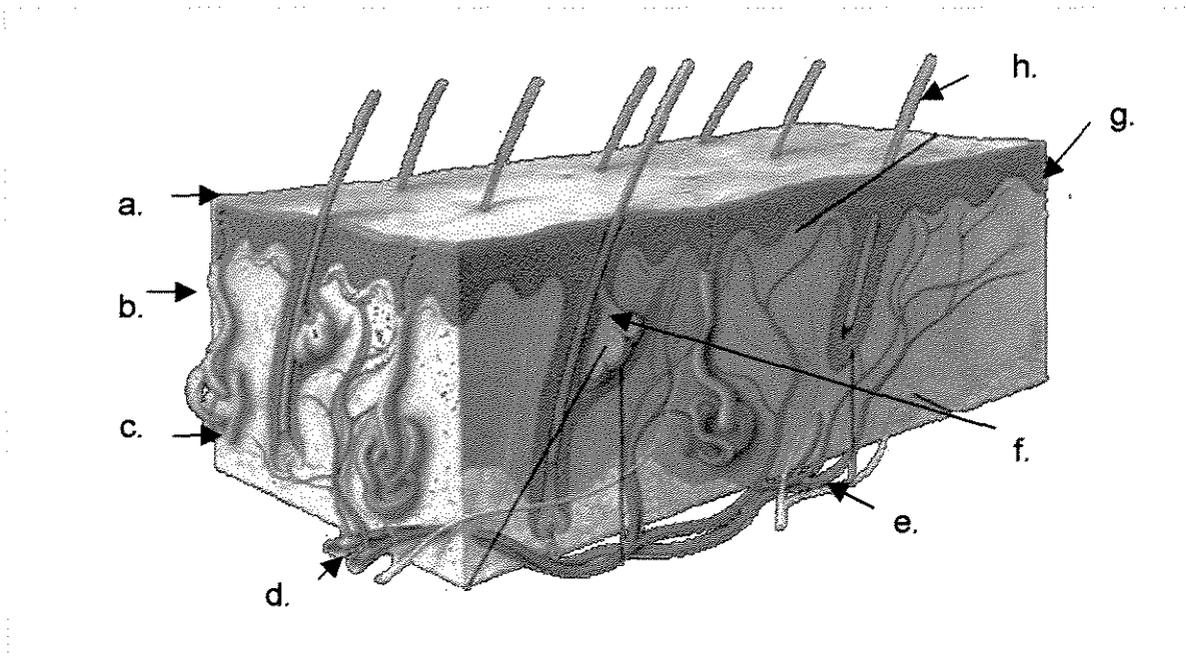


Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele, apêndices cutâneos e sistema vascular. a. Epiderme, b. derme, c. tecido subcutâneo, d. vasos sanguíneos e. nervos, f. glândulas sebáceas, g. papilas dérmicas, h. pêlo (adaptado de American Osteopathic College of Dermatology, 2005).

3.2 Administração transdérmica de fármacos

A via transdérmica tem sido considerada a mais inovadora e promissora no campo das pesquisas em liberação controlada de fármacos. Embora ainda com poucos produtos (somente 10 fármacos, aproximadamente), o mercado mundial de “patches”, adesivos usados na administração de fármacos por via transdérmica, aproxima-se atualmente de 3 bilhões de libras. Por outro lado, a pele é também usada para a aplicação de cosméticos para os quais o mercado

mundial é também expressivo. Em 2001, somente os Estados Unidos apresentaram 51 produtos farmacêuticos transdérmicos ou dérmicos em avaliação clínica e outros 129 possíveis, sendo que 33% destes encontravam-se, na época, em avaliação pré-clínica (Barry, 2001). Dados estatísticos revelam um crescente número de depósitos de patentes nesta área. Países como o Japão, Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido e França, por exemplo, em 2000, depositaram 38, 33, 12, 6 e 5 patentes, respectivamente (Kydonieus, 2002).

O primeiro produto transdérmico a entrar no mercado foi “Transderm Scop” desenvolvido por Alza Corporation em 1979. Este sistema consiste na associação da escopolamina a um material adesivo (“patch”), sendo seu uso indicado para prevenir náuseas e vômitos. A sua ação foi semelhante à aplicação intramuscular sendo, também, verificada a redução dos seus efeitos colaterais (Aungst, 1991 e Prausnitz *et al.*, 2004).

As vantagens da administração de fármacos utilizando a via transdérmica quando comparada com a via oral são a liberação do fármaco durante vários dias, recorrendo apenas a uma administração e menor atividade metabólica do trato gastrointestinal e hepática (efeito de primeira passagem). O Quadro 2 compara as vias oral e transdérmica quando o objetivo é a liberação controlada de fármacos (Costa *et al.*, 1993; Benet *et al.*, 1996, US pharmacist, 2005).

3.3 Transporte transdérmico

A principal dificuldade de utilização da via transdérmica para administração de fármacos é a baixa permeabilidade da pele humana. Substâncias com massa molar acima de 600 Daltons possuem menor capacidade de penetrar pela pele. Cevc e Blume (1992) verificaram que pequenas moléculas, tais como fluoracil não excederam a fração de 1%/hora por cm² ao penetrarem na pele intacta. Portanto há necessidade de fármacos com características físico-químicas adequadas e com alta potencia terapêutica.

Quando uma molécula livre ou veiculada se move através da pele intacta,

inicialmente ocorre o contato com o sebo, restos celulares, bactérias e outros materiais exógenos que cobrem a pele.

Quadro 2: Semelhanças e diferenças da administração de fármacos pelas vias oral e transdérmica usando sistemas de liberação controlada (Costa *et al.*, 1993; Benet *et al.*, 1996, US pharmacist, 2005).

Via transdérmica	Via oral
Liberação controlada contínua	Liberação controlada usando sub-unidades
Liberação do fármaco em 5-7 dias	Maioria dos fármacos com liberação em 24 horas
Níveis plasmáticos estabilizados durante o período especificado	Níveis plasmáticos estabilizados durante o período especificado
Não interage com alimentos	Interação com alimentos
Administração de pequenas doses	Administração de doses pequenas e grandes
Visibilidade do sistema durante a administração	Administração imperceptível para terceiros
Administração em casos de indisposição gástrica	Impedimento no caso de indisposição gástrica
Pequena área de absorção. Irritação local	Grande área de absorção
Anulação de efeito de primeira passagem	Efeito de primeira passagem
Aceitação duvidosa desta via	Via bem aceita
Remoção durante a administração	Remoção impossível após administração

Em geral, a molécula pode penetrar no tecido viável pelas vias transfolicular, que utiliza canais pilossebáceos ou através do estrato córneo intacto seguindo duas vias distintas: intracelular ou intercelular. A presença de apêndices cutâneos (folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas) significa que a epiderme age, em termos de difusão, como uma barreira complexa (Aungst, 1991, Marjukka Suhonen *et al.*, 1999, Redelmeier e Kitson, 1999).

Em 1983, Barry sugeriu que a difusão intercelular ocorre de forma passiva, através de um mosaico de regiões polares e apolares formado por corneócitos (ricos em queratina) e a matriz lipídica, no qual as substâncias se dissolvem e difundem no estrato córneo de acordo com a sua afinidade química. Estudos da camada córnea utilizando calorimetria exploratória de varredura (DSC), mostraram que o transporte de substâncias através da pele ocorre principalmente pela via intercelular, ou seja, através da matriz lipídica (Golden *et al.* 1987). Estudos realizados por Potts e Guy (1992) mostraram que a permeação da maioria das substâncias no estrato córneo é fortemente influenciada por seu tamanho e lipofilicidade. No entanto, foi sugerido que compostos com alta hidrofiliicidade penetram tanto pelas regiões hidrofílicas dos corneócitos (presumindo que exista água associada à queratina) quanto pela matriz lipídica.

Somente nos últimos anos, foram identificadas correlações entre condições físico-químicas e biológicas no intrincado processo de penetração transdérmica de bioativos (Morganti *et al.*, 2001). A Figura 2 apresenta esquematicamente o estrato córneo e as duas micro-rotas de penetração de fármacos.

Os interstícios entre as células do estrato córneo formam labirintos estreitos com menos de $0,1\mu\text{m}$ de largura. Além disso, o lúmen (dimensão) efetivo dos espaços intercelulares é reduzido por corpos lipídicos. Essas características fazem com que a maioria das moléculas lipofílicas ou hidrofílicas aplicadas topicamente, sejam, eficientemente, isoladas das regiões mais profundas da pele (Barry, 2001). Em 1987 Barry inferiu que fármacos polares atravessem o estrato córneo pela via intracelular, enquanto que os fármacos não-polares penetram pela via intercelular.

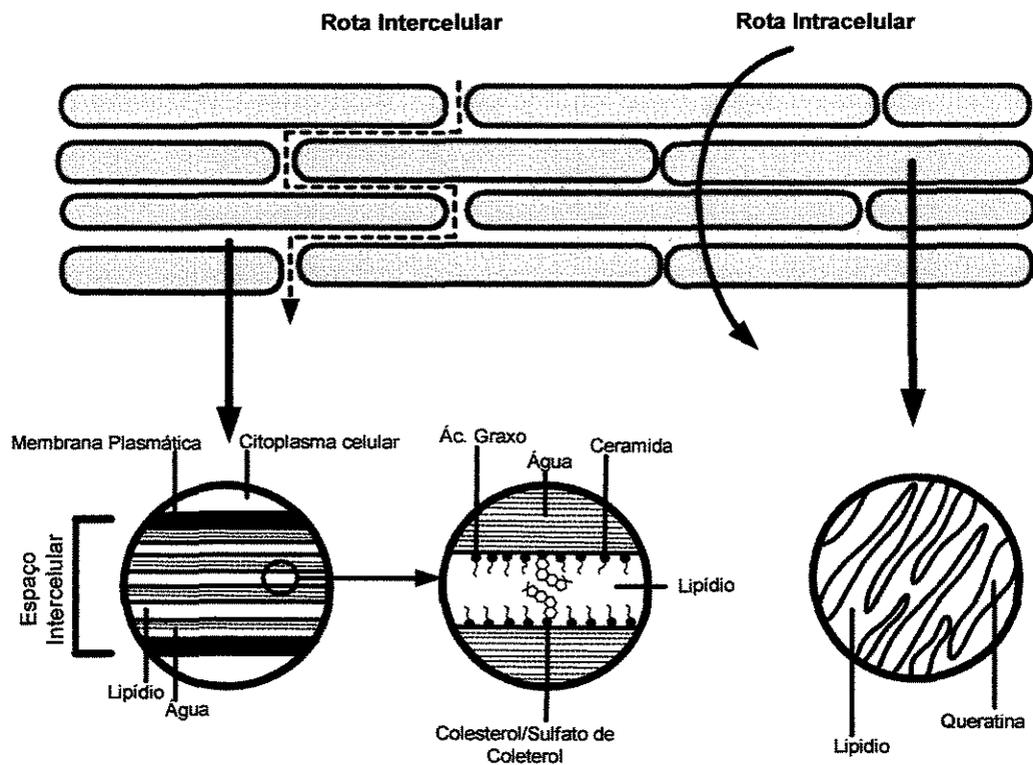


Figura 2: Representação esquemática do estrato córneo, ilustrando duas possíveis vias para difusão (adaptado de Barry, 2001).

A permeabilidade de fármacos no estrato córneo varia de acordo com espécie, idade, localização anatômica, modificação na micro-circulação, temperatura da superfície, entre outros. A arquitetura básica da pele é similar em todos os mamíferos. No entanto, há diferenças estruturais no arranjo e na densidade dos folículos pilosos nos humanos e nos animais. Uma das causas da diferença de permeabilidade humana e animal pode ser a quantidade de apêndices como folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas. O Quadro 3 apresenta a densidade e tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele (Brounaugh *et al.*, 1982).

A permeação de um determinado composto veiculado através da pele pode ser descrita através da Eq. 1 que relaciona o fluxo em estado estacionário com os fatores que afetam a permeação (Barry, 2001).

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DC_oK}{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde m é a quantidade de fármaco permeado em função do tempo t , C_o é a concentração inicial do fármaco no veículo, K é o coeficiente de partição do soluto entre a membrana e a solução, D é o coeficiente de difusão e ε é a espessura da membrana.

Utilizando a Eq. 1 pode-se deduzir as condições ideais para a permeação de fármacos, que são: baixa massa molar (menor que 600Da), resultando em alto valor do coeficiente de difusão D , solubilidade adequada em óleo e em água, tal que promova alto gradiente de concentração entre a solução e a membrana, alto coeficiente de partição do soluto entre a membrana e a solução, K , porém otimizado de modo a não inibir a passagem do bioativo para os tecidos viáveis.

Quadro 3: Densidade e tamanho dos folículos pilosos em 5 tipos de pele (adaptado de Brounaugh *et al.*, 1982).

Espécie	Local da pele	Número de folículos/cm ²	Diâmetro dos folículos (µm)
Humana	Abdômen	11±1	97±3
Porco	Dorsal	11±1	177±4
Ratos	Dorsal	289±21	25±1
Camundongos	Dorsal	658±38	26±1
Camundongos sem pelos	Dorsal	75±6	46±1

Em 1992 Cevc e Blume demonstraram que após a aplicação de um fármaco (livre ou carregado) na pele, é criado um gradiente de concentração entre

o local de aplicação e o interior da pele. Assim, o gradiente é inevitavelmente diminuído com o aumento da massa molecular da substância aplicada. Dessa forma, a aplicação do bioativo deverá estar entre os limites de menor concentração capaz de desempenhar o efeito desejado e a mais alta concentração (determinada por sua solubilidade e toxicidade).

O gradiente de água também é capaz de atuar sobre substâncias aplicadas por via transdérmica. A superfície da epiderme, como se conhece, é relativamente seca, normalmente contém menos que 15% de água, sendo 5 vezes menor que nas camadas mais profundas da pele. O gradiente de água e a pressão osmótica entre a superfície e as camadas mais internas são forças suficientes para resultar no direcionamento das vesículas para as camadas mais profundas da pele (Cevc e Blume, 1992).

Atualmente têm sido estudados vários mecanismos para modificar o estrato córneo e melhorar o transporte de moléculas bioativas, dentre os quais se destacam a utilização de agentes químicos e métodos mais sofisticados, como ultra-som (sonoforese), iontoforese, eletroporação (Cevc *et al.*, 1995) e magnetoforese (Barry, 2001). Esse último apresenta-se muito promissor e é objeto de pesquisas recentes no campo de aplicação de fármacos por via transdérmica. A Figura 3 apresenta alguns métodos utilizados para facilitar o transporte transdérmico de fármacos.

A técnica de ultra-som, usada originalmente em fisioterapia e na medicina de esportes, teve o seu campo de aplicação ampliado também para estudos de liberação transdérmica de bioativos (Mitragotri e Kost, 2000). A energia ultrasônica de baixa frequência provoca distúrbios no empacotamento lipídico do estrato córneo por cavitação, aumentando o volume de espaço livre das camadas biomoleculares e facilitando, assim, a penetração de bioativos nos tecidos (Liu *et al.*, 1998, Prausnitz *et al.*, 2004).

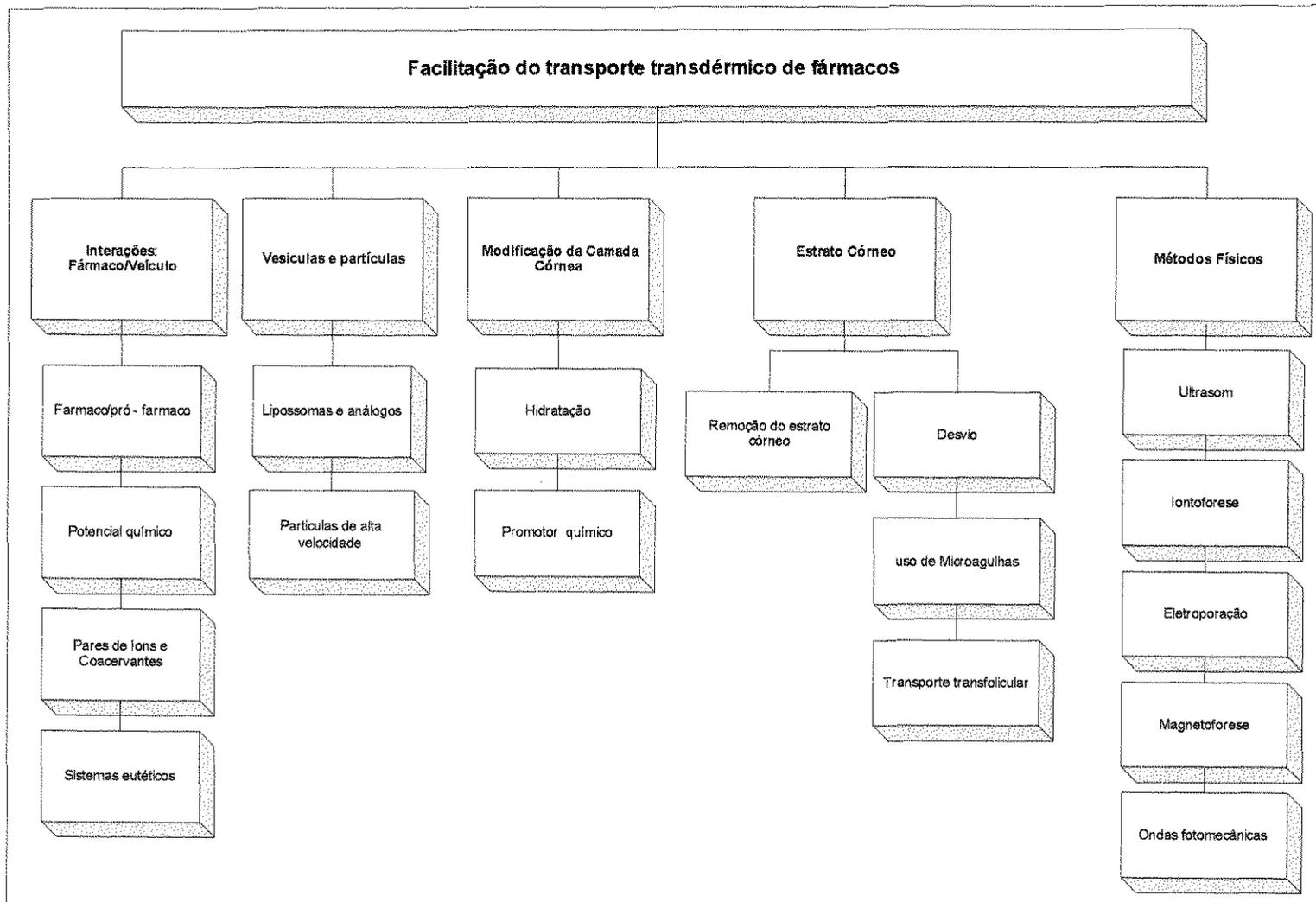


Figura 3: Métodos utilizados para facilitar o transporte transdérmico de fármacos, (Barry, 2001).

A iontoforese consiste na aplicação de um direcionador elétrico que promove modificações moleculares dentro dos tecidos, através da passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade (aproximadamente $0,5\text{mA}/\text{cm}^2$), durante a administração do fármaco (Bouwstra *et al.*, 2003). Três mecanismos principais realçam o transporte molecular: (a) direcionamento primário por repulsão elétrica sobre as espécies carregadas, (b) aumento da permeabilidade da pele através do fluxo de corrente elétrica e (c) a eletro-osmose que pode atuar sobre moléculas grandes não carregadas, como peptídeos polares. A eficiência do transporte depende, principalmente, da polaridade, valência e mobilidade das espécies carregadas, bem como da taxa de ciclos elétricos e dos componentes da formulação (Naik *et al.*, 2000). Apesar do uso de intensidade de corrente aparentemente baixa por unidade de área, a sua aplicação pode causar danos nos apêndices cutâneos de baixa resistência, particularmente aos folículos pilosos prejudicando o crescimento dos pêlos (Wearley *et al.*, 1989, Scott *et al.*, 1993 e Prausnitz *et al.*, 2004).

A eletroporação ou eletropermeabilização da pele permite a geração de poros aquosos transientes através das bicamadas lipídicas. Esta técnica consiste na aplicação de pulsos elétricos de aproximadamente $100\text{--}1000\text{V}/\text{cm}$ durante curtos intervalos de tempo (micro a mili-segundos). Estes poros promovem a penetração suave de fármacos através da camada córnea (Jadoul *et al.*, 1999, Bouwstra *et al.*, 2003).

Os efeitos biofísicos da iontoforese e eletroporação foram verificados visando o conhecimento dos mecanismos envolvidos no transporte de fármacos por esses métodos (Jadoul *et al.*, 1999). Logo após a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade ocorre pequenas modificações no estrato córneo, com aumento no grau de hidratação e na desorganização nas bicamadas fosfolipídicas quando comparada com as alterações ocasionadas com a eletroporação a qual favorece a criação de caminhos transitórios quando aplicados pulsos elétricos de alta intensidade (Prausnitz *et al.*, 2004).

O campo magnético tem sido recentemente estudado como uma alternativa para facilitar o transporte de fármacos livres, constituindo uma técnica denominada de magnetoforese. Embora a literatura seja extremamente escassa em resultados experimentais, tem-se apontado a magnetoforese como método muito promissor para as aplicações transdérmicas de moléculas bioativas. Murthy e Hiremath (2001) utilizaram a magnetoforese para demonstrar a influência do campo magnético na permeação de substâncias diamagnéticas através da pele. Nesses estudos foram usados os ácidos orgânicos maleico, fumárico, succínico, benzóico, oxálico, salicílico, tartárico e cítrico. Os resultados evidenciaram que o campo magnético é capaz de melhorar a permeação dos ácidos através da pele, sendo o fluxo permeado dependente do composto, massa molar e intensidade do campo.

Além disso, a técnica de magnetoforese mostrou-se fisiologicamente mais segura quando comparada às técnicas de iontoforese e sonoforese, pois foi observado que as alterações produzidas na pele desapareceram quando cessada a aplicação do campo magnético.

Pesquisas apontam que a associação de técnicas visando o aumento da permeação cutânea tem se mostrado como uma alternativa interessante, porém não sendo verificada a atenuação dos efeitos indesejáveis de cada técnica (Karande et al., 2004, Pillai et al., 2004).

Recentemente, os domínios protéicos de transdução (PTD) têm surgido como uma nova estratégia não invasiva de administração transdérmica de fármacos. Esses carreadores atuam aumentando a penetração cutânea de peptídios e proteínas devido à sua habilidade de atravessar as membranas de células de mamíferos por via intracelular e carrear compostos de elevada massa molar e partículas ligadas a eles (Snyder e Dowdy, 2004).

3.4 Veiculação de bioativos em sistemas particulados

A veiculação de bioativos em suportes particulados de natureza coloidal tem sido estudada também como mecanismo facilitador do transporte transdérmico. Dentre os sistemas particulados mais estudados estão os niossomas, vesículas formadas por tensoativos, aplicados principalmente na veiculação de cosméticos, e os lipossomas, vesículas de fosfolipídios que mimetizam as membranas celulares em estrutura e função (Lasic, 1993).

3.4.1 Lipossomas

Os lipossomas são estruturas agregadas aproximadamente esféricas compostas por bicamadas lipídicas capazes de encapsular em seu interior compostos polares e apolares na bicamada, formando partículas unilamelares ou multilamelares. Podem ser constituídos por uma ou várias membranas concêntricas, e seu tamanho pode variar de 20nm a vários micrômetros, enquanto que a espessura de cada bicamada é de aproximadamente 4nm. A agregação em estruturas de bicamada é característica dos fosfolipídios, que em meio aquoso formam dispersões coloidais metaestáveis e cineticamente controladas (Crommelin e Schreier, 1994, Lasic, 1993).

A Figura 4 ilustra esquematicamente a estrutura típica de um lipossoma. A molécula típica constituinte dos lipossomas é a fosfatidilcolina (lipídio zwitteriônico - PC) (Figura 5), do grupo dos fosfolipídios, os quais em geral possuem uma cabeça polar que fica exposta à água, enquanto que as caudas apolares formam o interior lipofílico. Na superfície dos agregados lipídicos situam-se as cabeças polares evitando o contato das caudas hidrofóbicas com o meio.

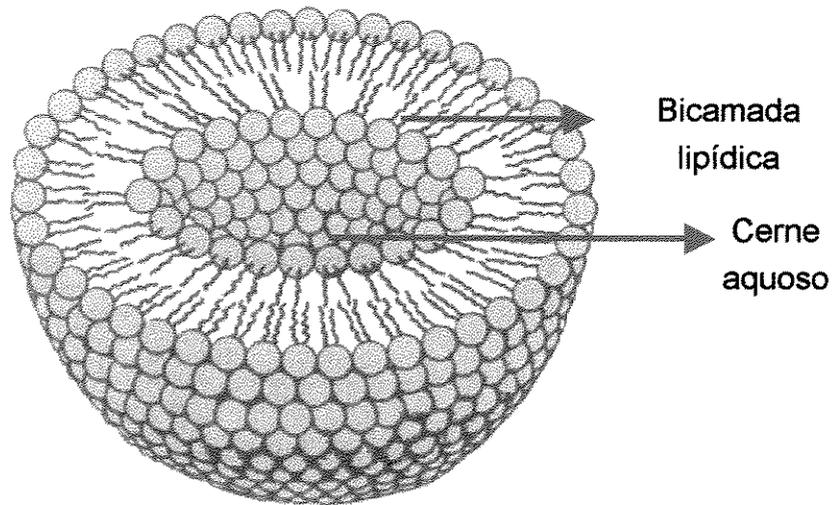


Figura 4: Estrutura típica de lipossomas (adaptado de D.adair's cosmetics, 2005).

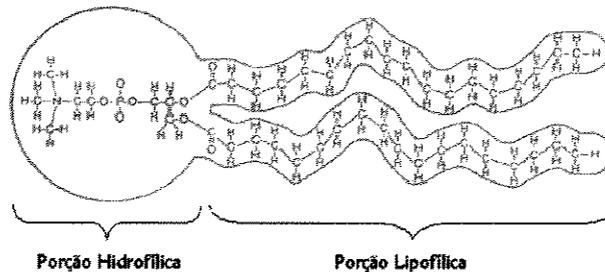


Figura 5: Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina (adaptado de D.adair's cosmetics, 2005).

Os lipossomas diferem quanto ao tamanho, organização estrutural e composição lipídica. A classificação que mais é encontrada na literatura é em relação ao tamanho e ao número de bicamadas concêntricas, ou lamelas, presente na vesícula. Neste item, os lipossomas são classificados em multilamelares (MLV's), com tamanhos maiores que 500nm, unilamelares pequenos (SUV's) ou grandes (LUV's), com diâmetros até 100nm e entre 100 e 500nm, respectivamente (Crommelin e Schreier, 1994).

Apesar da ampla faixa de tamanhos e semelhança estrutural com as membranas celulares, os lipossomas convencionais constituídos somente de

pele e, portanto, atuam somente como reservatórios de compostos que vão sendo difundidos a uma taxa controlada, ou localizam-se nas camadas mais superficiais da pele onde são desestabilizados.

A capacidade dos lipossomas de transportar substâncias da camada mais superficial da pele para as mais profundas vem sendo bastante estudada nos últimos anos, visando o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes, bem como cosméticos.

Em 1980, Mezei e Gulasekharam introduziram o uso de lipossomas para o transporte transdérmico de fármacos, concluindo que lipossomas convencionais penetravam quatro vezes mais que a amostra controle sob a forma de gel. No entanto, Redelmeier e Kitson (1999) e Bouwstra *et al.*, (2003) mostraram que a penetração de vesículas convencionais era restrita a quantidades insignificantes, sendo detectados apenas monômeros de lipídios nos espaços intercelulares da epiderme. Uma das explicações atribuídas é que nos lipossomas convencionais, provavelmente, os lipídios estavam no estado gel, cuja penetração torna-se menos efetiva. Esta limitação pode ser contornada quando os lipídios estão no estado líquido-cristalino, no qual as membranas estão muito mais fluidas (Figura 6). Além disso, variações em outras características físicas das vesículas, assim como tamanho, número de bicamadas e carga também podem influir na taxa de penetração.

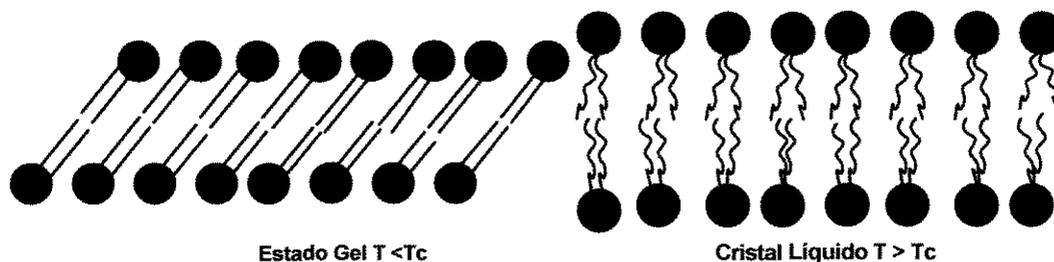


Figura 6: Representação esquemática da transição de fases dos lipídios (adaptado de New, 1990).

Desde que foi postulado que vesículas elásticas exigem um gradiente de hidratação externo para maximizar seus efeitos atravessando a barreira imposta

pelo estrato córneo, vários estudos têm sido elaborados para verificar aspectos físico-químicos e elasticidade da bicamada das vesículas. No entanto, estudos enfocando o comportamento de fluxo em se tratando de seus aspectos reológicos ainda são escassos na literatura (Bruinsma, 1996, Frisken *et al.* 2000).

3.4.1.1. Lipossomas elásticos

Lipossomas elásticos representam a mais recente formulação utilizando fosfolipídios e tensoativos para liberação de moléculas bioativas por via transdérmica. Estes lipossomas diferem dos lipossomas convencionais e niossomas por terem características de membranas fluidas e alta elasticidade, que os tornam capazes de atravessar regiões intercelulares do estrato córneo sob a influência do gradiente de água transepidermal que, em geral, varia de 15 a 20% no estrato córneo para 70% no estrato granuloso (Van den Bergh *et al.*, 1999, Cevc e Blume, 2001).

Lipossomas e niossomas convencionais não penetram na pele intacta, devido à sua incapacidade de atravessar espaços intercelulares estreitos (menores que 30nm) presentes nas camadas da pele (Cevc *et al.*, 1995, 1997 e 2002). Outros estudos também demonstraram que sistemas aplicados de maneira oclusiva impedem a desidratação da dispersão de lipossomas e, dessa forma, limitam a difusão das vesículas lipídicas na pele intacta, sugerindo que o gradiente de água transepidermal é um dos fatores mais importantes no transporte de vesículas através da pele (Cevc e Blume, 1992). Apesar de ter sido aceito que o uso de vesículas elásticas pode resultar no aumentado do transporte de moléculas bioativas pela pele (Bouwstra *et al.*, 1999), o mecanismo de ação destas formulações vesiculares ainda não está elucidado e, por isto, várias pesquisas estão sendo realizadas.

As pesquisas sobre lipossomas elásticos ainda são escassas e os principais trabalhos reportados na literatura são praticamente de dois grupos de pesquisadores: Gregor Cevc do Departamento de Medicina Biofísica da Universidade Técnica de Munique na Alemanha e Joke A. Bouwstra da Divisão de Tecnologia Farmacêutica e Centro de Ciências Biofarmacêuticas da Universidade de Leiden na Holanda. Cevc (Patent Number 91 114 163 8 – 2114) patenteou uma formulação de lipossomas ultra-deformáveis, registrada como “TransfersomesTM” (Innovative Dermal Applications ‘IDEA’, Munich, Germany), capazes de passarem intactos e carrear bioativos através da pele. Nestas formulações, o colato de sódio foi usado como tensoativo para produzir elasticidade nos transfersssomas.

A Figura 7 representa esquematicamente a deformação dos lipossomas elásticos, da forma esférica para a forma de um esfero-cilindro, aqui representado como os transfersssomas, ao atravessarem poros muito menores que seu diâmetro, mantendo a sua integridade.

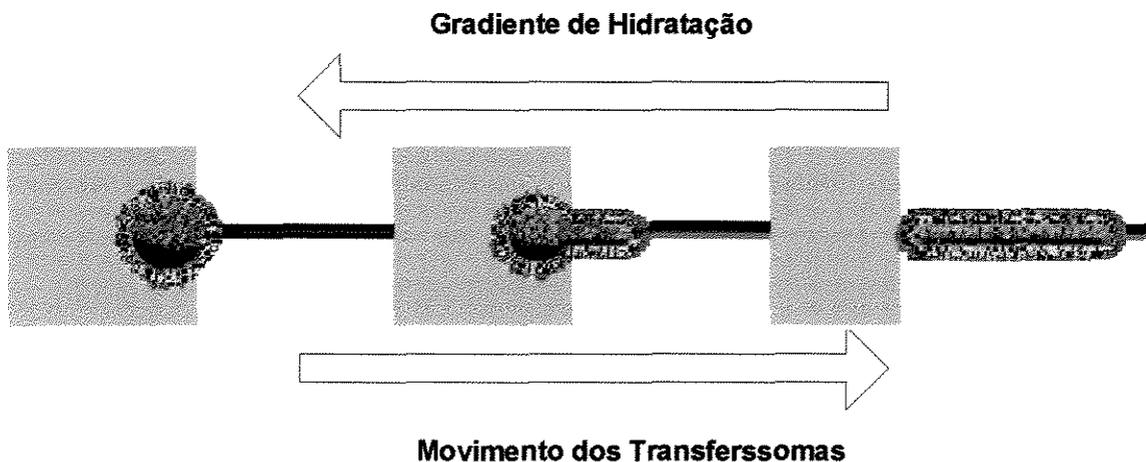


Figura 7: Representação esquemática do movimento dos lipossomas elásticos permeando a epiderme para alcançar as camadas mais internas da pele em sentido contrário ao gradiente de hidratação (adaptado de University of Rochester, 2005).

Estudos comparando transfersssomas e lipossomas convencionais foram

realizados com marcadores fluorescentes utilizando pele de ratos. Para tanto, Schatzlein e Cevc em 1998 adicionaram Rhodamina–DHPE (1,2-dihexadecanoil – sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-lissamina rhodamina B sufonil, sal de trietilamonio) como marcador fluorescente nas bicamadas dos transferssomas. As dispersões foram aplicadas sobre ratos sem pêlos por período de 4 a 12 horas. Logo após, a pele foi examinada *ex-vivo* utilizando a técnica de microscopia confocal. As imagens revelaram a existência de caminhos entre os grupos celulares. Os autores interpretam estas regiões como sendo poros virtuais entre os corneócitos pelos quais as vesículas podem passar.

A eficiência de penetração de várias vesículas lipídicas foi avaliada por Cevc e Blume (1992). Lipossomas convencionais e transferssomas foram aplicados oclusivamente, ou não, em ratos. Nas aplicações oclusivas os resultados revelaram que após 8 horas praticamente não se observou presença de lipídio fluorescente no sangue; porém, quando a amostra foi aplicada de maneira não oclusiva, verificou-se o aumento da concentração de lipídio fluorescente no sangue 3 horas depois. Cerca de 80% dos lipossomas convencionais foram identificados na superfície da pele após 8hs, sendo que 25% estavam associados ao estrato córneo e apenas uma pequena percentagem foi identificada nas camadas mais profundas de epiderme. Os autores concluíram que lipossomas convencionais não são capazes de transpor a pele intacta, pois ocorre interação com o estrato córneo e o entupimento dos espaços intercelulares (Zellmer *et al.*, 1995, Van den Bergh *et al.*, 1998). Cevc e Blume (1992) aplicaram transferssomas não oclusivamente e, observaram, após 30 minutos níveis moderados (0,1 a 0,5%) de lipídio marcado no sangue (Cevc, 1995).

Cevc e Blume (1992) demonstraram ainda que os transferssomas são transportados através da pele na forma de vesículas, por duas razões principais: é pouco provável que durante o período de 8 horas ocorra degradação de uma considerável proporção das vesículas por células fagocitárias da pele. Alguns dos lipídios associados a marcadores fluorescentes foram recuperados no fígado, no qual se acumulam partículas e vesículas, demonstrando que transferssomas

íntactos atingiram a corrente sanguínea.

Experimentos realizados por Zellmer *et al.* (1995) utilizando microscopia confocal e calorimetria diferencial exploratória mostraram que lipossomas convencionais de DMPC não atravessam o estrato córneo, apesar da temperatura de transição de fases deste lipídio (23°C) ser menor que a temperatura corpórea.

A penetração dos transferssomas através da pele pode ser comparada ao comportamento de parasitas, tais como helmintos, durante a sua invasão no corpo hospedeiro. Inicialmente o parasita cria uma passagem na pele e penetra através das suas barreiras com o consumo de energia metabólica sendo, finalmente, distribuído pelo corpo. Os transferssomas, que não possuem fontes internas de energia, atingem a mesma meta, explorando os gradientes de energia que ocorrem naturalmente na pele. A diferença na quantidade de água nas diferentes camadas da pele é, provavelmente, o gradiente natural mais importante. Ajustes na elasticidade e no diâmetro e distribuição de tamanho das vesículas minimizam os gastos de energia para a penetração na pele intacta (Paul *et al.*, 1998, Cevc *et al.*, 1995, 1997 e 1998).

Os transferssomas foram usados *in vivo* como carreadores de fármacos como diclofenaco (Cevc e Blume, 2001), hidrocortizona, inulina, lidocaina e tetracaína, bem como para moléculas grandes como albumina de soro bovino e insulina, com bastante sucesso (Bouwstra *et al.*, 2003). Recentemente, El Maghraby e colaboradores (2000) estudaram o transporte de estradiol em transferssomas utilizando pele humana *in vitro*. Embora tenham observado aumento no fluxo de estradiol, o efeito foi menor que o detectado por Cevc e Blume em 1992 nos ensaios *in vivo*.

Nos anos 90 foi introduzido por Cevc e colaboradores um novo parâmetro físico, a elasticidade da bicamada, para caracterizar as vesículas elásticas. A relação entre a elasticidade da bicamada, o fluxo de vesículas através do poro e os diâmetros do poro e da vesícula pode ser obtida a partir da derivação da equação do fluxo de vesículas através de uma membrana porosa considerando-se que este é causado por um gradiente de potencial químico representado pela

diferença de atividade de água entre os dois lados da membrana. Este fluxo é proporcional à área dos poros da membrana e à permeabilidade da vesícula (Eq. 2) (Cevc e Gebauer, 2003).

$$J_v = A_{\text{poros}} \left[[1 - \sigma_v(r_v)] \bar{C}_v P_w - P_{a,i} (r_v)^2 \right] \Delta \Pi_i \quad (\text{Eq. 2})$$

onde A_{poros} é a área total ocupada pelos poros na membrana, $\sigma_v(r_v)$ é o coeficiente de refratividade da membrana ao agregado, \bar{C} é a concentração média de vesículas, P_w é a permeabilidade da membrana à água, $P_{a,i}$ é a permeabilidade da membrana ao agregado e $\Delta \Pi_i$ é o gradiente de pressão osmótica causado por espécies independentes da vesícula permeante.

A permeabilidade das vesículas é influenciada tanto pelo módulo de energia elástica quanto pela tensão de ruptura da bicamada lipídica, como pode ser visto pela Eq. 3:

$$P_a = \frac{RTd_i}{N_a h} \exp\left(\frac{-G_{\text{deform}}^{\#}}{RT}\right) \propto (\tilde{\delta} k_c)^{-\gamma} \frac{r_p^{\alpha}}{r_v^{\beta}} + \delta^2 \gamma_{\text{ruptura}}^2 \frac{\bar{A}_a}{K_{a,\text{eff}}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde d_i é a tamanho relativo entre a saída e a entrada do poro da membrana, N_A é o número de Avogadro, h é a constante de Planck, $G_{\text{deform}}^{\#}$ é a energia livre de deformação do agregado, k_c é o módulo de energia elástica da membrana, γ_{ruptura} é a tensão de ruptura da bicamada, \bar{A}_a é a área média dos agregados, $K_{a,\text{eff}}$ é módulo de compressibilidade lateral da bicamada, α é uma constate dependente do tipo de vesículas, β é uma constate dependente do tipo de membrana utilizada e δ é uma função que leva em consideração a influência da composição.

Desconsiderando-se pequenas diferenças de concentração das vesículas

através da barreira e combinando os parâmetros relativos ao módulo de energia elástica e à tensão de ruptura em um novo parâmetro E, denominado elasticidade, obtêm-se aproximadamente a relação entre o fluxo e os diâmetros das vesículas e do poro da membrana (Eq. 4).

$$J \cong E \frac{d_p^2}{d_v^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Isolando o parâmetro E chega-se finalmente à relação de proporcionalidade entre a elasticidade da vesícula, fluxo de vesículas e diâmetros do poro e da vesícula representada pela Eq. 5:

$$E \cong J \left(\frac{d_v}{d_p} \right)^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde E é o módulo da elasticidade, J é fluxo das vesículas, d_v é diâmetro da vesícula e d_p é o diâmetro do poro da membrana.

Baseado no princípio de que compostos com atividade de superfície são capazes de serem incorporados em membranas lipídicas formando vesículas elásticas, Bouwstra e seu grupo (1999) estudaram outras composições de vesículas elásticas quanto à preparação, caracterização, mecanismos pelas quais interagem com a pele e a sua contribuição na liberação transdérmica de fármacos. Foram preparadas uma série de formulações à base dos tensoativos não-iônicos: sacarose-laurato-éster, L595, e octaoxietilenolaurato-éster (PEG8L), combinados ou não com fosfatidilcolina como elemento estrutural em diferentes proporções molares. Essas formulações foram analisadas quanto à elasticidade das vesículas e interações com o estrato córneo (Van den Bergh *et al.*, 1999 e 2001, Honeywell-nguyen *et al.*, 2002, Honeywell-nguyen e Bouwstra, 2003, Honeywell-nguyen *et*

al., 2003).

Os resultados mais promissores, em se tratando da elasticidade das vesículas, foram obtidos com o aumento na concentração de 30Mol% para 70Mol% do tensoativo PEG8L e L595. No entanto, quando a quantidade de tensoativo torna-se saturante em relação à bicamada lipídica, as vesículas tornam-se muito mais instáveis, havendo a formação de quantidades expressivas de micelas. Portanto, há um compromisso crucial entre a elasticidade e a estabilidade das vesículas quando tensoativos são usados nas formulações (Van den Bergh *et al.*, 1999 e 2001).

As interações entre tensoativos e a bicamada lipídica de lipossomas vêm sendo estudadas desde a década de 80, com o trabalho pioneiro de Litchenberg, (1985), sobre a caracterização da solubilização de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos.

A incorporação de tensoativos não-iônicos do tipo polioxietilenos da série C_xE_y na estrutura dos lipossomas foi também anteriormente estudada por vários grupos, incluindo o nosso grupo, visando avaliar a estabilidade das vesículas (Edwards e Almgren, 1991 e 1992, Moraes *et al.*, 1999 e Ribas, 1997). A incorporação do tensoativo produz aumento de tamanho das vesículas até um limite máximo onde ocorre o seu rompimento em micelas de menor tamanho.

A variação de tamanhos dos lipossomas pode ser monitorada através da turbidez das soluções, gerando perfis típicos de absorvância (na faixa de 340-350nm) *versus* concentração de tensoativo, conforme mostrado na Figura 8. Nesses comprimentos de onda, as variações em absorvância refletem as mudanças de tamanhos dos lipossomas causadas pela incorporação do tensoativo na bicamada lipídica. Esses perfis mostram claramente uma região inicial, à baixa concentração de tensoativo, onde ocorre o intumescimento das vesículas, e praticamente não há variação de tamanho, ou de absorvância. Na região de média concentração de tensoativo há o crescimento das vesículas com conseqüente aumento da absorvância até um limite máximo, seguido da desestabilização com formação de micelas, produzindo decréscimo na

absorbância em decorrência do menor tamanho dessas estruturas.

Nomura *et al.*, 2001, acompanharam através de microscopia de campo escuro a transição entre lipossomas e micelas sob a ação do tensoativo Triton X-100. A Figura 9 ilustra as transformações da bicamada, caracterizada pelos autores como estado tenso e relaxado, até a formação das micelas.

Para os lipossomas contendo polietilenoglicol os perfis de absorbância mostram redução na região de baixa concentração de tensoativo (fase de intumescimento), indicando uma reorganização dos fosfolipídios em presença do tensoativo, com o aparecimento de estruturas em bicamada porém de menores tamanhos, conforme caracterizado por Ribas, 1997, através de caracterização por RPE.

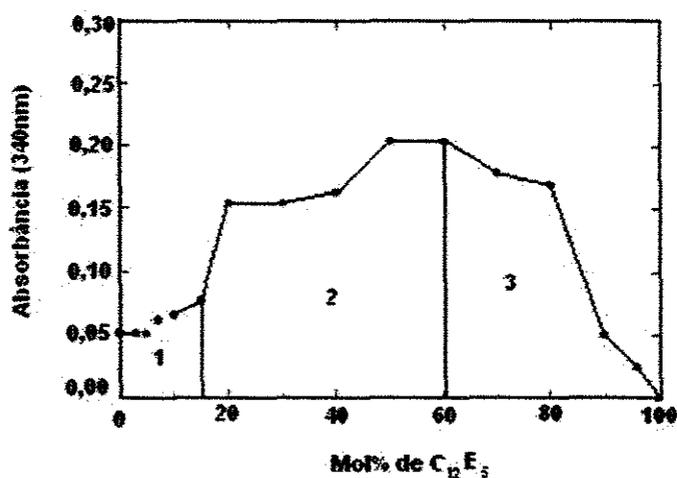


Figura 8: Perfil de Lipossomas convencionais (DSPC:DMPE:COL, 33:20:47,1mM) sonicados em função da concentração de tensoativo $C_{12}E_5$. Regiões:1. tamanho da molécula aproximadamente igual ao inicial, 2. início da desestabilização, com crescimento e fusão das vesículas e 3. solubilização das vesículas com a formação da micelas. (Lichtenberg, 1985, Edwards e Almgren, 1992).

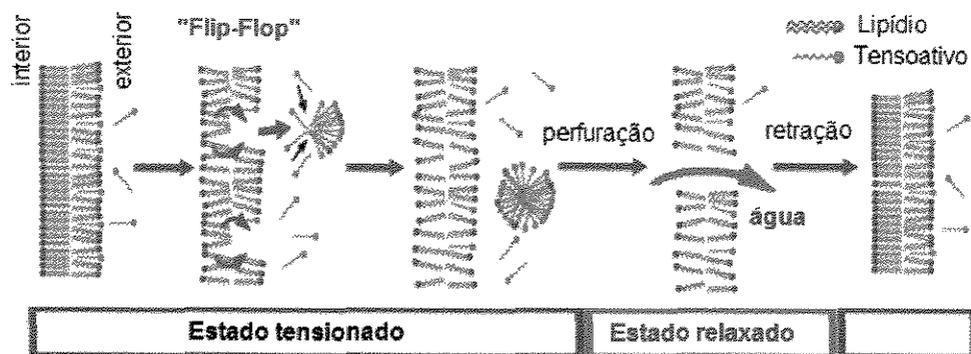


Figura 9: Modelo do processo contínuo de relaxamento de lipossomas (adaptação de Nomura *et al.*, 2001).

Pamplona e Santana (1997) utilizando dados de Edwards e Almgren (1991 e 1992) calcularam o raio de ruptura de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo, e mostraram que bicamadas lipídicas são capazes de se deformarem sem rompimento, mediante a incorporação de tensoativos da série C_xE_y . Esses resultados indicam que a incorporação de tensoativos dessa série também produz elasticidade nos lipossomas.

3.4.1.1.1 Determinação do parâmetro de ordem da bicamada lipídica por Ressonância Paramagnética Eletrônica

O parâmetro de ordem, designado por S , caracteriza o grau de organização de um agregado. Em membranas, o grau de organização determina propriedades importantes, tais como fluidez e estabilidade da estrutura. A determinação do parâmetro de ordem é, portanto de fundamental importância no estudo de interações entre lipossomas e tensoativos, para o entendimento das estruturas agregadas formadas.

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas para a determinação do parâmetro de ordem de agregados. Portanto, pode ser utilizada como uma ferramenta importante para

fornecer informações sobre o comportamento dinâmico de estruturas lipídicas como lipossomas.

A RPE opera na região de microondas (GHz) e detecta transições de estados de spin eletrônicos. A energia correspondente a essas transições é da ordem de grandeza daquela envolvida em movimentos translacionais, rotacionais e segmentares das moléculas, o que permite a análise desses movimentos através dos espectros obtidos. A RPE detecta compostos com um ou mais elétrons desemparelhados (moléculas paramagnéticas). Essas moléculas, quando submetidas a um campo magnético, orientam-se segundo seus momentos magnéticos de spin. Quando se aplica uma onda eletromagnética ressonante com a precessão do spin eletrônico, ocorre absorção de energia e transição do estado de spin. A energia de transição pode ser calculada pela Eq. 6:

$$h\nu = g\beta H \quad (\text{Eq. 6})$$

onde, h =constante de Planck; ν = freqüência da radiação incidente; g =fator característico do elétron ; β =magneton de Bohr ; H =campo magnético externo.

A absorção é registrada no espectro de RPE como a primeira derivada das bandas de absorção de energia da amostra (Schreier *et al.*, 1978; Warren, 1987). Após algum tempo há relaxação e retorno ao estado de spin original.

As moléculas paramagnéticas não são tão freqüentes em sistemas biológicos. Para o estudo de sistemas diamagnéticos, a técnica do marcador de spin veio solucionar esse problema (Hubbel e McConnell, 1971; Warren, 1987). Através do uso de um marcador paramagnético estável, é possível obter informações de caráter estrutural e da mobilidade (tempo de correlação rotacional) do sistema no qual a sonda está inserida. Em particular nas membranas, a técnica do marcador de spin trouxe enorme contribuição (Hubbel e McConnell, 1971).

O marcador de spin mais utilizado é o radical nitróxido, por ser estável em amplas faixas de temperatura e pH. Esta molécula, ao se intercalar na membrana, tende a se orientar preferencialmente. Os marcadores do tipo ácido doxil esteárico

orientam-se com o eixo z aproximadamente paralelo ao eixo normal da bicamada (Warren, 1987). A Figura 10 apresenta o marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL).

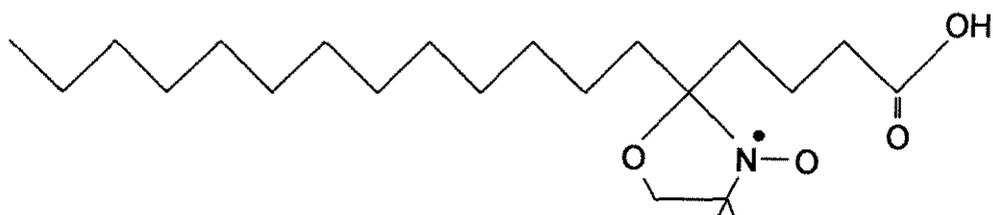


Figura 10: Molécula de marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL)

A partir de espectros de RPE, é possível calcular o parâmetro de ordem (S) que é uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. O espectro desses marcadores apresenta parâmetros que refletem as orientações nos eixos x , y (extremos internos) e z (extremos externos) que são usados para a determinação de S (Figura 11).

O parâmetro de ordem é uma medida da orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada) e varia de 0, em sistemas isotrópicos a 1, para uma molécula perfeitamente orientada (Jost *et al.*, 1971). S reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula e pode ser calculado pela Eq. 7 que relaciona os parâmetros determinados a partir dos espectros experimentais.

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \left[\frac{(A_{xx} + A_{yy})}{2} \right]} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde, $A_{//}$ e A_{\perp} são medidos diretamente no espectro de RPE. A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os principais componentes do tensor hiperfino, medidos em monocristal, e tem os valores constantes de 32, 6 e 6, respectivamente (Schreier *et al.*, 1978).

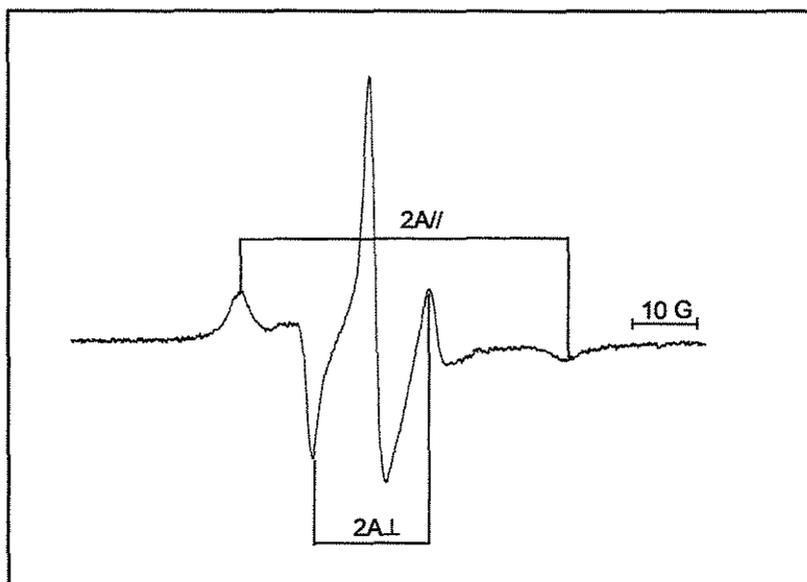


Figura 11: Espectro de RPE do marcador 5-SASL em membrana eritrocitária (Schreier *et al.*, 1984)

Se o grau de ordem na membrana é pequeno, os extremos externos do espectro não são resolvidos e o parâmetro de ordem não pode ser medido diretamente. Este é o caso dos metil estearatos, que não interagem fortemente com a interface aquosa da membrana por não possuírem um grupamento carregado para ancorar-se ao nível da cabeça polar dos lipídios. Pela falta de uma forte interação, o espectro mostra um baixo grau de anisotropia, o que impede tanto a medida do parâmetro de ordem, como o cálculo preciso do tempo de correlação rotacional da molécula, empregando a teoria desenvolvida para sistemas isotrópicos (Schreier *et al.*, 1984). Neste caso pode-se usar o parâmetro empírico dado pela Eq. 8.

$$\text{Efeito} = \frac{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}}{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

onde (h_{+1}/h_0) é a razão das alturas dos picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), como uma medida do grau de organização da membrana (Figura 9), compreendendo com isso efeitos de ordem e mobilidade das moléculas na bicamada (Schreier *et al.*, 1978). Quanto mais anisotrópico o movimento do marcador na membrana, mais alargadas as linhas espectrais e maior a diferença entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), enquanto uma menor organização da membrana é acompanhada por razões h_{+1}/h_0 maiores. Neste caso, o efeito desorganizador pode ser expresso como uma porcentagem da razão h_{+1}/h_0 inicial, de acordo com a Eq. 8.

Vários estudos têm sido realizados utilizando a técnica de RPE com uma grande variedade de membranas lipídicas e de tensoativos, e os resultados demonstram que a incorporação de tensoativos na bicamada aumenta a desordem molecular aumentando também a mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos (Goni e Alonso, 2000).

Van den Bergh e colaboradores (2001) obtiveram o parâmetro de ordem de vesículas contendo PEG8L (100%), PEG8L:L-595: Sulfato de colesterol (70:30:5), PEG8L:L-595: Sulfato de colesterol (30:70:5), L-595:Colesterol:Sulfato de colesterol (50:50:5), Wasag-7 (éster de sacarose):Colesterol:Sulfato de colesterol (50:50:5) utilizando três marcadores spin de ácido esteárico, 5-SASL, 12-SASL e 16-SASL, que diferiam em relação à posição do radical livre nitróxido na cadeia de hidrocarbonetos (C_5 , C_{12} e C_{16} respectivamente).

Os resultados obtidos mostraram um decréscimo nos valores de S para as vesículas formadas por PEG8L indicando maior fluidez da bicamada lipídica. No entanto, comparando os parâmetros de ordem obtidos para as formulações contendo 30, 70 e 100Mol% de PEG8L não foram observadas diferenças significativas entre as amostras. Além disso, foi constatado que a presença do colesterol nas vesículas favoreceu a formação de vesículas mais rígidas (maior valor de S) e que a posição do radical nitróxido dos marcadores influenciou na mobilidade da bicamada lipídica, sendo observado que quanto mais próximo o

radical nítróido encontra-se da cabeça polar da bicamada lipídica mais rígida torna-se a membrana. Dessa forma, maiores valores de S foram obtidos quando foi utilizado o marcador 5-SASL. Os autores correlacionaram a elasticidade anteriormente citada no item 3.4.1.1 com a fluidez da bicamada lipídica, promovida pela incorporação dos tensoativos.

3.4.1.1.2 Permeação de lipossomas através de membranas

A permeação dos lipossomas através de membranas com nanoporos, vem sendo descrita na literatura para redução e homogeneização de tamanhos de lipossomas multilamelares (Frinsken *et al.*, 2000) ou para estudar o escoamento em capilares e as deformações sofridas pelos lipossomas no interior dos poros (Bruinsma, 1996).

Quando um fluido Newtoniano é permeado com escoamento uniforme através de um meio poroso isotrópico e homogêneo, a equação do movimento toma a forma conhecida como lei de Darcy. No escoamento incompressível, a equação de Darcy relaciona a vazão Q com a queda de pressão por unidade de comprimento, $\Delta P/\Delta L$, conforme a Eq. 9. O fator de proporcionalidade, representa a permeabilidade do meio poroso (Massarani, 1997).

$$Q = \frac{k}{\mu} \times \left(\frac{\Delta P}{\Delta L} \right) \quad (\text{Eq. 9})$$

onde k depende apenas dos fatores estruturais da matriz porosa.

Quando lipossomas convencionais estão presentes no fluido, a lei de Darcy é obedecida com uma permeabilidade efetiva K_{eff} , (Eq. 10), a qual não depende apenas da matriz porosa mais é função também da concentração das vesículas na dispersão (Bruinsma, 1996).

$$K_{eff} = \frac{R^2}{\left[8 + 0,233(nL^*) \left(\frac{L^*}{R} \right)^2 \right]} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde n é o número de moléculas de lipídios na dispersão, R e L^* são o raio e o comprimento da vesícula na forma de esfero-cilindro no interior do poro.

Dois regimes reológicos podem ser observados no escoamento das vesículas através de capilares: à baixa pressão, as vesículas sob tensão movem-se muito lentamente e não obedecem à equação da Darcy. Com o aumento da pressão, as tensões nas vesículas tendem a se reduzir, e com isso o escoamento passa a obedecer a equação de Darcy, com permeabilidade efetiva. Os estudos teóricos de Bruinsma (1996) mostram que nessa situação, as vesículas experimentam uma sucessão de forma que vão da esfera ao esfero-cilindro no interior do poro, até a forma de sino na sua saída.

3.4.2 Magnetolipossomas

A incorporação de ferrofluidos em lipossomas origina os magnetolipossomas, conhecidos desde os trabalhos pioneiros de De Cuyper e Joniau (1988). Os magnetolipossomas são capazes de ser direcionados pela aplicação de um campo magnético e aplicações importantes têm sido estudadas para liberação controlada de fármacos (Babincová *et al.*, 1999, Ishii, 1990), imobilização de enzimas (De Cuyper e Joniau, 1990 e 1992), separação de células (Safarík e Safaríková, 1999, Margolis *et al.*, 1983), estudo sobre transferência aquosa de fosfolipídios (De Cuyper e Valtonen, 2001), como um agente de contraste de imagens MR (De Cuyper *et al.*, 1999) e como um agente indutor de hipertermia (Viroonchatapan *et al.*, 1996, Shinkai *et al.*, 1999, Babincová *et al.*, 2001). Desde 1995, o nosso grupo estuda a preparação e caracterização de magnetolipossomas em aplicações como adsorventes de afinidade para diagnóstico de autoanticorpos (Martins, 1998, Pinho, 2000, Rocha *et al.* 2001) e na detecção de imunoglobulinas do isotipo E (IgE) para o diagnóstico de alergia (Zollner *et al.*, 2003). Modificações na superfície destas partículas envolvendo polietilenoglicol e ligantes específicos, úteis para aplicações *in vitro* e *in vivo* também foram demonstradas em publicação recente (De Cuyper *et al.*, 2002).

A estrutura lipossomal incorporando o ferrofluido no seu cerne aquoso pode ser preparada por dois métodos: diálise, onde a incubação de lipossomas convencionais com o ferrofluido estabilizado com ácido láurico conduz à migração do fosfolípido no sentido de recobrimento das partículas magnéticas com conseqüente deslocamento do ácido láurico que pode ser detectado por dosagem na solução de diálise (De Cuyper e Joniau, 1988), ou por hidratação do filme seco de lipídios com o ferrofluido, seguida de sonicação (Pinho, 2000, Rocha *et al.* 2001). Fotografias feitas em microscópio de transmissão mostram claramente que em ambos os casos o ferrofluido posiciona-se no núcleo aquoso dos lipossomas formados.

Embora a magnetoforese venha sendo estudada como mecanismo facilitador do transporte transdérmico de fármacos, os estudos da literatura utilizaram somente fármacos na forma livre. Não há estudos sobre a magnetoforese de fármacos veiculados em lipossomas ou outros suportes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

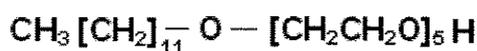
Os materiais utilizados neste trabalho foram reagentes para preparação e caracterização dos lipossomas elásticos ou dos elástico-magnéticos, além dos materiais usados para a síntese da magnetita coloidal.

Os lipossomas foram preparados utilizando os seguintes lipídios, tensoativos, solventes e tampão:

- dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), MM 677,90g/mol 99%, (Sigma),
- fosfatidilcolina de soja hidrogenada (EPIKURON 200SH), MM 784,50g/mol , 95%, (Lucas Meyer)
- fosfatidilcolina de ovo (Ovothin 160), 60,0% de fosfatidilcolina (Degussa),
- tampão N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico] (HEPES), MM 238,30 g/mol 99,5%, (Sigma),
- clorofórmio (CHCl₃), MM 119,38g/mol 99% PA (Merck),
- metanol (CH₃OH), MM 32,04g/mol 99,8% PA (Merck),
- ácido 5-doxil esteárico (5-SASL) (Sigma),
- Fitolacianinas de zinco (C₃₂H₁₆N₈Zn), MM 577,91g/mol.

Os tensoativos utilizados foram:

- Polioxietileno 5 lauril éter (C₁₂E₅), MM 406,60g/mol (Sigma),



- Polioxietilenoglicol monoéster de ácido láurico (Lipochemicals),
 - Polioxietilenoglicol-8-lauril ($C_{28}H_{56}O_{10}$), MM 552g/mol, (PEG8L).

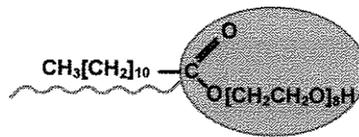


Figura 12: Representação esquemática do tensoativo PEG8L.

- Polioxietilenoglicol-8-dilauril ($C_{40}H_{78}O_{11}$), MM 734g/mol, (PEG8DL).

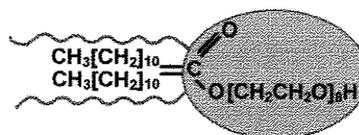


Figura 13: Representação esquemática do tensoativo PEG8DL.

- Polioxietilenoglicol-4-lauril ($C_{20}H_{40}O_6$), MM 376g/mol, (PEG4L).

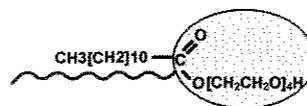


Figura 14: Representação esquemática do tensoativo PEG4L

- Polioxietilenoglicol-4-dilauril ($C_{32}H_{62}O_7$), MM 558g/mol, (PEG4DL).

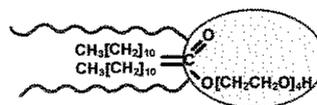


Figura 15: Representação esquemática do tensoativo PEG4DL

Para a síntese e estabilização da magnetita coloidal foram usados os seguintes reagentes:

- Cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), MM 270,30g/mol (Merck),
- Cloreto de ferro II tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), MM 198,81g/mol (Acros Organics),
- Hidróxido de amônio MM 17,03 g/mol, 25% (NH_4OH) (Merck),
- Ácido láurico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) MM 200,32g/mol, 99% PA (Merck).

Para as análises quantitativas dos fosfolipídios e da magnetita foram usados os reagentes:

- Ácido 4,5-diidroxí-1,3-benzeno dissulfônico ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}_2$) (TIRON), MM 314,2g/mol, 94% (Sigma),
- Hidróxido de potássio (KOH), MM 56,11g/mol, 85% PA (Merck),
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), MM 98,8g/mol, 95% (Synth),
- Ácido nítrico (HNO_3), MM 63,01g/mol, 65% PA (Merck),
- Ácido clorídrico (HCl), MM 36,46g/mol, 38% (Merck),
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), MM 34,01g/mol, 30% PA (Merck),
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), MM 176,12g/mol, 99% (Aldrich),
- Molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), MM 1235,9 g/mol 81,2% (Sigma).

Para a extrusão dos lipossomas foram utilizadas membranas de policarbonato com poros de 100nm e nos ensaios para estimativa da elasticidade dos lipossomas as membranas possuíam poros de 50nm ou 30nm. Todas as membranas usadas foram da Osmonics Inc.

A membrana natural utilizada para testes *in vitro* de permeação dos lipossomas foi pele de porco dermatomizada gentilmente cedida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos lipossomas convencionais e elásticos

A preparação dos lipossomas convencionais e elásticos foi feita pelo método de Bangham, (New, 1990) através da hidratação do filme seco de lipídios com posterior extrusão em membranas de policarbonato para homogeneização do tamanho das vesículas (Lasic, 1993).

Os fosfolipídios estocados a 0°C foram inicialmente trazidos à temperatura ambiente (25°C) e pesados de acordo com a composição pretendida (Tabela 1). Os fosfolipídios foram solubilizados com 10mL de uma solução 9:1 de clorofórmio/metanol (v/v) e homogeneizados durante 5 minutos em evaporador rotatório, sendo, posteriormente, promovida a evaporação do solvente sob vácuo (650mmHg) com temperatura acima da transição de fases do lipídio (T_m 23°C) até a formação do filme seco. Na etapa de hidratação do filme seco foi adicionado 10mL de solução tampão HEPES (10mM) pH 7,4 a 33°C.

As formulações de 1 a 13, descritas na Tabela 1, foram preparadas solubilizando os respectivos tensoativos juntamente com o fosfolipídio a solução 9:1 de clorofórmio/metanol (v/v) citada acima. Para a obtenção das formulações 14 e 15, o tensoativo foi adicionado aos lipossomas pré-formados. A formulação 5 foi preparada pelos dois métodos. A incorporação do tensoativo na bicamada dos lipossomas pré-formados foi acompanhada por medidas do espalhamento de luz da dispersão a 340nm, diâmetro e distribuição de tamanhos por espalhamento de luz (QLS) e tensão superficial com o tempo.

Tabela 1: Composições dos lipossomas preparados pelo método de hidratação de filme seco de lipídios.

Formulações	Proporção (Mol%)
1. DMPC	100
2. DMPC: C ₁₂ E ₅	88:12
3. DMPC: C ₁₂ E ₅	60:40
4. DMPC:PEG8L	80:20
5. DMPC:PEG8L	60:40
6. DMPC:PEG8L	30:70
7. DMPC:PEG4L	60:40
8. DMPC:PEG4DL	60:40
9. DMPC:PEG8DL	60:40
10. DMPC: Sacarose	60:40
11. EpK	100
12. EpK:C ₁₂ E ₅	88:12
13. EpK:PEG8L	60:40
14. PC ovo	100
15. PC ovo:PEG8L	60:40

4.2.2 Homogeneização do tamanho das vesículas

A homogeneização do tamanho das vesículas foi feita pelo método de extrusão, em membranas de policarbonato de poros com diâmetro nominal de 100nm. No ensaio foram usadas duas membranas de policarbonato sobrepostas, colocadas sobre um disco de dreno. Foi utilizada extrusora de aço inox modelo

T.001 da Lipex Biomembranes Inc., com capacidade para um volume de 10mL, com camisa térmica para circulação de água aquecida a uma temperatura acima da transição de fases dos lipídios, sob pressão constante de nitrogênio de aproximadamente 10 Kgf/cm². Os lipossomas preparados conforme descrito no parágrafo anterior, foram inicialmente mantidos em repouso por 30 minutos, para atingir o equilíbrio, antes da extrusão. Em seguida, 10 mL da dispersão lipossomal foi aplicada sobre as membranas e deixada em repouso por mais 3 minutos para o equilíbrio da temperatura antes de iniciar a extrusão. As amostras foram extrudadas por 15 vezes consecutivas, a fim de se obter homogeneidade de tamanho das vesículas (Ribas 1997).

4.2.3 Caracterização dos lipossomas

4.2.3.1 Dosagem do teor total de fosfolipídios

Os lipossomas foram caracterizados em relação à concentração molar de fosfolipídios quantificada através do fosfato (PO_4^{3-}) em solução. O ensaio baseiou-se no método desenvolvido por Chen *et al.* (1956). Primeiramente foi feita a digestão das cadeias de ácido graxo a carbono elementar, utilizando ácido sulfúrico. Em seguida foi adicionado peróxido de hidrogênio livre de fosfato para garantir a oxidação total dos carbonos em dióxido de carbono (CO_2). O fósforo foi então transformado em ortofosfato pelo molibdato de amônio, o qual foi reduzido pelo ácido ascórbico, resultando em um complexo de coloração azul, determinado colorimetricamente. O mesmo procedimento foi feito para soluções padrões com concentrações conhecidas de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,50, 1,00, 0,76, 0,50 e 0,26mM) e para solução isenta de fosfato (branco).

No procedimento adotado, adicionou-se em cada tubo de ensaio 2 esferas de vidro para melhorar a distribuição de calor durante o aquecimento, e a seguir 100 μL das amostras, padrões e branco foram inseridas juntamente com 500 μL de solução de ácido sulfúrico 10N. Os tubos foram aquecidos em placa térmica (Fisatom) a 200°C por 30 minutos. Em seguida foram resfriados até a temperatura

ambiente (25°C) e adicionados 165µL de peróxido de hidrogênio isento de fosfato, sendo reaquecidos em 200°C por mais 30 minutos. Novamente após resfriamento à temperatura ambiente foram adicionados 4mL de água Milli-Q, 500µL de uma solução 2,5% de molibdato de amônio ((NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O) e 500µL de uma solução 8% de ácido ascórbico (C₈H₈O₆). A seguir os tubos foram aquecidos em água fervente por 7 minutos, promovendo o aparecimento da cor azul. A intensidade de cor foi medida à temperatura ambiente (25°C) em espectrofotômetro a 830nm.

No Anexo I (Figura 51) é apresentada a curva de calibração utilizada para dosagem do teor de fosfato dos lipossomas.

4.2.3.2 Medida da tensão superficial e determinação da concentração micelar crítica

A tensão superficial foi determinada pelo método Wilhelmy do tipo placa, em tensiômetro do tipo Krüss K12. Amostras de 10mL foram colocadas em Becker de vidro de 20mL (25°C).

A tensão superficial foi determinada pela Eq.11.

$$\sigma = \frac{P_w}{Lb \cdot \cos\theta} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde : σ = tensão superficial, P_w = Força, Lb = molhabilidade do líquido e θ = ângulo de contato.

A Figura 16 representa de maneira esquemática a medição da tensão superficial de líquidos pelo método Wilhelmy do tipo placa.

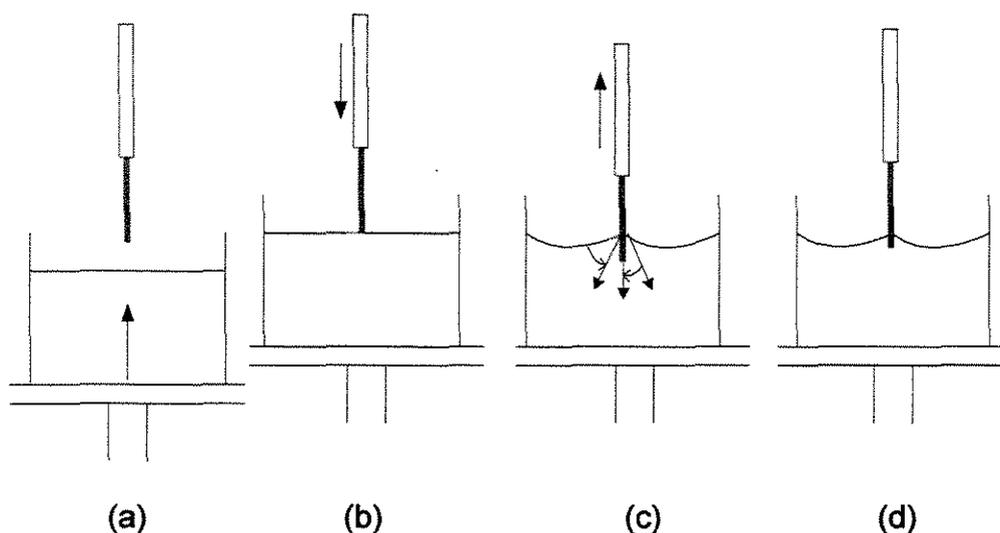


Figura 16: Representação esquemática das etapas da medida da tensão superficial utilizando o método da placa. (a) placa de platina e amostra (b) e (c) imersão da placa na solução e (d) retorno da placa a posição inicial.

A CMC dos tensoativos foi determinada graficamente pela intersecção das duas retas traçadas a partir os dados experimentais de tensão superficial em função da concentração de tensoativos na solução.

4.2.3.3 Curva de calibração na presença de lipossomas vazios

Inicialmente foi feita uma curva de calibração da tensão superficial *versus* concentração molar de tensoativo. As soluções utilizadas foram preparadas a partir de uma solução mãe com concentração conhecida e feitas sucessivas diluições, na faixa de 1 a 50 mol%. As leituras foram feitas em triplicata, na presença de lipossomas vazios de fosfatidilcolina na concentração 1mM e em intervalos de tempos muito curtos (até 5 minutos), de modo a não haver incorporação significativa do tensoativo na bicamada lipídica durante o ensaio e garantir a reprodutibilidade dos dados. Assim, o maior valor da tensão superficial, aproximadamente 50mN/m, foi correspondente à solução de lipossomas vazios na ausência do tensoativo. O valor da tensão superficial média, foi calculado pela

média aritmética das 3 medidas, como também o seu desvio padrão. A concentração molar de tensoativo na solução externa aos lipossomas, C_e , foi determinada através da faixa abaixo da CMC que foi considerada como curva de calibração (faixa de linearidade) para a determinação da incorporação dos tensoativos na bicamada lipídica dos lipossomas.

4.2.3.4 Determinação da concentração de tensoativos incorporada na bicamada lipídica

A tensão superficial dos lipossomas elásticos foi feita após diluição das soluções para se atingir a região abaixo da CMC de todos os tensoativos. A concentração de lipídios foi corrigida para 1mM pela adição de lipossomas vazios. A concentração de tensoativos foi determinada utilizando a curva de calibração previamente construída. A concentração real de tensoativo externo aos lipossomas (C_e) foi, então, corrigida pelo fator de diluição.

A partir destes dados, a concentração molar de tensoativo incorporado na bicamada lipídica, C_i , foi determinada pela relação (Eq. 12):

$$C_i = C_t - C_e \quad (\text{Eq. 12})$$

onde C_t é a concentração molar total de tensoativo na solução. A quantidade de tensoativo incorporada, C_i , foi expressa em termos de percentagem da concentração total de tensoativo na solução pela Eq. 13.

$$C_i^* = \left(1 - \frac{C_i}{C_e}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

Nas amostras estocadas, as tensões superficiais dos lipossomas foram monitoradas em intervalos de tempos durante 20 dias, a fim de verificar o

comportamento de incorporação dos tensoativos na bicamada lipídica. Os resultados foram expressos em termos de percentagem incorporado para a concentração total de lipídios 1mM.

4.2.3.5 Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das vesículas

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas foram caracterizados através de espalhamento de luz utilizando um laser, através da metodologia “quasi elastic light scattering” (QLS) descrito por New (1990) em equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer modelo 4700, fabricado pela Malvern Instruments e acoplado a um sistema de aquisição de dados analisados com o software PCS 4700.

Esta técnica baseia-se na determinação do coeficiente de difusão (D), devido ao movimento Browniano das partículas no meio, o qual está relacionado com o tamanho das vesículas pela equação de Stokes–Einstein (Eq. 14):

$$D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta R} \quad (\text{Eq. 14})$$

onde: κ = constante de Boltzmann, T = temperatura absoluta, R = raio das vesículas e η = viscosidade da solução dispersante

As medidas foram feitas a um ângulo de 90°C em relação ao feixe de luz incidente (laser He-Ne). As amostras foram diluídas com tampão HEPES (10mM e pH 7,4) para reduzir a turbidez das dispersões.

A Figura 17 apresenta de modo esquemático a realização de medidas do raio hidrodinâmico e distribuição de vesículas em dispersão coloidal.

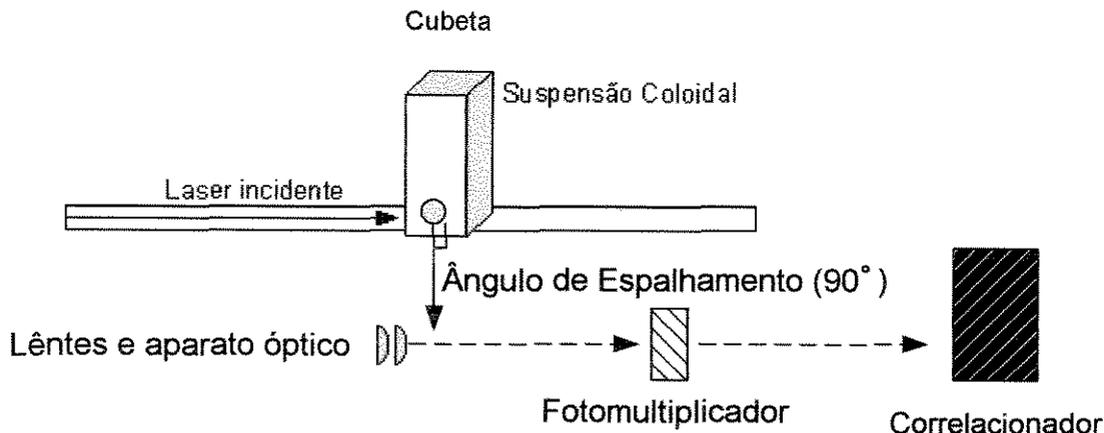


Figura 17: Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho das vesículas por espalhamento de luz.

Através do software acoplado à aquisição de dados do equipamento, são fornecidos dados referentes à distribuição de tamanhos, a confiabilidade da medida e a polidispersidade da amostra.

4.2.3.6 Calorimetria exploratória de varredura

A temperatura de transição de fases (T_m) e a variação de entalpia (ΔH) das vesículas lipídicas convencionais e contendo tensoativos foram determinadas através de calorimetria exploratória utilizando termogramas de microDSC ("MicroDifferential Scanning Calorimetry") (Microcalorímetro VP-DSC, Microcal Inc.), com o objetivo de identificar as interações entre lipídios e tensoativos. Amostras de 500 μ L da dispersão lipossomal 5mM, recentemente preparadas, foram adicionadas à cápsula de titânio sendo, posteriormente, fechada hermeticamente e submetida à calorimetria, em rampa de aquecimento de 10°C/hora, na faixa de 0 a 40°C, utilizando tampão HEPES (10mM, pH 7,4) como referência. Foram realizadas 3 varreduras para cada amostra.

4.2.3.7 Estabilidade dos lipossomas durante estocagem

A estabilidade física dos lipossomas preparados juntamente com tensoativos foi avaliada através da variação de tamanho das vesículas com o tempo, determinados por medidas de espalhamento de luz.

4.2.3.8 Determinação dos espectros de RPE

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos em espectrômetro Bruker ER200D-SRC, a temperatura ambiente (25°C) em celas planas de quartzo. As medidas foram feitas após 10 e 180 minutos da adição do tensoativo PEG8L aos lipossomas marcados.

O paramagnetismo natural dos materiais biológicos é muito baixo e, por isso, é comum a incorporação física de marcadores de spin nas membranas, micelas ou proteínas para estudos de RPE.

Neste trabalho utilizou-se o marcador de spin 5-doxil estearato (5-SASL, Figura 10) que foi previamente solubilizado em clorofórmio utilizando tubos de ensaio, seguido da evaporação do solvente e re-suspensão em 100 μ L de tampão Hepes, pH 7,4, sob agitação constante durante 30 minutos. Os lipossomas (preparados de acordo com os itens 4.2.1 e 4.2.2.) foram adicionados aos tubos de ensaio contendo o marcador em presença de tampão Hepes e agitados durante por mais 60 minutos em vortex para máxima incorporação do 5-SASL à bicamada lipídica. A quantidade de marcador adicionada às amostras foi de 1Mol% com relação aos lipídios totais.

Para o cálculo do parâmetro de ordem foi utilizada a Eq. 7.

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \left[\frac{(A_{xx} + A_{yy})}{2} \right]} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde, $A_{//}$ e A_{\perp} são medidos diretamente no espectro de RPE. A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os principais componentes do tensor hiperfino, medidos em monocristal, e tem os valores constantes de 32, 6 e 6, respectivamente (Schreier *et al.*, 1978).

Para a obtenção dos espectros o número e velocidade de scans e amplitude de modulação foram ajustados para que a distorção dos espectros fosse evitada.

4.2.3.9 Estimativa da elasticidade e deformação dos lipossomas

A elasticidade dos lipossomas foi estimada através de ensaios *in vitro* em membranas de policarbonato com poros regulares.

Para a realização dos ensaios utilizando membranas de poros regulares, a extrusora, descrita no Item 4.2.2, foi utilizada juntamente com membranas de policarbonato com poros de diâmetros nominais de 50 ou 30nm colocadas sobrepostas sobre um disco de dreno.

Nos ensaios iniciais apenas uma membrana foi usada. Visando maior sensibilidade do método, os ensaios posteriores foram realizados com duas membranas sobrepostas.

Os fluxos das amostras compostas pelos lipídios estruturais EpK e DMPC preparados juntamente com os tensoativos foram determinados utilizando 5mL das formulações com diferentes concentrações molares (1mM e 5mM) em extrusora a 37°C (acima da temperatura de transição de fase), sob baixa pressão (2,5psi), simulando a pressão osmótica da pele durante um tempo máximo de 10 minutos e utilizando como meio poroso membranas com poros nominais de 50nm (Van der Bergh *et al.*, 2001).

Da mesma forma, para a avaliação da capacidade de permeação dos lipossomas compostos por PCovo incubados com tensoativo PEG8L na proporção 60:40 mol% durante 1 hora, 2,5mL da dispersão coloidal foram adicionados em extrusora contendo como meio poroso duas membranas sobrepostas de policarbonato com diâmetro nominal de 30nm sendo submetida a diferentes pressões que variaram de 2,5 a 20psi.

O volume permeado de todas as amostras submetidas à pressão foi medido em proveta graduada durante o tempo máximo cronometrado, de 10 minutos. Os ensaios foram feitos em triplicata (Eq. 15).

$$J = \frac{V_p (mL)}{t(\text{min})} \quad (\text{Eq. 15})$$

onde: J = fluxo, V_p = volume permeado, t = tempo de permeação.

O módulo da elasticidade à passagem através dos poros da membrana foi determinada conforme a Eq. 5 descrita no item 3.4.1.1, proposta por Cevc e Blume, 1992, e utilizada por Van den Berg *et al.*, 1999 e 2001 e Bouwstra *et al.*, 1999.

$$E \cong J \left(\frac{dv}{dp} \right)^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde J é o fluxo obtido através da extrusão dos lipossomas em membrana de policarbonato, dv , é o diâmetro médio dos lipossomas antes da extrusão e dp é o diâmetro do poro da membrana de policarbonato utilizada.

A deformação percentual dos lipossomas (D_L %) foi estimada pela diferença entre os valores dos diâmetros médios dos lipossomas antes, d_1 , e após, d_2 , a passagem através das membranas, como mostra a Eq. 16.

$$D_L = \left(\frac{d_1 - d_2}{d_1} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 16})$$

Ensaio *in vitro* foram realizados em célula de difusão de Franz modificada (Hanson Corporation) (Figura 18) utilizando membranas naturais (pele de orelha de porco) as quais possuem poros irregulares. O ensaio foi do tipo oclusivo e as condições empregadas para a realização deste ensaio estão apresentadas no Quadro 4. Os diâmetros médios das vesículas lipídicas foram medidos após a permeação em Célula de Franz modificada. Foram retiradas alíquotas de 0,5 em intervalos de tempo de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 horas.

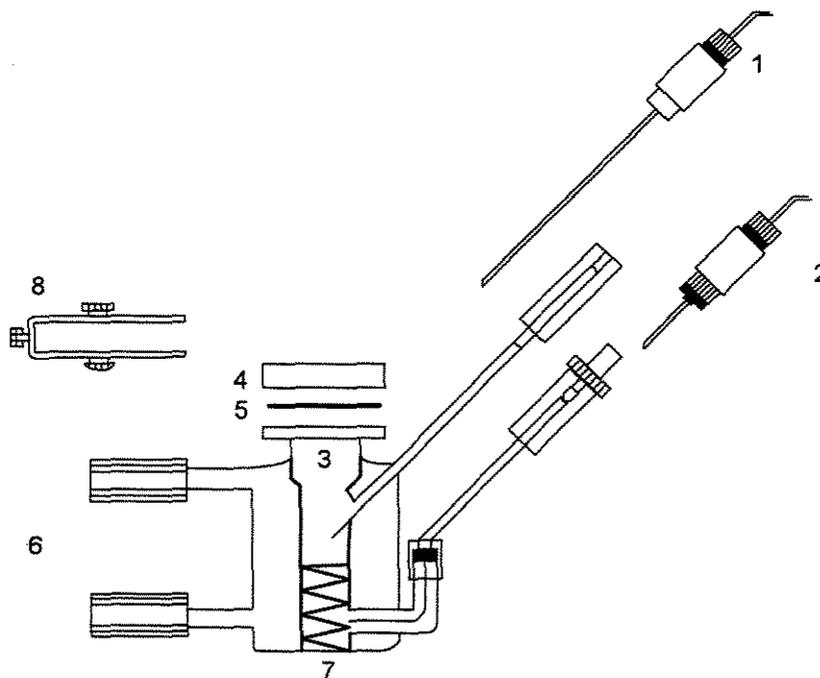


Figura 18: Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz modificada. 1. Seringa utilizada para reposição da solução receptora, 2. Seringa coletora de amostras, 3. Compartimento onde a amostra irá ser coletada após permeação, 4. Disco de teflon, 5. Membrana natural, 6. Conectores que ligam a célula de Franz ao sistema de aquecimento, 7. Hélice (mantém o sistema homogêneo) e 8. Grampo que fixa a membrana natural à célula de Franz.

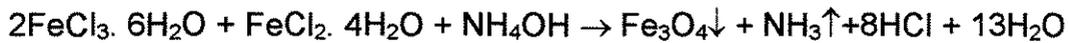
Quadro 4: Condições empregadas para realização de experimentos utilizando membrana natural com poros irregulares em célula de Franz modificada.

Condições experimentais	
<i>Solução receptora</i>	NaCl 0,9%
<i>Volume de amostra para permeação</i>	300 μ L
<i>Área de permeação</i>	1,77cm ²
<i>Membrana de permeação</i>	pele de orelha de porco dermatomizada
<i>Volume de amostra coletada</i>	1,5 mL
<i>Volume de amostra repostado na célula após coleta</i>	1,5 mL
<i>Volume da célula de difusão</i>	7mL
<i>Agitação constante</i>	300rpm
<i>Temperatura constante</i>	37°C

4.2.4 Síntese e estabilização da magnetita coloidal

A magnetita coloidal, ou ferrofluido, usada na preparação dos magnetolipossomas, foi composta de partículas de magnetita estabilizadas em dispersão coloidal. A preparação do ferrofluido foi baseada no trabalho desenvolvido por Reimers e Khalafalla (1976), com modificações introduzidas por Martins (1998) e Rocha *et al.* 2001. O método consiste na síntese da magnetita e dispersão das partículas em meio aquoso. A Figura 19 apresenta um esquema da rota de síntese e estabilização do ferrofluido com o ácido láurico.

- Co-precipitação dos cloretos de Ferro



- Estabilização da magnetita com o ácido láurico

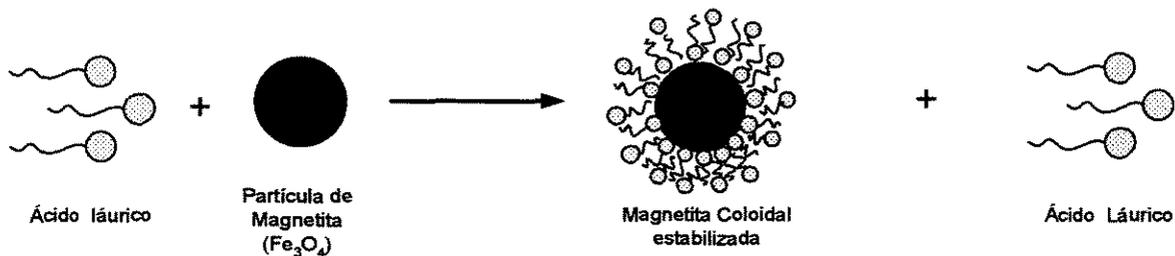


Figura 19: Representação esquemática da síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico (Adaptação de Pinho, 2000).

4.2.5 Caracterização da magnetita coloidal

O fluido magnético coloidal (diâmetro médio 8,75nm de acordo com Martins, 1998) foi caracterizado quanto à dosagem do teor de ferro nas dispersões.

4.2.5.1 Dosagem do teor de Ferro

Após a preparação do ferrofluido, a dosagem do teor de ferro foi feita de acordo com a metodologia proposta por De Cuyper e Joniau (1992) e Yoe e Jones (1944), com adaptações introduzidas por Martins (1998). A metodologia baseia-se na conversão inicial dos óxidos de ferro em sais de ferro pela reação com água régia e formação de um complexo de cor vermelha formado por catecato sulfonado de sódio (Figura 20) com o TIRON.

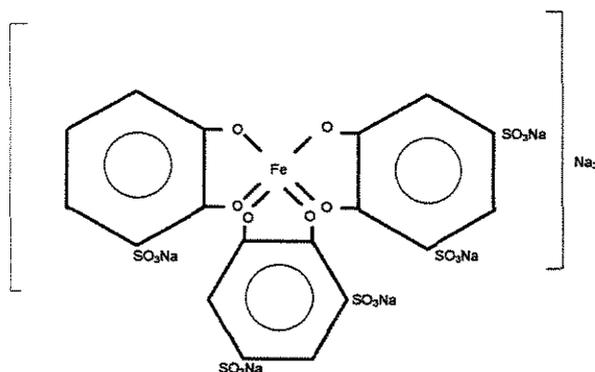


Figura 20: Fórmula estrutural do complexo vermelho (catecato sulfonado de sódio) formado pela reação do ferro III com o Tiron (Yoe e Jones, 1944).

Inicialmente foi preparada a solução de água régia, constituída de HCl/HNO₃ na proporção volumétrica 3/1, a 5M de HCl. Os óxidos de ferro foram convertidos a sais de ferro pela adição de 200µL de água régia a 500µL da dispersão coloidal de magnetita e incubados por 2,5 horas. Logo após, foi realizada a adição rápida de 100µL de solução de TIRON 0,125M e 500µL de KOH 4N, objetivando aumentar o pH do meio e favorecer a formação do complexo colorido. A este complexo, foi adicionado, também rapidamente, 1000µL de tampão fosfato 0,2M com pH 10 e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 480nm. Para a curva de calibração foram utilizadas soluções com concentrações de ferro que variaram de 20 a 140 ppm.

No Anexo I (Figura 58) é apresentada a curva de calibração utilizada para dosagem do teor de ferro nos magnetolipossomas e nos lipossomas elástico-magnéticos.

4.2.6 Preparação dos magnetolipossomas e dos lipossomas elástico-magnéticos

A preparação dos magnetolipossomas foi feita pelo método de Bangham,

(New, 1990) através da hidratação do filme seco de lipídios, com posterior sonicação utilizando um micro-tip de titânio em equipamento Vibra Cell, Sonics & Materials, INC. Danbury, USA) (Pinho, 2000) para homogeneização do tamanho das vesículas (Lasic, 1993).

Os fosfolipídios estocados a 0°C foram inicialmente trazidos à temperatura ambiente (25°C), pesados de acordo com a composição pretendida (Tabela 2). Os fosfolipídios foram solubilizados com 10mL de uma solução 9:1 de clorofórmio/metanol (v/v) e homogeneizados durante 5 minutos em evaporador rotatório, sendo, posteriormente, promovida à evaporação do solvente sob vácuo (650mmHg) com temperatura acima da transição de fases do lipídio (T_m 23°C) até a formação do filme seco. Na etapa de hidratação do filme seco foram adicionados 10mL de magnetita coloidal a 33°C.

Tabela 2: Composições dos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de filme seco de lipídios.

Formulações	Mol%	Concentração inicial de Magnetita coloidal (ppm)
1. DMPC:PEG8L	60:40	650
2. DMPC:PEG8L	60:40	412,5
3. DMPC:PEG8L	60:40	165
4. DMPC:PEG8L	60:40	2300
5. DMPC:PEG8L	100:0	2300

As formulações de 1 a 3, descritas na Tabela 2, foram preparadas solubilizando PEG8L juntamente com o fosfolipídio na solução 9:1 de clorofórmio/metanol (v/v) citada acima. As formulações 4 e 5 foram preparadas contendo apenas fosfolipídio, sendo que na formulação 4 foi adicionado o

tensoativo após a formação dos magnetolipossomas formando os lipossomas elástico-magnéticos. Medidas do espalhamento de luz da dispersão a 340nm, diâmetro e distribuição de tamanhos por espalhamento de luz (QLS) e tensão superficial foram feitas para acompanhamento da incorporação do tensoativo durante o intervalo de tempo de 3 horas.

4.2.7 Homogeneização do tamanho das vesículas magnéticas

Os magnetolipossomas foram submetidos a várias condições de sonicação nas quais se variou o tempo e a intensidade de sonicação. O objetivo deste ensaio foi determinar a influência da intensidade e tempo de sonicação no diâmetro médio e na incorporação da magnetita coloidal. Amplitude de ondas de 20, 40 e 60V durante 10, 20, 30 e 40 minutos (em ciclos de 30 segundos) foram empregadas.

4.2.8 Caracterização dos lipossomas elástico-magnéticos

Os lipossomas elástico-magnéticos foram caracterizados quanto ao teor de lipídio total, percentagem de tensoativo incorporado, diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesículas, elasticidade e ferro de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.2.3.1, 4.2.3.4, 4.2.3.5, 4.2.3.9 e 4.2.5.1 respectivamente.

4.2.9 Separação dos fosfolipídios não-adsorvidos

As dispersões resultantes da sonicação foram submetidas ao sistema de magnetoforese de alto gradiente (MAG) para separação dos fosfolipídios não adsorvidos. MAG é constituído de um eletroímã convencional de pólo dividido projetado para induzir um campo magnético de cerca de 1,8T (maior que a

saturação do ferro), e alimentado por uma fonte de tensão estabilizada (5A e 60V). A distância entre os pólos é de 3,5mm. Neste espaço foi colocado um capilar de 1,5 mm recheado com lã magnética. O MAG (Figura 21) foi projetado e construído pelo Instituto de física da UNICAMP e utilizado nos trabalhos de Martins (1998) e Pinho (2000).

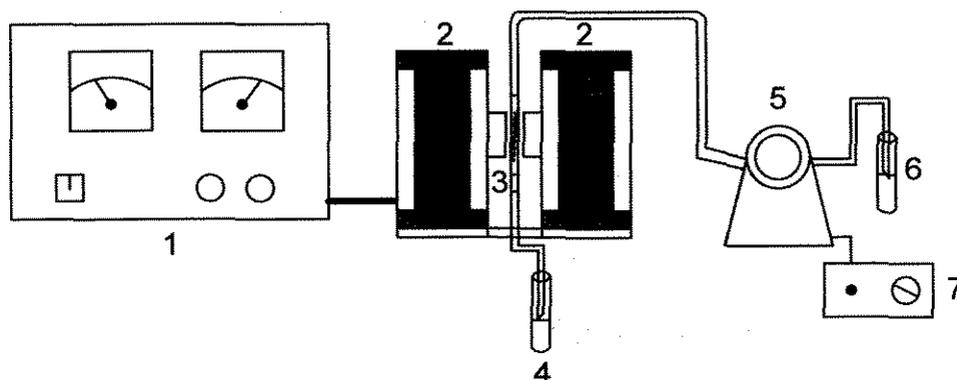


Figura 21: Representação esquemática do sistema de magnetoforese. 1 Fonte de tensão, 2. Eletroímãs, 3. Capilar recheado com lã magnética, 4. Tubo coletor de amostra separada em sistema de magnetoforese, 5. Bomba peristáltica, 6. Tubo contendo amostra a ser separada em campo e 7. Bomba de controle de velocidade.

As condições empregadas para a separação dos lipossomas vazios, ferro livre e magnetolipossomas no sistema de magnetoforese tiveram o controle de velocidade de retenção de 3mL/Hora, quantidade de lã magnética de $29,3 \pm 7,4$ mg e eluição das vesículas utilizando como solvente Tampão Heps, pH 7,4.

4.2.10 Montagem e calibração do sistema magnético de permeação.

O projeto e construção do sistema magnético foram feitos em parceria com grupo do Instituto de Física da UNICAMP. A Figura 22 mostra de modo

esquemático o sistema magnético de permeação utilizado.

A sua calibração foi feita através de medidas de corrente versus intensidade de campo magnético, utilizando medidor de campo magnético Mag Meter MGM-20 (Medidor digital de campo magnético) (Anexo III).

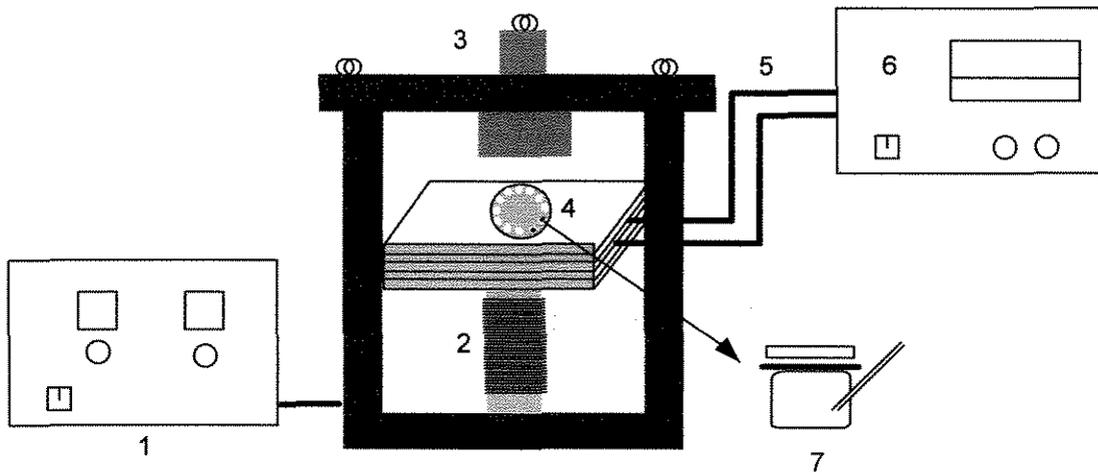


Figura 22: Sistema de permeação em membranas acoplado a um campo magnético. 1. Fonte de tensão, 2. Bobina geradora de campo magnético, 3. Direcionador de campo, 4. Banho aquecedor, 5. Mangueiras, 6. Controle do banho aquecedor e 7. Portas-amostra com volume de 40 μ L.

4.2.11 Ensaio de permeação de lipossomas magnéticos utilizando o sistema magnético.

Os ensaios foram feitos utilizando duas membranas de policarbonato sobrepostas ou pele animal. O ensaio foi do tipo não-oclusivo e as condições empregadas para a sua realização estão apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5: Condições empregadas para realização de experimentos utilizando membranas de polycarbonato e pele animal em sistema permeação com campo magnético.

<i>Solução receptora</i>	Água Milli-Q
<i>Volume de amostra para permeação</i>	15 μ L
<i>Área de permeação</i>	0,7 cm ²
<i>Membrana de permeação</i>	Membrana de polycarbonato (diâmetro de poros 50nm) e pele de orelha de porco dermatomizada.
<i>Volume de amostra coletada</i>	40 μ L
<i>Temperatura</i>	37°C
<i>Corrente</i>	5,4 A
<i>Campo Magnético</i>	355 mT
<i>Distância entre o pólo magnético superior e o porta-amostra</i>	0,2 mm

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação dos lipossomas

O rendimento do processo de produção de lipossomas convencionais e elásticos pelo método da hidratação do filme seco de lipídios com posterior extrusão foi cerca de 95 a 98%, calculado pela quantificação do teor de fosfolipídios descrito no item 4.2.3.1.

5.2 Caracterização dos lipossomas com incorporação do PEG8L durante preparação das vesículas

Nesses experimentos a incorporação dos tensoativos à bicamada lipídica foi feita durante a formação das vesículas de acordo o item 4.2.1 e, posteriormente, caracterizados através das variações no diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas, pela variação da percentagem incorporada calculada a partir de medidas da tensão superficial, interação lipídio/tensoativo (DSC), estabilidade física e elasticidade dos lipossomas.

5.2.1 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos

A determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas convencionais e elásticos, preparados com os lipídios DMPC e Epk e tensoativos C₁₂E₅, PEG8L, PEG8DL, PEG4L, PEG4DL e sacarose a diferentes composições forneceu os resultados que estão apresentados na Tabela 3.

As formulações com DMPC apresentaram menores polidispersidades do que as de Epk com a mesma composição, devido à maior fluidez das membranas

de DMPC.

Tabela 3: Diâmetro médio, percentagem populacional e polidispersidade de lipossomas convencionais (Epk e DMPC 100%) e elásticos (com lipídio e tensoativo).

Amostra (Mol%)*	Percentagem populacional (%)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
Epk (100)	100,0	115,2	0,130
DMPC (100)	100,0	126,8	0,091
Epk:C ₁₂ E ₅ (88:12)	100,0	135,5	0,450
DMPC :C ₁₂ E ₅ (88:12)	100,0	127,2	0,066
DMPC :C ₁₂ E ₅ (60:40)	92,0	135,1	0,499
	8,0	986,7	
DMPC: PEG 4L (60:40)	81,8	57,0	1,000
	18,2	264,9	
DMPC: PEG8L (60:40)	80,4	181,4	0,553
	19,6	574,2	
DMPC: PEG 4DL(60:40)	100,0	116,2	0,274
DMPC: PEG 8DL (60:40)	100,0	94,3	0,163
	38,5	41,6	
DMPC: Sacarose (60:40)	40,1	124,9	0,939
	21,4	680,4	

*adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas.

Nas formulações contendo 40Mol% dos tensoativos C₁₂E₅, PEG4L e PEG8L foram observadas duas populações e, em consequência disso, a polidispersidade variou de 0,49 a 1,00. Apesar da população de menor diâmetro

sempre representar a maior percentagem, agregados da ordem de 600 a 1000nm, aproximadamente, estiveram presentes para PEG8L e C₁₂E₅. Dessa forma, pode-se inferir que a formação da população de maior diâmetro se deve à presença de agregados, constituídas de lipídio e tensoativo, em equilíbrio com os lipossomas na dispersão. A formação das micelas mistas é devida à menor capacidade de ancoramento dos tensoativos C₁₂E₅, PEG4L e PEG8L na bicamada lipídica, por possuírem somente uma cadeia hidrofóbica. As formulações com os tensoativos PEG4DL e PEG8DL, contendo duas cadeias hidrofóbicas e com maior capacidade de ancoramento na bicamada lipídica apresentaram distribuição unimodal com baixa polidispersidade.

A amostra contendo DMPC: Sacarose (60:40) apresentou três populações, sendo verificada uma rápida desestabilização quando estocadas (separação de fases).

Lipossomas preparados com diferentes concentrações molares de PEG8L foram analisados quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanhos, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.

Os resultados mostram que quando a concentração de tensoativo passou de 40 para 70% a percentagem da população de maior diâmetro cresceu de 19,6 para 33,3%, embora o seu diâmetro tenha sido reduzido. Estes resultados corroboram com a hipótese de formação de micelas mistas conforme discutido anteriormente, neste caso em maior proporção, devido à maior quantidade de tensoativo na formulação.

No Anexo II são mostrados gráficos representativos das medidas de diâmetro e distribuição populacional realizadas para os lipossomas com DMPC:PEG8L(100:0) (Figura 59) e DMPC:PEG8L(60:40) (Figura 60). O comportamento desses resultados está de acordo com Van den Bergh *et al.* (1999), embora os valores sejam diferentes devido à diferença nas proporções de tensoativo e na lecitina de ovo usada.

Tabela 4: Diâmetro médio, percentagem populacional e polidispersidade das amostras contendo PEG8L em diferentes concentrações molares.

Amostra (Mol%)*	Percentagem populacional (%)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
DMPC: PEG 8L(100:0)	100,0	126,8	0,091
DMPC: PEG 8L(80:20)	99,0	193,2	0,310
DMPC: PEG8L (60:40)	80,4	181,4	0,553
	19,6	574,2	
DMPC: PEG 8L (30:70)	66,7	137,0	0,583
	33,3	376,0	

*adição do tensoativo durante a preparação dos lipossomas.

5.2.2 Determinação da percentagem incorporada de tensoativos na membrana lipídica

A percentagem dos tensoativos incorporados na bicamada lipídica foi calculada conforme descrito no item 4.2.3.4. A Tabela 5 mostra os valores obtidos da concentração micelar crítica, CMC, dos tensoativos utilizados.

5.2.2.1 Determinação da CMC dos tensoativos em presença de lipossomas

A determinação da CMC para os tensoativos utilizados neste trabalho, em presença de lipossomas convencionais (1mM), foi feita através de medidas da tensão superficial *versus* a concentração dos tensoativos. No Anexo I são

mostradas as curvas obtidas (Figuras 52 a 57) destacando a região à baixa concentração de tensoativo (região linear), a qual foi usada posteriormente para a determinação da quantidade de tensoativo livre em solução (não incorporado na bicamada lipídica).

Comparando-se o valor da CMC obtida com dados da literatura (Hinze e Pramauro, 1993) para o $C_{12}E_5$ (CMC= 0,058mM), observa-se que a presença dos lipossomas convencionais não alterou significativamente a CMC desse tensoativo. Não foram encontrados dados na literatura referentes a CMC dos demais tensoativos utilizados neste trabalho.

Tabela 5: Concentração micelar crítica para os tensoativos em presença de lipossomas convencionais (1mM)

Tensoativo	CMC (mM)
$C_{12}E_5$	0,054
PEG4L	0,020
PEG8L	0,030
PEG4DL	0,041
PEG8DL	0,015

5.2.2.2 Percentagem incorporada de tensoativo

A Figura 23 apresenta a incorporação dos tensoativos $C_{12}E_5$ e PEG8L, utilizados na preparação dos lipossomas contendo Epk ou DMPC.

Observa-se na Figura 23 que a incorporação dos tensoativos em lipossomas de Epk foi em torno de 70%, pouca diferença foi observada quando o tensoativo usado foi o $C_{12}E_5$ ou o PEG 8L. Para os lipossomas com DMPC, cuja fluidez da bicamada lipídica é maior à temperatura ambiente (25°C) quando

comparada ao EpK, houve expressiva variação da incorporação com o tipo de tensoativo. Maiores percentagens de incorporação na ordem de 90% foram obtidas para o PEG8L.

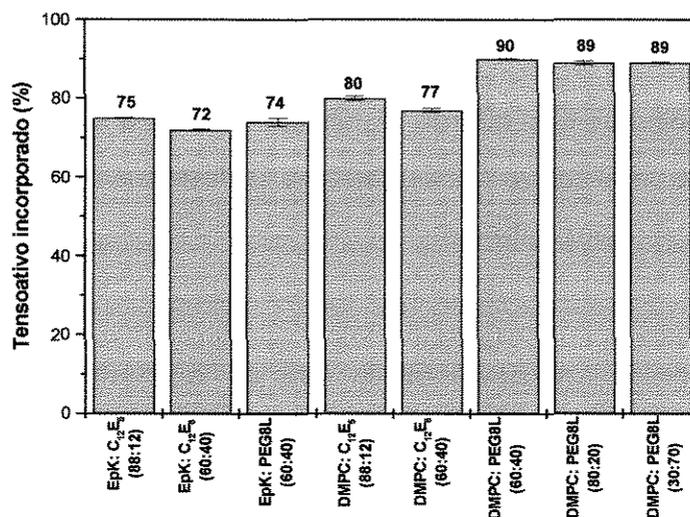


Figura 23: Percentagem de incorporação dos tensoativos na membrana lipídica dos lipossomas logo após a preparação.

A Figura 24 mostra percentagens de incorporação de tensoativos PEG4L, PEG4DL, PEG8L e PEG8DL maiores que 90% para todas as amostras formuladas com DMPC na composição 60:40 lipídio:tensoativo.

As formulações contendo 60:40 Mol% utilizando o lipídio DMPC teve a incorporação do tensoativo PEG8L bem maior que a mesma proporção utilizando EpK como lipídio estrutural.

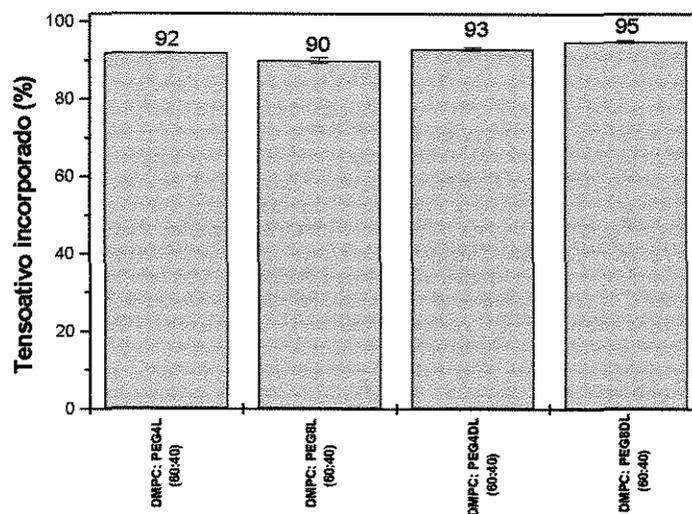


Figura 24: Percentagem de incorporação dos PEGs na membrana lipídica dos lipossomas logo após a preparação.

Comparando a percentagem de incorporação inicial dos vários PEGs observa-se que ela aumenta no sentido do PEG8L, PEG4L, PEG4DL e PEG8DL. Esse efeito é devido à maior capacidade de ancoramento na bicamada lipídica de PEGs com cadeias maiores ou com duas cadeias hidrofóbicas, em consequência do balanço de forças atrativas na bicamada e repulsivas entre as cadeias hidrofílicas do polímero na superfície dos lipossomas.

A Figura 25 apresenta a variação percentual de incorporação dos tensoativos durante a estocagem onde se pode observar que as maiores variações ocorreram para o PEG8L, o que está de acordo com a variação dos diâmetros das populações durante a estocagem, apresentados na Figura 28. Observa-se que com exceção do PEG8DL cuja saturação ocorreu a 95% de incorporação, todos os outros tensoativos foram totalmente incorporados (100% da sua quantidade inicial). Esses resultados implicam que a utilização de PEG8DL produz lipossomas aparentemente estáveis durante a estocagem, uma vez que o diâmetro médio permaneceu constante com o tempo.

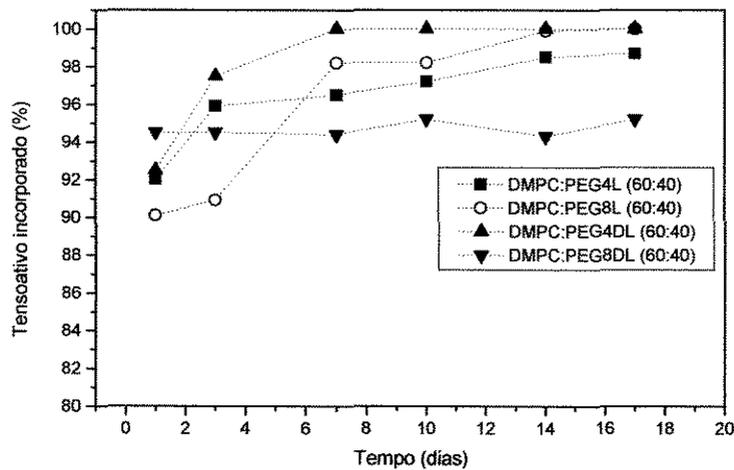


Figura 25: Percentagem de incorporação de tensoativos na bicamada lipídica durante a estocagem dos lipossomas elásticos (adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas).

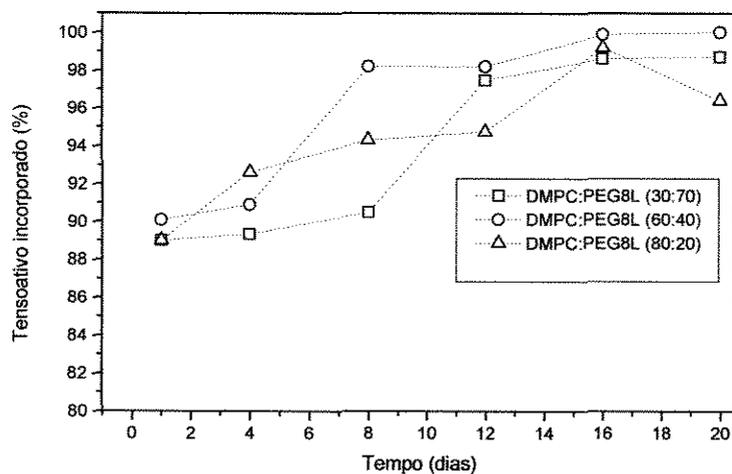


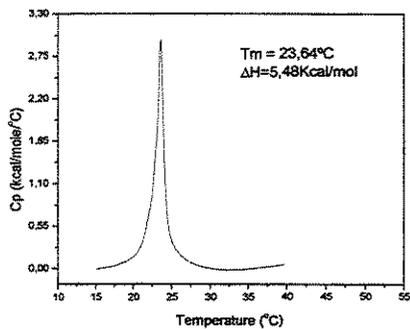
Figura 26: Percentagem de incorporação do tensoativo PEG8L (com diferentes concentrações iniciais: 20, 40 e 70Mol%) na bicamada lipídica durante a estocagem dos lipossomas elásticos (adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas).

Na Figura 26 é apresentada uma comparação da porcentagem de incorporação do tensoativo PEG8L durante a estocagem, para as várias concentrações iniciais (20, 40 e 70Mol%), sendo menor para a concentração de 20%, devido à ausência da população de maior tamanho, como pôde ser verificada na Tabela 4.

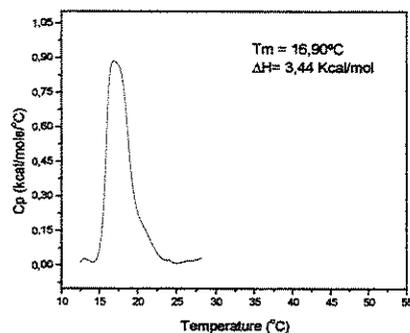
5.2.3 Análises da temperatura de transição de fases e entalpia

Na Figura 27.a observamos a alta pureza do DMPC devido ao aparecimento de um único pico fino no termograma ($T_m = 23^\circ\text{C}$).

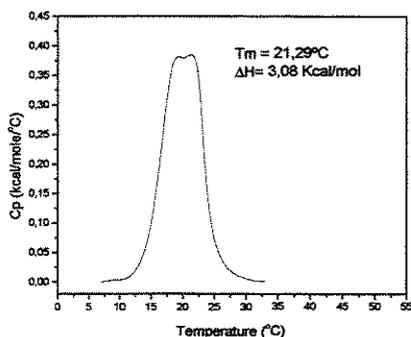
Os espectros de calorimetria exploratória de varredura evidenciam a incorporação do tensoativo na membrana pela redução da entalpia e temperatura de transição de fases como pode ser observado na Figura 27.b-f. Estes efeitos aparecem em conseqüência da maior fluidez das membranas lipídicas produzida pela presença dos tensoativos. As variações das referidas propriedades dependeram do tensoativo usado nas preparações, podendo-se verificar picos mais finos e únicos para os lipossomas preparados com C_{12}E_5 (Figura 27.b). Quando os PEGs foram usados, observa-se nos termogramas que a mudança de fases é mais gradativa (picos mais largos), havendo também formação de 2 picos, o que é mais evidente nos termogramas dos PEG8L e PEG8DL (Figuras 27.e e 27.f).



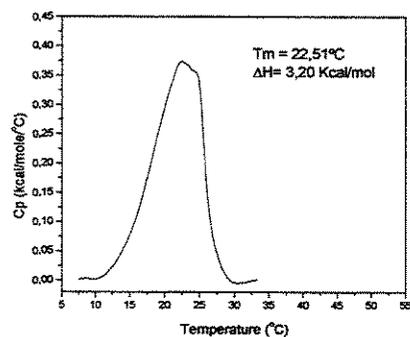
(a)



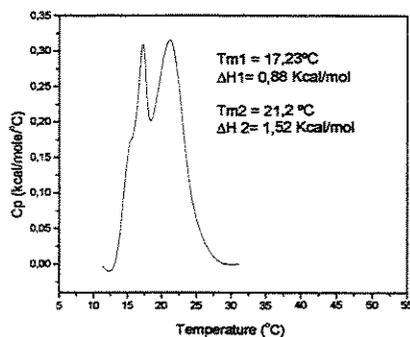
(b)



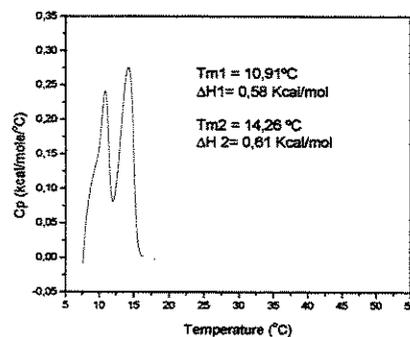
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 27: Espectros de DSC para lipossomas com DMPC:tensoativo (60:40). (a) DMPC, (b) DMPC:C₁₂E₅, (c) DMPC:PEG4L, (d) DMPC:PEG4DL, (e) DMPC:PEG8L, (f) DMPC:PEG8DL. Adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas.

A temperatura de transição de fases foi maior para o PEG4DL, quando comparada ao PEG4L, devido à maior capacidade de ancoramento do PEG4DL na bicamada, conforme já discutido nos dados sobre incorporação de tensoativos (Figuras 25 e 26).

Para os lipossomas preparados com PEG8L e PEG8DL, devido à maior perturbação causada na bicamada, as temperaturas de transição de fases são as menores obtidas. A presença pronunciada dos 2 picos se justifica pelas limitações impostas no balanço de forças da estrutura, causadas pelo maior tamanho da cadeia hidrofílica do PEG, resultando em vesículas menos empacotadas, o que facilita a saída mais rápida dos tensoativos da estrutura com o aumento da temperatura, produzindo a separação, além da transição de fases. Para tamanhos equivalentes de cadeia (C₁₂E₅ e PEG4L), a forma éter do lauril apresentou temperatura de transição de fases menor que a sua forma éster, indicando no último caso maior estabilidade das vesículas.

A Tabela 6 apresenta um resumo dos valores de temperaturas de transição de fases para os lipossomas preparados com os vários tensoativos. A ausência dos valores da entalpia para as preparações contendo PEGs se deve ao aparecimento dos dois picos nos termogramas.

5.2.4 Estabilidade física dos lipossomas

As amostras acondicionadas em geladeira a 10°C foram monitoradas por espalhamento de luz durante 13 dias quanto aos tamanhos das vesículas. O método utilizado está apresentado no item 4.2.3.7.

Tabela 6: Temperatura de transição de fases (T_m) e entalpias (ΔH) para as lipossomas contendo DMPC e diferentes tensoativos.

Amostra (Mol%)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)
DMPC (100)	23,64	5,48
DMPC:C ₁₂ E ₅ (60:40)	16,90	3,44
DMPC:PEG4L (60:40)	21,29	3,08
DMPC:PEG4DL (60:40)	22,51	3,20
DMPC:PEG8L (60:40)	17,23	0,88
	21,20	1,52
DMPC:PEG8DL (60:40)	10,91	0,58
	14,26	0,61

A Figura 28 apresenta o comportamento das vesículas durante o período de estocagem. Foi observado nos 4 primeiros dias alterações nos diâmetros para as amostras contendo PEG4L e PEG8L, com desaparecimento da população maior para as vesículas contendo PEG4L e aumento da população maior para as vesículas com PEG8L, devido à re-distribuição do tensoativo entre a bicamada lipídica e a solução. A partir do quarto dia, a maior população dos lipossomas compostos por PEG8L apresentou diâmetros entre 1200nm e 1800nm. Este aumento de tamanho, provavelmente é devido à incorporação do tensoativo livre. Os lipossomas compostos por PEG4DL e PEG8DL apresentaram variações de tamanho somente a partir do 10º dia de estocagem, devido à maior capacidade de ancoramento na bicamada e menor mobilidade, ambas produzidas pela presença das duas cadeias hidrofóbicas nestes tensoativos. Para a amostra contendo PEG8DL, pode-se ainda inferir que após 10 dias de estocagem ocorreu um provável rearranjo das moléculas de tensoativo e lipídio devido ao seu maior volume ocupado na bicamada que os demais tensoativos analisados.

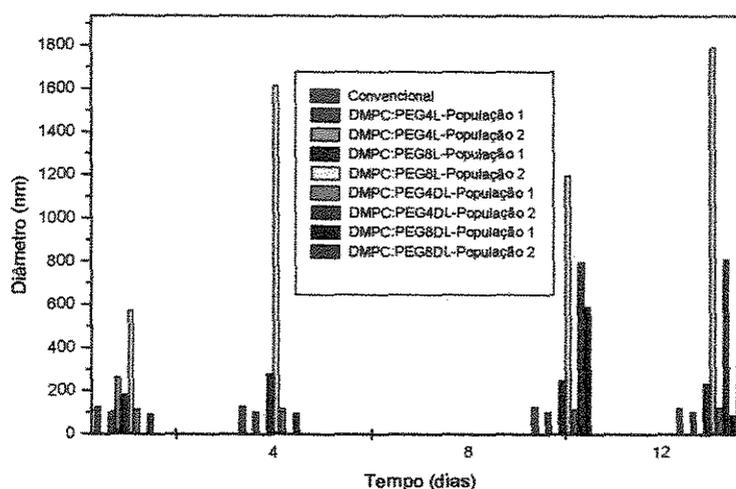
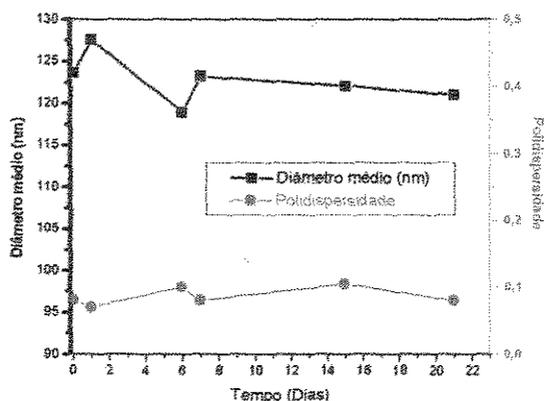


Figura 28: Perfis de estabilidade dos lipossomas convencionais (DMPC 100Mol%) e elásticos (DMPC:Tensoativo, 60:40) durante treze dias de estocagem. Concentração: 5mM. Temperatura:10°C. (adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas).

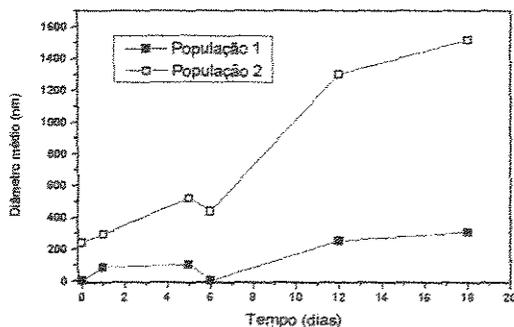
As Figuras 29.a e 29.b apresentam uma comparação entre a evolução das populações dos lipossomas estocados após a preparação. Praticamente não houve variação nos diâmetros dos lipossomas compostos somente de DMPC (Figura 29.a). Com a incorporação do tensoativo PEG8L a 40Mol% (Figura 29.b), ambas as populações geradas crescem com o tempo devido à incorporação de mais tensoativo presente na solução. Esse crescimento é mais acentuado para a população de maior diâmetro médio. Após o ensaio de elasticidade, no qual as vesículas são forçadas a passar através de 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sob baixa pressão, as variações no diâmetro foram semelhantes às das amostras anteriormente estocadas até 5 dias (Fig. 29.c). Após esse tempo não foi mais possível à obtenção de medidas coerentes por espalhamento de luz, indicando assim a desestabilização das estruturas. Observe-se na Figura 29.b que a população de menor diâmetro aparece após o primeiro dia de estocagem. Após a extrusão, há a formação de uma população maior, que atinge aproximadamente

800nm em 5 dias (Figura 29.c), indicando a agregação dos lipossomas com a conseqüente desestabilização observada.

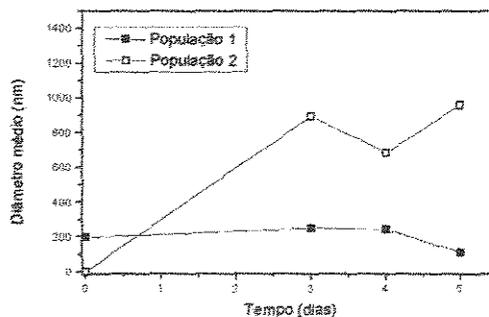
Esses resultados indicam que a dispersão de lipossomas contendo tensoativos tem estabilidade limitada com o tempo de estocagem.



(a)



(b)



(c)

Figura 29: Estabilidade durante a estocagem dos lipossomas convencionais (DMPC 100Mol%) e elásticos (DMPC:PEG8L, 60:40), determinados pela variação dos seus diâmetros. (a) Lipossomas com apenas DMPC armazenados logo após a preparação durante 25 dias. (b) Lipossomas com DMPC:PEG8L (60:40) armazenados após a preparação durante 15 dias. (c) Lipossomas com DMPC:PEG8L (60:40) armazenados após o ensaio de elasticidade (passagem em membrana com poros de 50nm). Concentração:5mM. Temperatura:10°C.

5.2.5 Fluxos e elasticidade dos lipossomas

A Tabela 7 apresenta os valores dos diâmetros dos lipossomas preparados com o tensoativo $C_{12}E_5$, medidos antes e após a permeação através de uma membrana de policarbonato de 50nm. Para os lipossomas com Epk não foi possível medir seus diâmetros nas soluções permeadas devido à baixa concentração de vesículas no líquido obtido. Isto significa que estes lipossomas não foram permeados representativamente através da membrana. Esse resultado já era esperado devido à alta temperatura de transição de fases deste lipídio, 65°C, estando portanto à temperatura de permeação (37°C), na fase gel. O fluxo medido na permeação foi, praticamente, devido à passagem da solução tampão através da membrana, uma vez que as vesículas ficaram retidas.

Para o DMPC, que tem a sua temperatura de transição de fases igual a 23°C, a fluidez da bicamada permitiu a sua passagem através da membrana com poros de 50nm. Observa-se que após a permeação houve variação do diâmetro das vesículas, embora não expressiva, devido aos efeitos da deformação.

Os resultados da permeação utilizando formulações compostas com DMPC e PEG na proporção molar 60:40 (5mM) com duas membranas sobrepostas estão apresentados na Tabela 8. Os valores dos diâmetros médios dos lipossomas preparados com os PEGs, medidos antes e após a permeação não sofreram mudanças expressivas com exceção da amostra contendo PEG4L. As populações maiores presentes nas amostras iniciais com PEG4L e PEG8L (264,9 e 574,2nm, respectivamente) não apareceram na dispersão permeada.

Os lipossomas com PEG8L e PEG8DL apresentaram maiores fluxos, provavelmente devido à maior perturbação causada pelo maior tamanho da cadeia hidrofílica do PEG, resultando em bicamadas mais fluidas e, conseqüentemente, mais deformáveis. Comparando os fluxos das amostras com PEG4DL e PEG4L, observamos que o valor obtido para o PEG4DL foi bem menor do que o PEG4L, que pode ser explicado pela menor fluidez da bicamada do PEG4DL, refletida anteriormente na sua maior temperatura de transição de fases, comparada aos

lipossomas contendo PEG4L (Tabela 8). Esses resultados mostram que a incorporação do PEG8DL é também promissora para a preparação de lipossomas elásticos, trazendo um benefício adicional que é o de maior estabilidade da membrana como verificado na Figura 28. Os trabalhos da literatura utilizam o colesterol ou sulfato de colesterol para conferir estabilidade aos lipossomas, porém com o comprometimento muito maior da fluidez da bicamada lipídica (Van den Bergh, 2001).

Tabela 7: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com C₁₂E₅ após passagem através de 1 membrana de policarbonato com poros de 50nm sobreposta a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5 psi.

Amostra (Mol%) *	D 1 (nm)	% popula- cional	D 2 (nm)	% popula- cional	Fluxo (mL/min)	PO ₄ ³⁻ (%)
Concentração inicial da dispersão:1mM						
EpK :C ₁₂ E ₅ (100:0)	115,20	100	—	—	0,05	1
EpK :C ₁₂ E ₅ (88:12)	135,50	100	—	—	0,08	1
EpK :C ₁₂ E ₅ (60:40)	195,20	100	—	—	0,11	1
DMPC:C ₁₂ E ₅ (100:0)	128,60	100	111,60	100	0,17	81
DMPC:C ₁₂ E ₅ (88:12)	124,61	100	103,70	100	0,76	87
DMPC:C ₁₂ E ₅ (60:40)	128,10	100	136,80	100	3,00	90
Concentração inicial da dispersão:5mM						
DMPC:C ₁₂ E ₅ (100:0)	128,60	100	109,50	100	0,08	65
DMPC:C ₁₂ E ₅ (60:40)	203,23	100	160,29	100	0,18	85

Onde: *: adição do tensoativo durante a preparação dos lipossomas.

D1: Diâmetros dos lipossomas antes da permeação e

D2: Diâmetros dos lipossomas após a permeação.

Tabela 8: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes PEGs após passagem em 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sobrepostas a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5 psi.

Concentração Inicial da dispersão: 5mM						
Amostra (Mol%)*	D 1(nm)	% popula- cional	D 2(nm)	% popula- cional	Fluxo (mL/min)	PO ₄ ³⁻ (%)
DMPC:PEG (100:0)	126,8	100	121,4	100	0,03	55
DMPC:PEG4L(60:40)	57,0	81,8	106,8	100	0,28	95
	264,9	18,2				
DMPC: PEG8L(60:40)	181,4	80,4	212,4	100	2,24	99
	574,2	19,6				
DMPC:PEG4DL(60:40)	116,2	100	110,4	100	0,08	42
DMPC:PEG8DL(60:40)	94,3	100	89,3	100	2,08	90

Onde: *: adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas.

D1: Diâmetros dos lipossomas antes da permeação e

D2: Diâmetros dos lipossomas após a permeação

Comparando os resultados obtidos das amostras formuladas com diferentes proporções molares de DMPC e PEG8L (Tabela 9), observa-se que a partir de 40Mol% de tensoativo os fluxos não sofrem modificações expressivas. No que se refere à percentagem permeada de fosfato, as amostras contendo PEG8L permearam eficientemente por duas membranas de policarbonato de 50nm não ocorrendo processo de filtração das vesículas. No entanto a amostra contendo apenas DMPC teve apenas 55% de fosfolipídio permeado em relação ao valor inicial. Esses resultados mostram que com o aumento da resistência à permeação, com utilização de duas membranas, a fluidez da bicamada devida somente à temperatura de transição de fases não é suficiente para uma permeação eficiente, sendo necessária também a presença do tensoativo na bicamada.

Tabela 9: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes proporções molares de PEG8L após passagem através de 2 membranas sobrepostas de policarbonato com poros de 50nm sobreposta a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5 psi.

Amostra (Mol%)	D 1 (nm)	% populacional	D 2 (nm)	% populacional	Fluxo (mL/min)	PO ₄ ³⁻ (%)
DMPC:PEG8L (100:0)	126,8	100	121,4	100	0,03	55
DMPC:PEG8L(80:20)	193,0	100	138,4	100	0,03	89
DMPC:PEG8L(60:40)	181,0	80,4	212,4	100	2,24	99
	574,2	19,6				
DMPC: PEG8L(30:70)	137,0	66,7	109,53	100	1,90	93
	376,0	33,3				

Onde: *: adição do tensoativo durante a preparação dos lipossomas.

D1: Diâmetros dos lipossomas antes da permeação e

D2: Diâmetros dos lipossomas após a permeação

Na Figura 30 são apresentados os valores de elasticidade e deformação obtidos para as preparações com DMPC e C₁₂E₅, sendo permeadas utilizando 1 membrana de policarbonato com poros de 50nm em duas concentrações distintas (1mM e 5mM). A elasticidade e a deformação foram calculadas a partir dos dados de diâmetros médios e fluxos utilizando as Eq. 5 e Eq. 16 (Item 4.2.3.9). Em todos os casos os diâmetros após a permeação foram menores, e, portanto os valores das deformações estão apresentados em módulo.

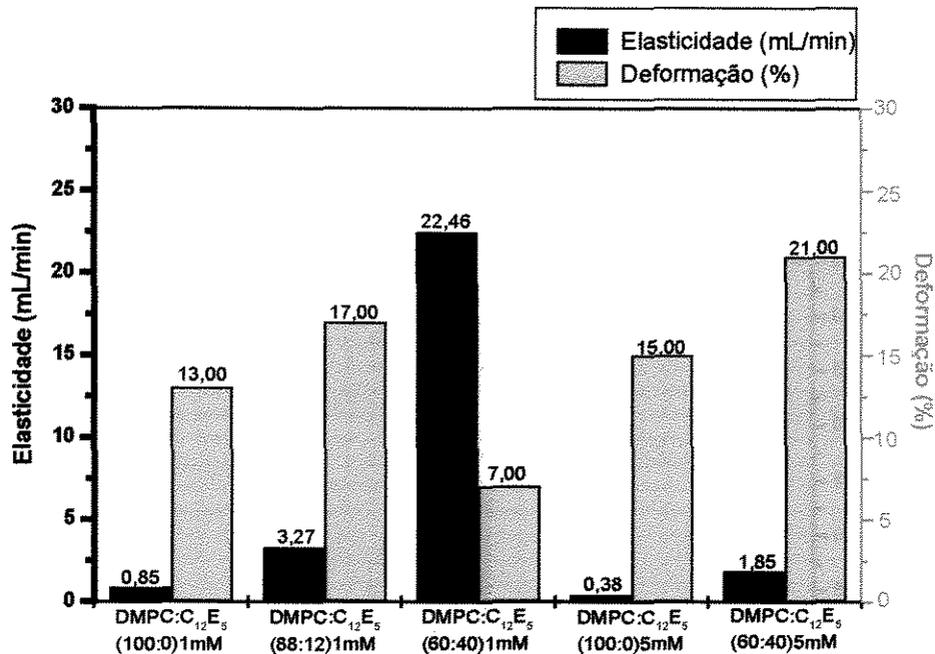


Figura 30: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC e C₁₂E₅ com diferentes proporções molares e em duas concentrações finais (1mM e 5mM). Meio poroso utilizado: 1 membrana de policarbonato com poros de 50nm sobreposta a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5psi. Adição do tensoativo durante a preparação dos lipossomas.

Nos experimentos realizados com lipossomas 1mM de concentração final, pode-se verificar, de acordo com a Figura 30, que a amostra com maior elasticidade contém 40Mol% de C₁₂E₅. Os resultados obtidos para amostras mais concentradas identificaram maior dificuldade de permeação, principalmente devido à redução do fluxo de ambas as amostras permeadas a 5mM. Em se tratando da deformação, foi observado alteração dos diâmetros médios determinados antes e depois da permeação variando de 7 a 21%.

A Figura 31 mostra que a elasticidade e a deformação para a amostra com 40Mol% de PEG8L apresentaram claramente melhores resultados que as demais. A deformação de todas as amostras variou de 4 a 18%. Estes resultados indicam

que o tensoativo PEG8L confere fluidez à membrana lipídica necessária à sua deformação durante a permeação, favorecendo a passagem em poros aproximadamente 4 vezes menores que o diâmetro inicial da vesícula.

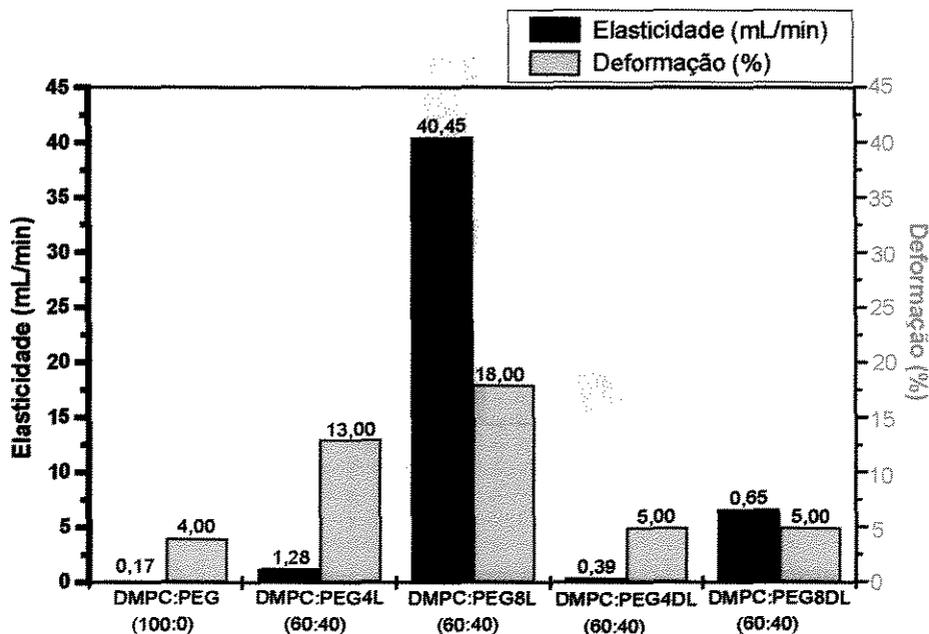


Figura 31: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC:PEG (60:40) após permeação através de 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sobrepostas a um disco de dreno. Concentração dos lipossomas: 5mM. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5psi. Adição dos tensoativos durante a preparação dos lipossomas.

Observa-se ainda na Figura 31 que os lipossomas com tensoativos PEG4L e PEG8L apresentaram deformações percentuais de 13 e 18%, enquanto que os lipossomas sem tensoativo e com PEG4DL e PEG8DL situaram-se em torno de 5%.

Comparando os resultados obtidos das amostras formuladas com diferentes proporções molares de DMPC e PEG8L (Figura 32), observa-se que, se aumentarmos a concentração do tensoativo de 40 para 70Mol%, quando há a

presença expressiva de micelas na dispersão, ocorre redução na elasticidade. A concentração de 40Mol% foi considerada a mais adequada para as formulações em estudo, tanto em termos de elasticidade quanto em termos da predominância de estruturas lipossomais (Figura 31). No que se refere à deformação percentual, há tendência de aumento da deformação quando a concentração de PEG8L passa de 40 para 70Mol%.

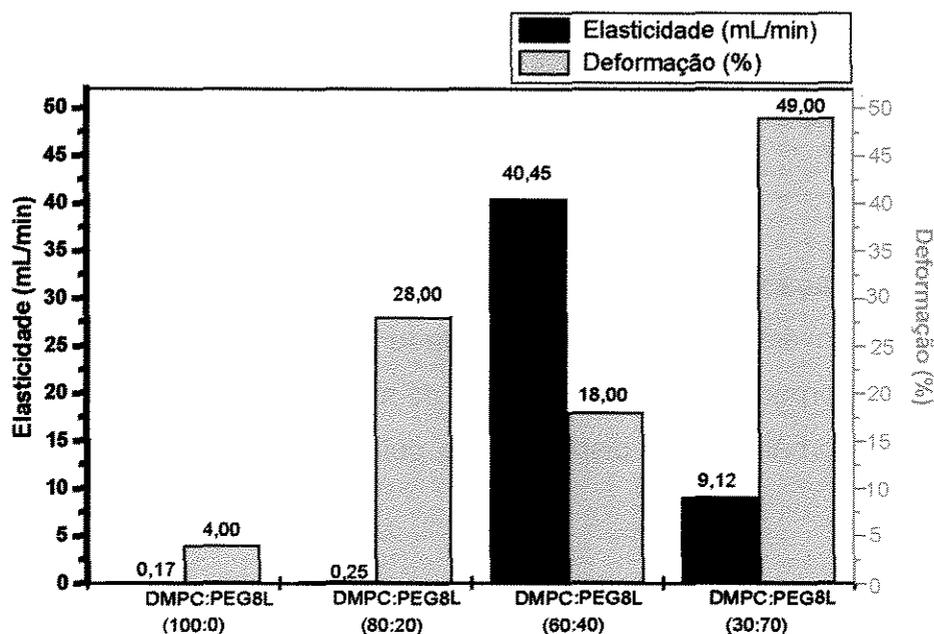


Figura 32: Elasticidade e deformação dos lipossomas compostos por DMPC:PEG8L com diferentes proporções molares (80:20, 60:40 e 30:70) após permeação em 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sobrepostas a um disco de dreno. Concentração dos lipossomas: 5mM. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5psi. Adição do tensoativo durante a preparação dos lipossomas.

No caso dos lipossomas com 20Mol% de PEG8L, a deformação percentual de 28% se deve às limitações na permeação refletindo-se na menor elasticidade, devido à menor concentração do tensoativo.

5.3 Caracterização dos lipossomas com incorporação do PEG8L em lipossomas pré-formados

Nestes experimentos o tensoativo PEG8L foi incorporado às vesículas pré-formadas, diferindo dos experimentos anteriores nos quais os tensoativos foram incorporados durante a preparação dos lipossomas.

5.3.1 Cinética de incorporação do tensoativo PEG8L em lipossomas de DMPC

A incorporação do tensoativo na bicamada lipídica foi caracterizada através das variações no diâmetro e polidispersidade das vesículas, pela variação da percentagem incorporada calculada a partir de medidas da tensão superficial, pela variação da absorvância das dispersões e pela determinação de parâmetro de ordem.

5.3.1.1 Diâmetro principal e polidispersidade

As Figuras 33.a-d apresentam as cinéticas de incorporação de diferentes proporções de PEG8L (20, 40, 54 e 70Mol%) em lipossomas convencionais (DMPC 100Mol%) incubados com durante o intervalo de tempo de 300 minutos, avaliadas pelas alterações no diâmetro principal e polidispersidade das vesículas. Observa-se em todas as situações que o diâmetro principal situa-se acima de 90% da população.

Os resultados apresentados nas Figuras 33.a e 33.d mostram que os diâmetros médios dos lipossomas incubados com 20 e 70Mol% de PEG8L não variaram significativamente durante as 5 horas de incubação. No entanto, as

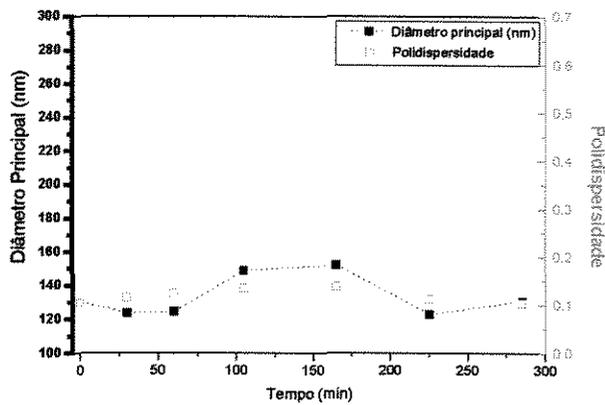
Figuras 33.b e 33.c mostram que a adição de 40 e 54Mol% de PEG8L nos lipossomas promoveram alterações de diâmetro, com variação de 90% quando comparado com seus valores iniciais. Nestas proporções o tensoativo foi capaz de se acomodar nas bicamadas e desorganizar o sistema e tornar a bicamada muito mais fluida.

A polidispersidade da composição DMPC:PEG8L (46:54) variou de 0,1 a 0,6 as demais praticamente se mantiveram estáveis ao longo do ensaio.

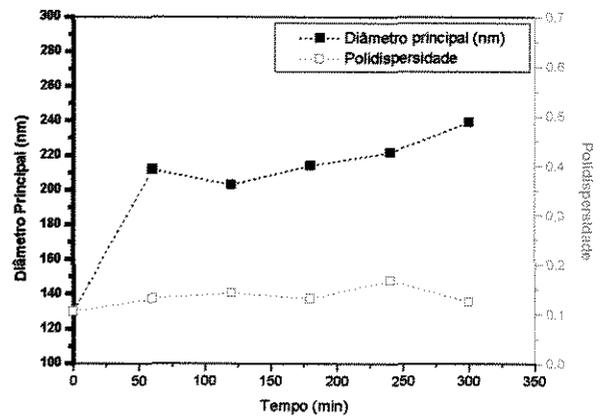
Estes resultados indicam que a incorporação do tensoativo em lipossomas na proporção molares 80:20 (DMPC:PEG8L) não produz alterações significativas no empacotamento da bicamada lipídica, ou no caso 30:70 (DMPC:PEG8L), as micelas formadas não aumentaram de tamanho com o tempo. Nas concentrações subseqüentes 60:40 e 46:54 (DMPC:PEG8L), observa-se crescimento acentuado dos lipossomas com a incorporação do tensoativo, e no último caso, também um aumento concomitante da polidispersidade. Apesar do aumento de tamanho dos lipossomas pela interação com o tensoativo, não se observa queda do diâmetro principal até 300 minutos, indicando que durante esse período predomina a estrutura vesicular, conforme perfis típicos de interação de tensoativos com lipossomas estudados por vários autores (Edwards e Almgren, 1991 e 1992, Moraes *et al.*, 1999 e Ribas, 1997).

5.3.1.2 Percentagem incorporada de tensoativo

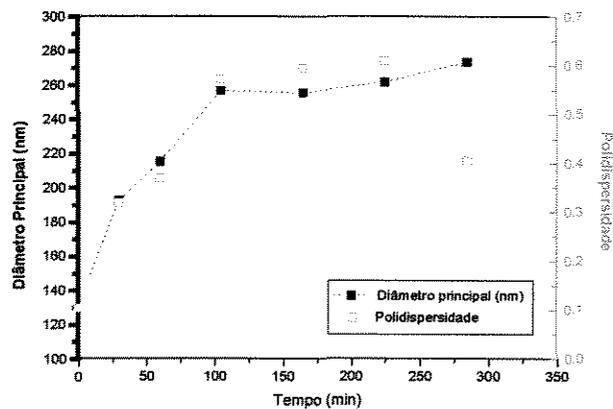
A percentagem de tensoativo incorporada em lipossomas convencionais contendo DMPC como lipídio estrutural foi calculada de acordo com o item 4.2.3.4. As Figuras 34. a-d apresentam as percentagens incorporadas de PEG8L e absorbâncias em função do tempo de incubação.



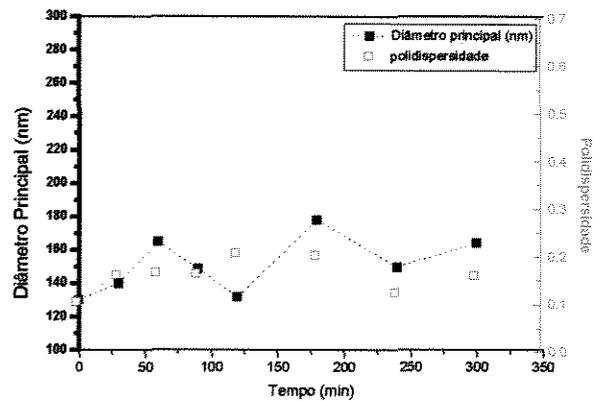
(a)



(b)

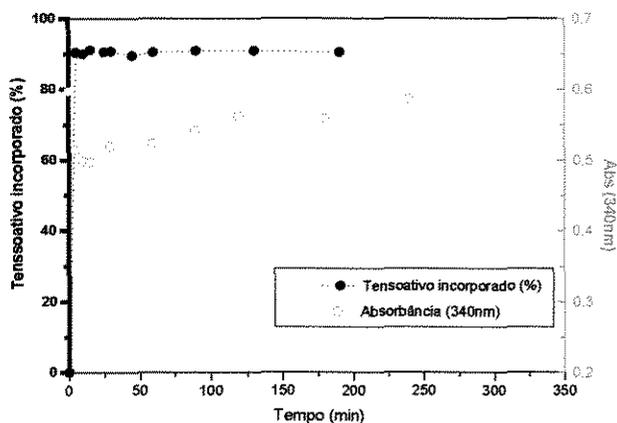


(c)

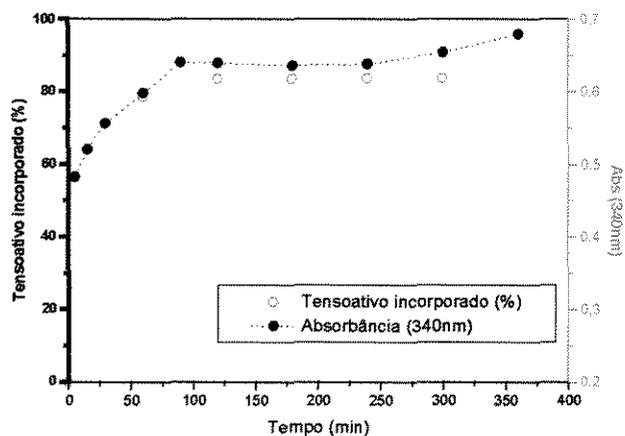


(d)

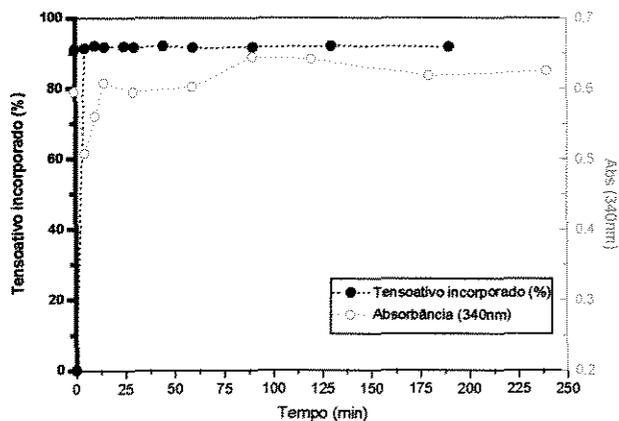
Figura 33: Cinética de incorporação de PEG8L em lipossomas convencionais compostos de DMPC avaliada através das variações no diâmetro médio e polidispersidade. Temperatura: 25°C. (a) DMPC:PEG8L (80:20) (b) DMPC:PEG8L (60:40), (c) DMPC:PEG8L (46:54) e (d) DMPC:PEG8L (30:70). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.



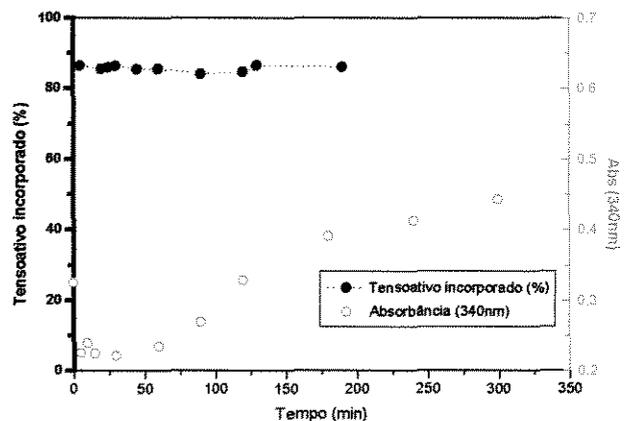
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 34: Cinética de incorporação de PEG8L em lipossomas convencionais compostos de DMPC avaliada através das percentagens de PEG8L incorporada e por espalhamento de luz (340nm) em função do tempo. Temperatura: 25°C. (a) DMPC:PEG8L (80:20) (b) DMPC:PEG8L (60:40), (c) DMPC:PEG8L (46:54) e (d) DMPC:PEG8L (30:70). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

De acordo com as Figuras 34. a-d nas proporções molares analisadas ocorreu redução da tensão superficial com o tempo, resultando em valores calculados de percentagem de tensoativo incorporado acima de 80% após 5 minutos de incubação.

Os resultados obtidos de absorvância mostraram que em torno de 25 minutos ocorreu comportamento típico de incorporação de PEG em lipossomas, observando-se uma redução nos valores de absorvância no intervalo que vai de 0 a aproximadamente 12 minutos, devido à redistribuição dos fosfolipídios nas bicamadas dos lipossomas formando estruturas menores com tensoativos e com a tendência de crescimento com decorrer do tempo, tal como descrito no item 3.4.1.1.

Comparando os resultados de diâmetro e percentagem incorporada de tensoativo em lipossomas convencionais com o tempo, apesar de todas as formulações incorporarem acima de 80%, apenas os lipossomas contendo 40 e 54Mol% de PEG8L tiveram crescimento expressivo quanto ao diâmetro no decorrer do ensaio. As demais amostras mantiveram os seus diâmetros das populações principais muito próximos dos valores iniciais. Isto confirma a nossa hipótese anterior de que 20Mol% de tensoativo não produz alterações significativas na bicamada lipídica. No entanto, quando foi adicionado 70Mol% de PEG8L os resultados apontam para a existência de estruturas micelares as quais não sofrem alterações de tamanhos expressivas com a incorporação do tensoativo.

5.3.1.3 Parâmetro de ordem

A incorporação do tensoativo nos lipossomas foi também caracterizada através do parâmetro de ordem da bicamada lipídica, determinado através da análise dos espectros de ressonância paramétrica eletrônica, utilizando o marcador 5-SASL.

Para essa determinação foram obtidos três conjuntos de espectros: o primeiro para o marcador 5-SASL obtidos em tampão Hepes pH 7,4 (Figura 35. a), o segundo para micelas de diferentes concentrações de tensoativo PEG8L (Figuras 35. b-d) e o terceiro referente aos lipossomas em presença de diferentes porcentagens de tensoativo com diferentes tempos de incorporação de tensoativo (Figura 36).

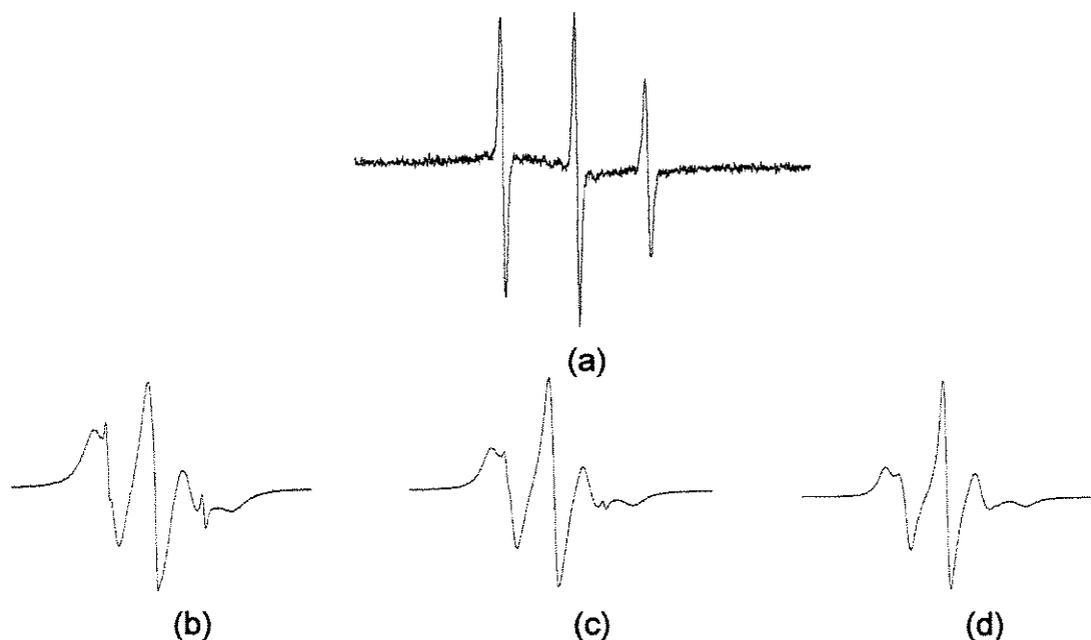


Figura 35: Espectro de RPE do 5-SASL. (a) 5-SASL em tampão Hepes pH 7,4 e em (b), (c) e (d) 5-SASL em 20, 40 e 70Mol% de PEG8L em tampão Hepes.

Na Tabela 10 figuram os valores calculados para o parâmetro de ordem das vesículas em presença de PEG8L em dois tempos de incorporação, e também para as micelas. Comparando os valores de S obtidos para as amostras contendo lipossomas, observa-se que não houve variação com o tempo de exposição dos lipossomas ao tensoativo, confirmando os resultados anteriores, de que a incorporação é rápida, da ordem de 10 minutos.

Observa-se também nesses resultados, variação do parâmetro de ordem com a concentração de tensoativo. S menores foram obtidos com maiores concentrações de tensoativo, em consequência da desorganização imposta na

bicamada. Para 70Mol% de PEG8L, o valor do parâmetro de ordem (0,51), foi mais próximo ao obtido para micelas (0,43), confirmando assim a presença predominante de micelas nessa condição. Os resultados indicam que para concentrações menores de tensoativo predominam os lipossomas nas preparações.

Esses resultados também se correlacionam com os dados de elasticidade anteriormente obtidos, mostrando que a incorporação do tensoativo torna a bicamada mais fluida e com maior capacidade de deformação, preservando a integridade das vesículas.

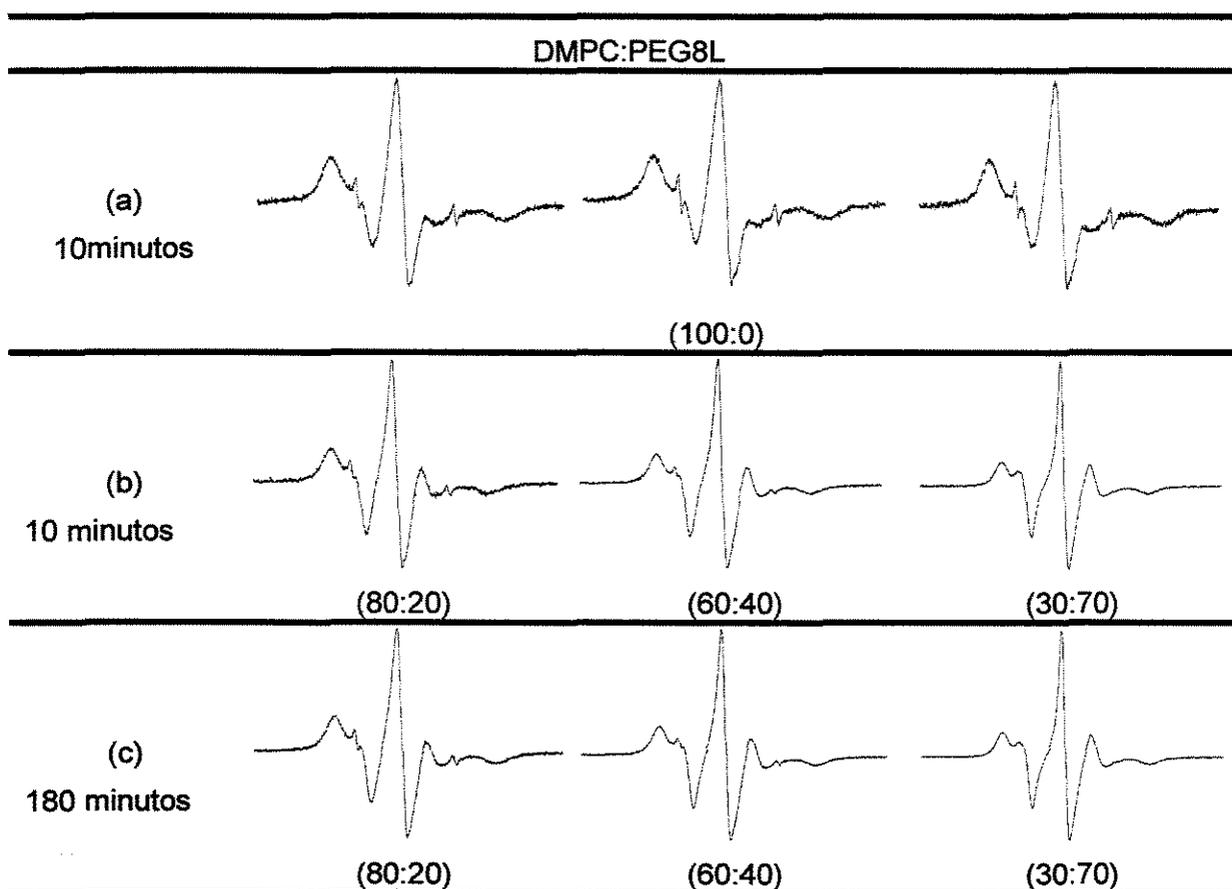


Figura 36: Espectro de RPE do 5-SASL em membranas de lipossomas (DMPC) sem e com PEG8L (20, 40 e 70Mol%) em função do tempo de incubação (10 e 180 minutos) do tensoativo. Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

Tabela 10: Parâmetros de Ordem (S) medidos com o marcador de spin 5-SASL incorporados em lipossomas e micelas do PEG8L

	S em 10 min	S em 180 min
DMPC:PEG8L (100:0)	0,68	0,68
DMPC:PEG8L (80:20)	0,58	0,58
DMPC:PEG8L (60:40)	0,56	0,56
DMPC:PEG8L (30:70)	0,51	0,50
Tampão Hepes + 20% PEG8L	0,41	-
Tampão Hepes + 40% PEG8L	0,44	-
Tampão Hepes + 70% PEG8L	0,43	-

5.3.1.4 Fluxos e elasticidade dos lipossomas

Nos resultados obtidos das amostras formuladas com diferentes proporções molares de DMPC e PEG8L (Tabela 11), observa-se que a amostra com 40Mol% de tensoativo apresentou fluxo elevado em relação às demais amostras o que refletiu em valores de elasticidades também elevados (Figura 37). No que se refere à percentagem permeada de fosfato, as amostras contendo PEG8L permearam eficientemente por duas membranas de policarbonato de 50nm não ocorrendo processo de filtração das vesículas.

Comparando-se os resultados das Tabelas 9 e 11, observa-se que a incorporação do tensoativo nos lipossomas pré-formados é vantajosa em vários aspectos: produz diâmetros médios semelhantes, porém com somente uma

população após a incorporação do tensoativo, além de fluxos maiores, principalmente para a composição DMPC:PEG8L (60:40). Isso indica uma melhor distribuição do tensoativo na bicamada, favorecendo a elasticidade das vesículas. A incorporação do tensoativo em vesículas pré-formadas foi rápida, da ordem de 10 minutos. A quantidade de fosfato permeado foi semelhante para os dois métodos de preparação.

Tabela 11: Diâmetros médios, fluxos e percentagem permeada de fosfolipídios dos lipossomas preparados com diferentes proporções molares de PEG8L. Meio poroso utilizado: 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sobrepostas a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5psi.

Concentração inicial da dispersão: 5mM				
Amostra (Mol%)*	D 1 (nm)**	D 2 (nm)**	Fluxo (mL/min)	PO ₄ ³⁻ (%)
DMPC: PEG8L (100:0)	126,8	121,4	0,03	55
DMPC: PEG8L (80:20)	132,4	118,8	5,60	82
DMPC: PEG8L (60:40)	260,0	193,6	17,50	98
DMPC: PEG8L (30:70)	141,0	109,7	5,10	87

Onde: *: adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados

** : distribuição unimodal ou com população principal acima de 90%

D1: Diâmetros dos lipossomas antes da permeação e

D2: Diâmetros dos lipossomas após a permeação

Os resultados apresentados na Figura 37 indicam que tanto os valores dos fluxos como os valores das elasticidades sofreram modificações expressivas em relação à metodologia de preparação do lipossoma elástico, principalmente, para a amostra contendo DMPC:PEG8L (60:40). Dessa forma, pode-se inferir que há maior ancoramento do PEG8L na bicamada, tornando-a mais fluida, quando o tensoativo é adicionado aos lipossomas pré-formados.

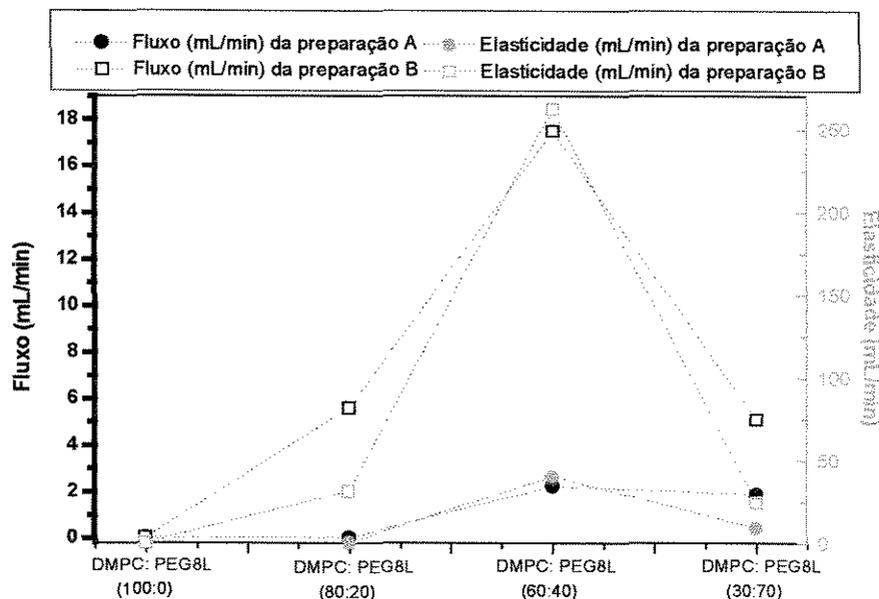


Figura 37: Fluxo e elasticidade dos lipossomas preparados por diferentes métodos (hidratação do filme seco de lipídio e tensoativo, preparação A; e incubação de tensoativo aos lipossomas, preparação B) em diferentes proporções molares de PEG8L. Meio poroso utilizado: 2 membranas de policarbonato com poros de 50nm sobrepostas a um disco de dreno. Temperatura: 37°C. Pressão: 2,5psi.

5.3.2 Cinética de incorporação do tensoativo PEG8L em lipossomas de lecitina de ovo

A incorporação do tensoativo na bicamada lipídica dos lipossomas constituídos de lecitina de ovo foi caracterizada através das variações no diâmetro médio e polidispersidade das vesículas, pela variação da porcentagem incorporada calculada a partir de medidas da tensão superficial e pela variação da absorbância das dispersões.

5.3.2.1 Diâmetro médio e polidispersidade

A Figura 38 mostra a cinética de incorporação de 40Mol% de PEG8L em lipossomas convencionais constituídos por lecitina de ovo (PCovo) 1g/L através de medidas sucessivas de diâmetro e polidispersidade *versus* tempo.

Os resultados evidenciam que diâmetro principal das vesículas não variou significativamente (desvio padrão 5,5nm) durante o experimento (300 minutos de incubação) com valores em torno de 114 a 133nm. A polidispersidade também permaneceu estável, e em torno de 0,38. Estes resultados indicam que, também neste caso, não ocorreram grandes perturbações no empacotamento da bicamada lipídica quando o tensoativo PEG8L foi adicionado aos lipossomas convencionais compostos de fosfatidilcolina de ovo nas condições deste experimento. Embora não existam grandes diferenças entre as variações de diâmetro com a incorporação do PEG8L em DMPC ou lecitina, neste último caso parece ser mais rápida gerando polidispersidade pouco maior (em torno de 0,4).

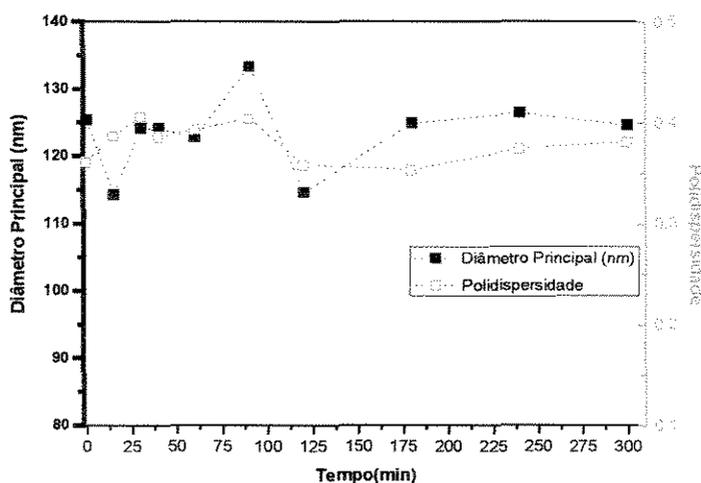


Figura 38: Cinética de incorporação do PEG8L em lipossomas convencionais compostos por lecitina de ovo através de medidas de diâmetro médio e polidispersidade. Concentração de fosfolípido, PCovo: 1g/L. Concentração inicial de tensoativo: 0,4 g/L. (Mol% aproximado de PCovo:PEG8L, 60:40).

5.3.2.2 Percentagem incorporada de tensoativo e absorbância

Na Figura 39 verifica-se o declínio da absorbância e um aumento da percentagem de incorporação devido à reorganização dos lipossomas em presença de 40Mol% de PEG8L nos primeiros 20 minutos de experimento. A percentagem de incorporação do tensoativo após 5 minutos de incubação foi de 66%, permanecendo estável e com incorporação máxima de 71% em 120 minutos. Os valores de absorbância corroboraram com os resultados obtidos de diâmetro médio, sendo observada apenas uma discreta variação de valores (0,38 a 0,40).

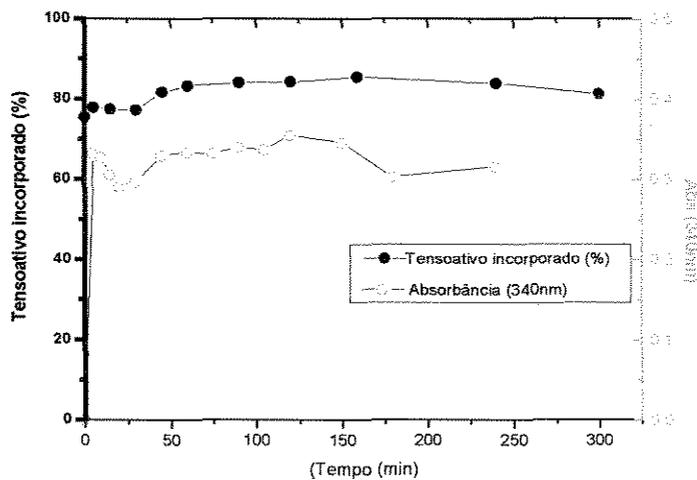


Figura 39: Cinética de incorporação do PEG8L em lipossomas convencionais compostos de lecitina de ovo através de medidas de espalhamento de luz (340nm) e percentagem de incorporação de tensoativo. Concentração de fosfolípido, PCovo: 1g/L. Concentração inicial de tensoativo: 0,4 g/L. (Mol% aproximado de PCovo:PEG8L, 60:40).

5.3.3 Comportamento dos lipossomas quando submetidos à permeação através de membranas

O comportamento dos lipossomas quando submetidos à permeação através de membranas foi avaliado com o aumento da pressão, e analisado em relação ao fluxo, elasticidade, diâmetro médio e concentração de fosfato permeado. O estudo foi feito para lipossomas convencionais e elásticos preparados com lecitina de ovo.

5.3.3.1 Fluxo

As Figuras 40 e 41 mostram o comportamento do fluxo durante a permeação em membranas de policarbonato, com diâmetro de poro nominal de 30nm em função da pressão, de lipossomas convencionais (PCovo: PEG8L (100:0 Mol%) e elásticos (PCovo:PEG8L (60:40) Mol% aproximado), respectivamente. Os lipossomas foram preparados com concentrações de 1 e 10g/L de lipídio. Dados de fluxo de água Mille-Q também foram obtidos no mesmo sistema para comparação.

Os resultados mostram, como esperado, que o fluxo da água foi maior que o das demais formulações nas mesmas condições experimentais. O fluxo obtido com os lipossomas elásticos foi superior ao dos lipossomas convencionais. Fluxos mais elevados foram obtidos para as amostras contendo menor concentração de lipídio para os lipossomas convencionais, o que não foi verificado para os lipossomas elásticos.

No intervalo de pressão investigado, o fluxo das vesículas contendo tensoativo foi proporcional à pressão aplicada para amostras contendo PEG8L. Não houve diferenças expressivas do fluxo quando a concentração de lipídios variou de 1 a 10g/L (Figura 41). No entanto, um comportamento não linear foi observado para os lipossomas convencionais a partir de uma pressão limite que

foi 8 e 12 psi para as amostras contendo 1 e 10g/L, respectivamente (Figura 40).

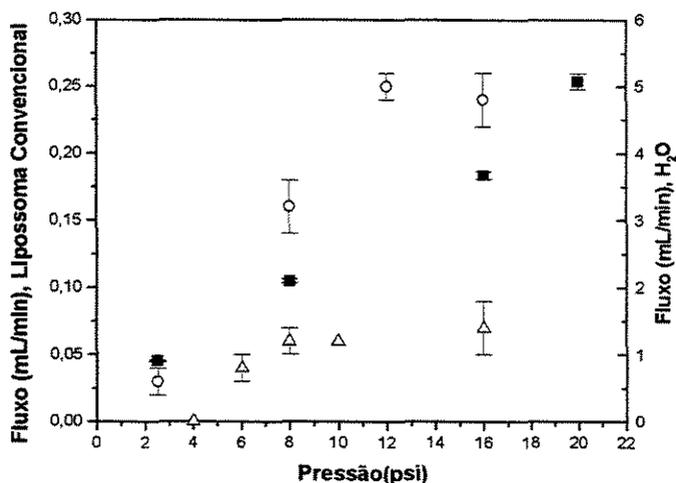


Figura 40: Fluxo de lipossomas convencionais compostos por fosfatidilcolina de ovo utilizando duas membranas com poros nominais de 30nm em função da pressão: (o) PCovo 1g/L, (Δ) PCovo10g/L e (\blacksquare) água. Temperatura: 37°C.

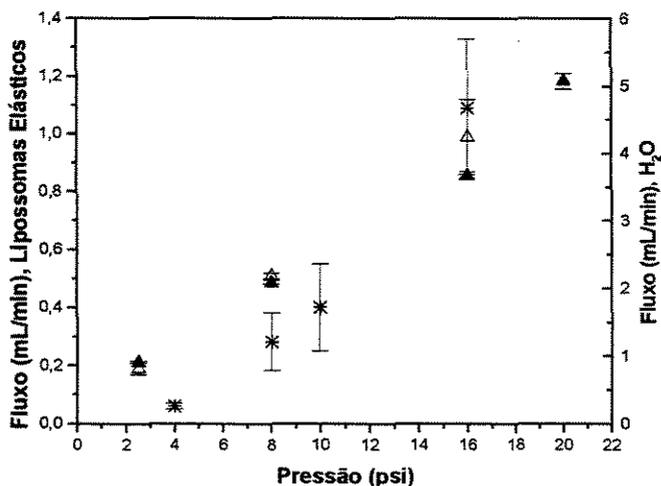


Figura 41: Fluxo de lipossomas elásticos compostos por fosfatidilcolina de ovo utilizando 2 membranas com poros nominais de 30nm em função da pressão: (\times)PCovo:PEG8L (60:40), 1g/L, (Δ)PCovo:PEG8L (60:40), 10g/L e (\blacktriangle)água. Temperatura: 37°C. (Mol% aproximado). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

Os resultados experimentais mostram que há aproximadamente uma relação linear entre o fluxo e a queda de pressão, a qual é independente da concentração dos lipossomas. que o escoamento dos lipossomas elásticos em membranas obedece à lei clássica de Darcy, com a proporcionalidade entre fluxo e queda de pressão. Esses resultados mostram claramente a diferença da capacidade de deformação entre os lipossomas elásticos e os convencionais, confirmando os resultados anteriores obtidos neste trabalho. Para os lipossomas convencionais a permeação é limitada pela rigidez da bicamada que impõe restrições ao fluxo com o aumento da pressão. Além disto, existe uma pressão mínima (4 psi), para que esses lipossomas possam escoar através da membrana.

5.3.3.2. Elasticidade

Os resultados referentes à elasticidade dos lipossomas foram obtidos em duas concentrações de lipídios, 1 e 10 g/L. Lipossomas convencionais contendo a menor concentração de fosfolipídios apresentaram valores mais altos de elasticidade (0,5 a 1,8 mL/min) sendo que a partir de 8 psi houve tendência de estabilização independente da pressão utilizada (Figura 42). No entanto, lipossomas contendo tensoativo (Figura 43) apresentaram maior elasticidade quando comparados com os valores obtidos para lipossomas convencionais e em torno de 1,1 a 6,1 mL/min e 0,4 a 12,5 mL/min para concentrações de fosfolipídios iguais a 1 e 10 g/L, respectivamente. No geral, observa-se que os valores de elasticidade crescem com o aumento da pressão aplicada no sistema até um valor limite, que representa a sua capacidade máxima de deformação da geometria esférica para uma geometria do tipo esfero-cilindro e que se insere nos poros (Bruinsma,1996). Em ambos os casos a concentração influenciou a elasticidade, sendo maior a diferença para os lipossomas convencionais. O desvio apresentado no valor da elasticidade para lipossomas elásticos com 10g/L quando foi utilizada pressão de 16 psi (Figura 43) deve-se ao valor do diâmetro médio dos lipossomas nessa condição, apresentado na Figura 45.

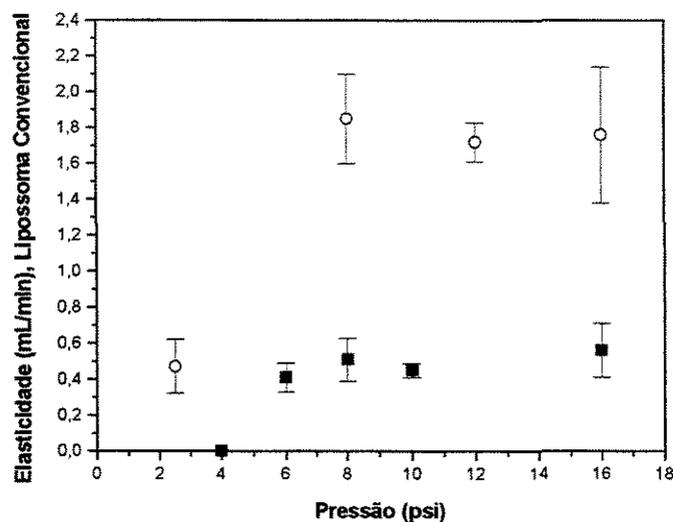


Figura 42: Elasticidade dos lipossomas convencionais em função da concentração de fosfolípidos e da pressão aplicada: (○) PCho 1g/L e (■) PCho 10g/L.

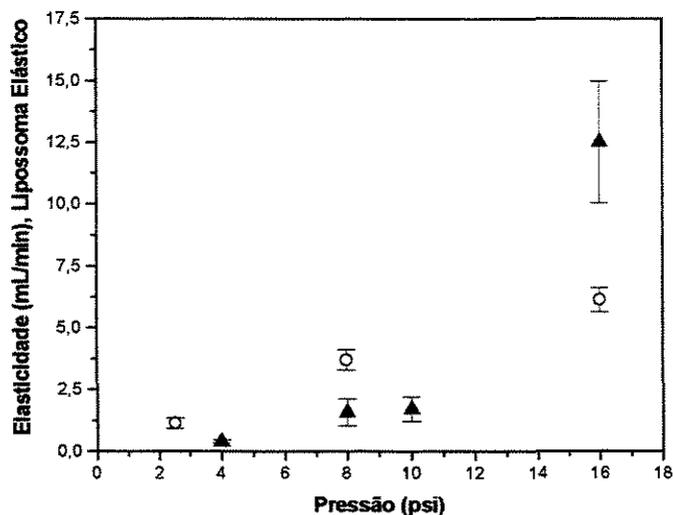


Figura 43: Elasticidade dos lipossomas contendo PEG8L em função da concentração de fosfolípidos e da pressão aplicada: (○) PCho:PEG8L (60:40), 1g/L e (▲) PCho:PEG8L (60:40), 10g/L. Temperatura: 37°C. (Mol% aproximado). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

Os resultados obtidos dos diâmetros médios para os lipossomas convencional e elástico após os ensaios de permeação estão representados na Figuras 44 e 45 respectivamente. O diâmetro inicial para todas as amostras foi aproximadamente 125nm. Nos lipossomas contendo PEG8L as vesículas sofreram decréscimo de tamanho com o aumento da pressão aplicada passando para estruturas com 76 nm a 2,5 psi de pressão, tendendo à estabilização com o aumento da pressão. Para os lipossomas convencionais verificou-se um decréscimo gradual do diâmetro com o aumento da pressão imposta nas duas concentrações avaliadas.

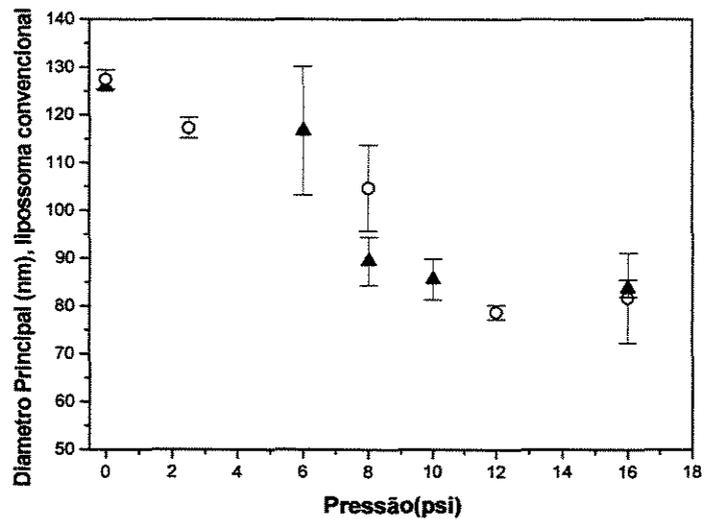


Figura 44: Diâmetro principal dos lipossomas convencionais em função da concentração de fosfolípido e da pressão: (○) PCovo 1g/L e (▲) PCovo10g/L.

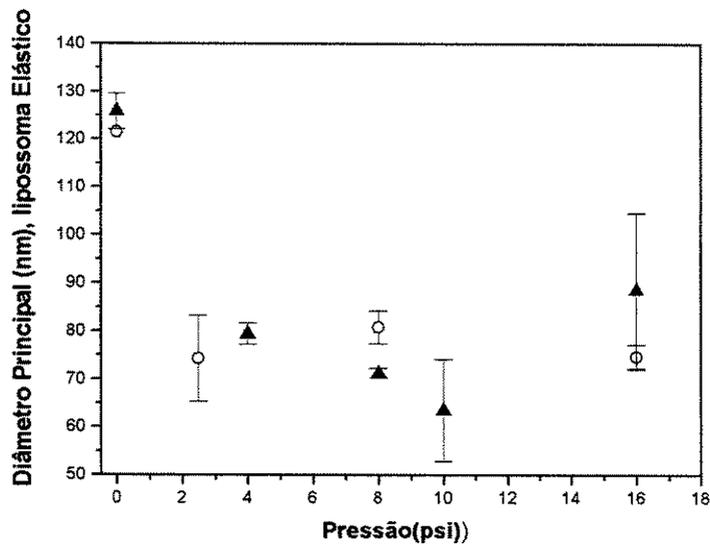


Figura 45: Diâmetro principal dos lipossomas elásticos em função da concentração de fosfolípido e da pressão (○) PCovo:PEG8L (60:40), 1g/L e (▲) PCovo:PEG8L (60:40), 10g/L. (Mol% aproximado). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

A Figura 46 apresenta os resultados da concentração de lipídios para amostras convencional e elástica permeadas após os ensaios de permeação em função da concentração inicial de fosfolípidios e da pressão.

As maiores concentrações de fosfato obtidas após a permeação no meio poroso foram para os lipossomas elásticos, permanecendo praticamente constantes com o aumento da pressão. Nas mesmas condições experimentais, foi observado que após a permeação das amostras convencionais a concentração de fosfolípido tendeu a crescer com o aumento da pressão especialmente para a condição de 10g/L. Esses resultados refletem o comportamento dos fluxos permeados anteriormente apresentados (Figuras 40 e 41).

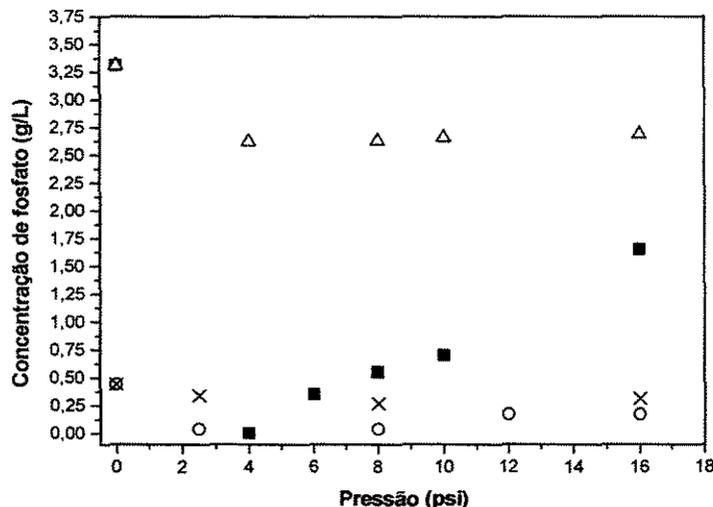


Figura 46: Concentração de fosfolipídios após os ensaios de permeação para os lipossomas convencionais e elásticos em função da concentração de lipídios e da pressão. Lipossomas convencionais, (○) PCovo, 1g/L, (■) PCovo, 10g/L e Lipossomas elásticos, (x) PCovo:PEG8L (60:40), 1g/L, (Δ) PCovo:PEG8L (60:40), 10g/L. (Mol% aproximado). Adição do tensoativo aos lipossomas pré-formados.

5.3.4 Ensaios *in vitro* com célula de Franz modificada

Para a interpretação dos resultados de permeação foram feitas medidas de diâmetro das vesículas e percentagem de fosfato nas amostras permeadas, do mesmo modo que nos experimentos anteriores. Os resultados obtidos, porém, não foram conclusivos, pois após a permeação as soluções não eram límpidas além de conterem vários outros componentes extraídos da pele, que interferiram tanto nos experimentos de espalhamento de luz quanto na determinação do teor de fosfato nas amostras permeadas. Para contornar esse problema seria necessário utilizar substâncias coloridas ou marcadores lipídicos, para posterior análise por microscopia confocal das camadas da pele e ensaios quantitativos da solução receptora nos diferentes tempos de coleta das amostras, ou utilizar corantes de

alta massa molar que não permeiam na forma livre. Experimentos preliminares envolvendo essa última alternativa foram feitos com o corante Fitolacianina de zinco (MM 577,91g/mol), porém também não foram conclusivos devido à incorporação incompleta nos lipossomas. Esses resultados mostram que a análise da permeação de lipossomas através da pele requer estudos mais aprofundados tanto da incorporação de marcadores quanto da forma de permeação, uma vez que o modo oclusivo não é o mais recomendado na literatura para este tipo de permeação.

5.4 Preparação e caracterização dos magnetolipossomas

Os magnetolipossomas foram preparados utilizando magnetita coloidal previamente preparada. Observou-se neste trabalho que a magnetita foi estável por 4 meses à temperatura ambiente conforme relatado anteriormente por Martins (1998).

Os magnetolipossomas preparados por hidratação do filme lipídico com solução de magnetita coloidal juntamente com o tensoativo PEG8L, após passagem em sistema de magnetoforese apresentaram os resultados relativos às concentrações de ferro e fosfolipídio apresentados na Tabela 12.

Esses dados mostram que praticamente toda a magnetita ficou retida no sistema de magnetoforese, enquanto todo o lipídio foi eluído. Esse comportamento indica que houve interação preferencial do lipídio com o tensoativo, excluindo a magnetita. Desse modo, o lipídio não recobriu a magnetita durante a preparação como verificado nos vários trabalhos anteriores na ausência de tensoativos (De Cuyper e Joniau, 1988, Martins, 1998, Pinho, 2000 e Rocha *et al.* 2001). As razões para esse comportamento necessitam ser melhor investigadas.

Como o nosso interesse era a preparação dos magnetolipossomas contendo tensoativos, lipossomas elástico-magnéticos, partiu-se para a investigação da incorporação do tensoativo usando magnetolipossomas pré-formados.

Tabela 12: Concentração de ferro e fosfolípido após a preparação dos magnetolipossomas com sua posterior separação em sistema de magnetoforese.

Amostra (concentração inicial: 5mM) + magnetita coloidal (ppm)	Magnetita coloidal (ppm) ⁻ retido *	PO₄³⁻ retido *	PO₄³⁻ não retido**
DMPC:PEG8L (60:40) + 650ppm	650	0,14±0,04	2,9 ± 0,3
DMPC:PEG8L (60:40) + 412,5ppm	381	0,27±0,03	2,9 ± 0,6
DMPC:PEG8L (60:40) + 165ppm	158	0,21±0,03	3,0 ± 0,4

*: retido na lâ magnética sob a influência do campo magnético de 1,3T e

** : não ficou retido na lâ magnética sob a influência do campo magnético de 1,3T.

5.4.1 Influencia da amplitude e tempo de sonicação no diâmetro e incorporação da magnetita

A Figura 47 apresenta os resultados obtidos de diâmetro principal (acima de 70%) das vesículas quando se variou a amplitude e o tempo de sonicação. Observa-se que diâmetros da ordem de 100nm, semelhantes aos diâmetros dos lipossomas elásticos, foram obtidos somente com amplitude de 20V e tempo de 10 a 20 minutos. Por outro lado, estudos anteriores já foram feitos com magnetolipossomas nessa faixa de diâmetro, o que facilita a interpretação dos resultados (Pinho, 2000). Tempos e amplitudes maiores produzem estruturas muito menores (da ordem de 60nm de diâmetro principal). Resultados obtidos com

lipossomas convencionais na ausência de magnetita mostraram um comportamento menos pronunciado em termos de redução de tamanhos nas mesmas condições operacionais indicando assim, que a incorporação do ferrofluido afetou significativamente o diâmetro principal dos lipossomas.

A incorporação do ferro é apresentada na Figura 48, em termos da razão fosfato/ferro contida na estrutura dos lipossomas. Para o diâmetro principal de 120nm, a razão fosfato/magnetita foi 1,3mMol de lipídio/g de ferro que corresponde à razão de equilíbrio anteriormente determinada por Rocha *et al.*, 2001. Nessas condições, esses autores verificaram que a magnetita situava-se no núcleo dos magnetolipossomas preparados.

Na Figura 48 observa-se que para os diâmetros menores que 120nm a razão fosfato/ferro atinge valores na faixa de 2,5mMol lipídio/g de ferro. De maneira geral, o aumento da amplitude e do tempo de exposição ao ultra-som favorece a diminuição do diâmetro e diminuição da incorporação da magnetita no cerne aquoso dos magnetolipossomas.

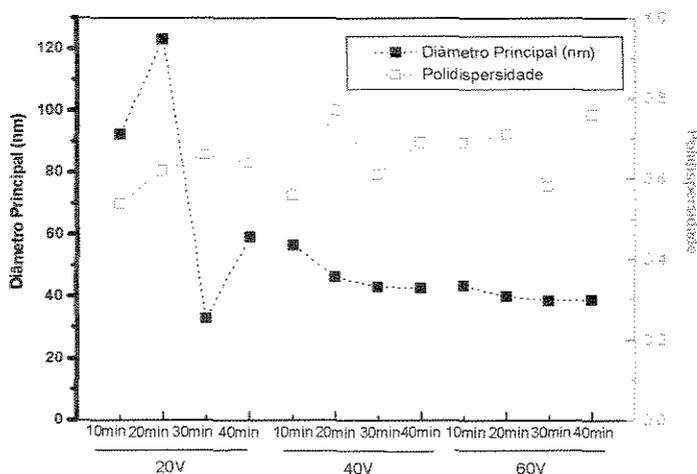


Figura 47: Influência da amplitude e do tempo de sonicação no diâmetro e distribuição populacional dos magnetolipossomas. O eixo das abscissas representa a amplitude de onda de 20, 40 e 60V nos intervalos de tempo (T) 10, 20, 30 e 40 minutos.

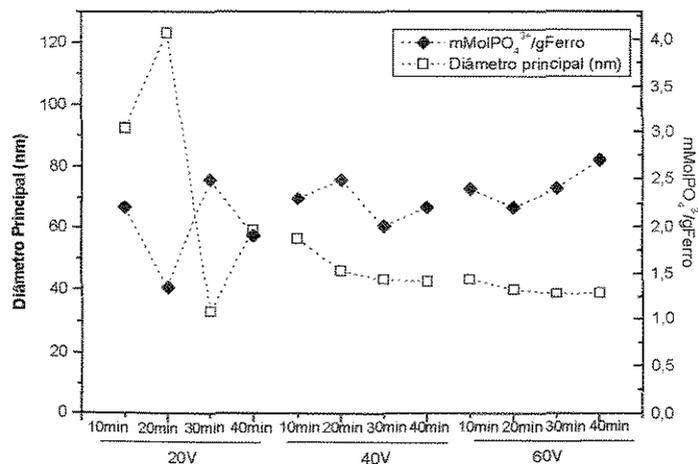


Figura 48: Influência da amplitude e do tempo de sonicação no diâmetro e na relação da concentração de lipídio/g de ferro. O eixo das abscissas representa a amplitude de onda de 20, 40 e 60V nos intervalos de tempo (T) 10, 20, 30 e 40 minutos.

5.4.2 Caracterização dos magnetolipossomas com incorporação do PEG8L das vesículas.

Nestes experimentos o PEG8L foi incorporado às vesículas pré-formadas de magnetolipossomas. A incorporação do tensoativo na bicamada lipídica foi caracterizada através das variações no diâmetro médio e polidispersidade das vesículas, pela variação da percentagem incorporada calculada a partir de medidas da tensão superficial e pela variação da absorvância das dispersões.

5.4.2.1 Diâmetro médio, polidispersidade, percentagem incorporada de tensoativos e absorvância.

A Figura 49 mostra um comportamento distinto ao apresentado quando se

tinha lipossomas vazios (Figuras 33 e 34). A presença da magnetita coloidal no cerne aquoso provavelmente modifica a acomodação do tensoativo na bicamada lipídica. Como pode ser observado, nos primeiros 25 minutos ocorreu um expressivo decréscimo no diâmetro principal devido ao rearranjo das moléculas na presença do ferro.

Os valores de tensão superficial da dispersão contendo magnetolipossomas forneceram dados para avaliação da percentagem incorporada de PEG8L com o tempo. A incorporação do PEG8L nos magnetolipossomas foi de cerca de 60%, com estabilização após 150 minutos. Esse resultado se deve à interação eletrostática da monocamada mais interna de lipídio com o ferro, dificultando a acomodação do tensoativo na bicamada.

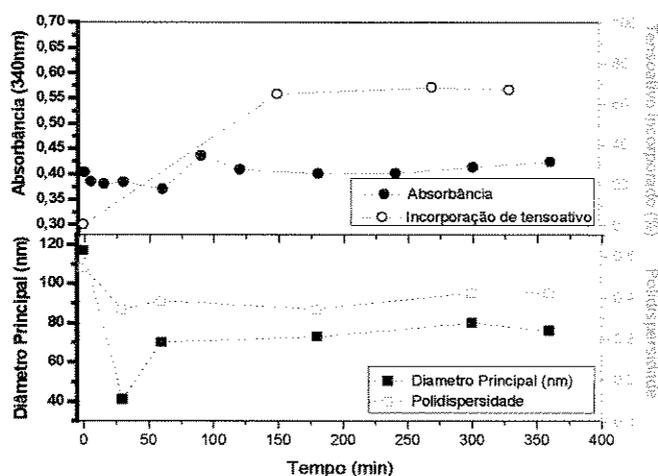


Figura 49: Cinética de incorporação do 40Mol% de PEG8L em magnetolipossomas compostos por dimiristoilfosfatidilcolina (60Mol% de DMPC) através de medidas de espalhamento de luz (340nm), percentagem de incorporação de tensoativo, diâmetro médio e distribuição de tamanhos (polidispersidade).

5.4.3 Ensaio de permeação dos magnetolipossomas e lipossomas elástico-magnéticos

A permeação de magnetolipossomas e lipossomas elástico magnéticos foi feita inicialmente na ausência de campo magnético em membranas de policarbonato conforme os ensaios anteriores. Os ensaios na presença de campo magnético foram conduzidos no sistema de magnetoforese apresentado no item 4.2.11. A influência do campo magnético foi avaliada comparando a permeação na ausência de campo magnético no mesmo sistema.

5.4.3.1 Ensaio de permeação na ausência de campo magnético

Os resultados obtidos das amostras de magnetolipossomas (Tabela 13), mostram fluxos semelhantes aos lipossomas convencionais (sem magnetita) (Tabela 11). No entanto, os dados obtidos de concentração de fosfato mostraram que ocorreu retenção de 96% das vesículas quando a magnetita coloidal foi adicionada.

Em se tratando dos lipossomas elástico-magnéticos, a adição de 40Mol% de PEG8L produziu fluxos bem inferiores aos observados para os lipossomas elásticos (Tabela 11), tanto pela menor incorporação do tensoativo observada anteriormente (cerca de 60%), quanto pela maior dificuldade de deformação produzida pela presença da magnetita na estrutura dos lipossomas. No que se refere à concentração de fosfolípido, a quantidade permeada foi de 6,4%, o que corresponde a uma retenção de 93,6% dos lipossomas na membrana. Não foi observada a permeação de ferrofluido nestas amostras.

No Anexo II são mostrados gráficos representativos das medidas de diâmetro e distribuição populacional realizadas para os magnetolipossomas e para os lipossomas elástico-magnéticos.

Tabela 13: Diâmetro médio antes e depois do ensaio de permeação, fluxo elasticidade e percentagem de fosfato permeado para magnetolipossomas e lipossomas elástico-magnéticos. Pressão de permeação: 2,5psi. Meio poroso: 2 membranas sobrepostas de policarbonato com poros de 50nm. Temperatura: 37°C.

Concentração Inicial da dispersão: 5mM					
Amostra (Mol%)	D 1 (nm)	D 2 (nm)	Fluxo (mL/min)	Elasticidade (mL/min)	PO ₄ ³⁻ (%)
Magnetolipossomas * (DMPC:PEG8L, 100:0)	123,0	57,0	0,04	0,05	4,0
Lipossomas elástico-magnéticos * (DMPC:PEG8L inicial, 60:40)	64,0	58,0	0,05	0,07	6,4

Onde: 1: diâmetros dos lipossomas antes da permeação,

2: diâmetros dos lipossomas depois da permeação,

*: relação utilizada de lipídio/ferro foi de 1,3mMol de lipídio/g de ferro.

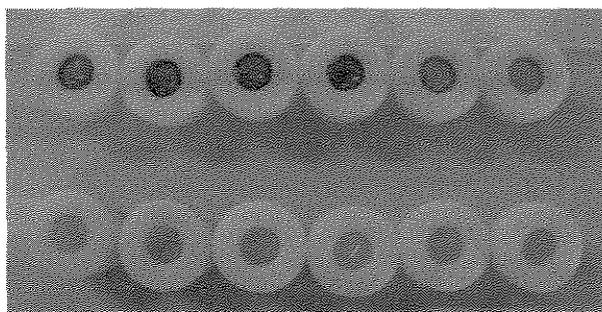
Ensaio com redução da quantidade de magnetita incorporada aos lipossomas elástico-magnéticos permitiram a quantificação da magnetita no permeado somente quando a sua concentração foi reduzida em 2 vezes, produzindo uma razão fosfato:magnetita de 2,8 mMol lipídio/g de ferro. Nesta condição, o resultado obtido referente ao ensaio de permeação em membranas indica que ocorreu permeação de ferrofluido de cerca de 3% e de fosfolipídio de 20%. A elasticidade determinada foi de 1mL/min.

5.4.3.2 Ensaio de permeação sob ação do campo magnético

Os ensaios de permeação dos magnetolipossomas e dos lipossomas elástico-magnéticos sob ação do campo magnético não foram conclusivos, devido a vazamentos observados nas células, que dificultaram a reprodutibilidade dos

resultados. Além disso, com pequena dimensão das células de permeação (40 μ L), tornou-se difícil a manipulação e vedação das membranas.

De modo qualitativo observou-se variação na coloração das membranas usadas na permeação, como pode ser visto na Figura 50. As membranas que permearam os lipossomas elástico-magnéticos parecem conter menos magnetita retida, podendo indicar uma maior facilidade de permeação desses lipossomas, com comportamento semelhante ao obtido anteriormente na ausência de campo magnético.



Magnetolipossomas
DMPC:PEG8L inicial (100:0)

Lipossomas elástico-magnéticos
DMPC:PEG8L inicial (60:40)

Figura 50: Portas-amostra após cerca de 2,5 minutos no sistema de permeação acoplado a um campo magnético. Meio poroso: 2 membranas artificiais de policarbonato sobrepostas, com poros nominais de 50nm.

Ensaio posteriores foram feitos usando uma única célula de permeação padrão, com volume maior (3mL), contornando os problemas de vazamentos na membrana. Porém a utilização dessa nova célula implicou tanto no seu posicionamento na região central do porta-amostra, quanto no afastamento do pólo magnético, comprometendo assim a atuação das linhas de campo sobre a célula, conforme anteriormente projetado. Nessas condições, tornou-se necessário o redimensionamento do sistema, não sendo, portanto, possível neste trabalho uma avaliação precisa da ação do campo magnético na permeação dos lipossomas.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

Para tensoativos derivados de ácido láurico contendo polioxietileno na forma de ésteres o comprimento e o número de cadeias hidrofóbicas influenciam no diâmetro e distribuição de tamanhos, incorporação dos tensoativos na bicamada lipídica, estabilidade de estocagem e elasticidade quando permeados através de membranas de policarbonato nanoporosas.

Os melhores resultados de elasticidade foram obtidos com o PEG8L e PEG 8DL, particularmente para o PEG8L, para o qual a elasticidade atingiu 40,45mL/min.

O diâmetro médio e o número de populações nas dispersões e a estabilidade dos lipossomas foram determinados pela capacidade de ancoramento dos tensoativos na bicamada lipídica. Tensoativos com dupla cadeia hidrofóbica apresentaram maior capacidade de ancoramento resultando em dispersões mais estáveis e com distribuição unimodal.

O método de incorporação do tensoativo influenciou fortemente a elasticidade dos lipossomas. Embora as quantidades fossem semelhantes, a incorporação do tensoativo em lipossomas pré-formados produziu maiores valores de fluxo, da ordem de 17mL/min e elasticidade 250mL/min, quando comparados com lipossomas cujo tensoativo foi incorporado durante a fase de hidratação do seu filme lipídico.

A caracterização por Ressonância Paramagnética Eletrônica mostrou através do cálculo do parâmetro de ordem, que as estruturas com composição 80:20 e 60:40 de fosfolipídio:tensoativo apresentam-se preferencialmente na forma de bicamadas lipídicas. A fluidez da bicamada aumenta com a concentração de tensoativo.

O comportamento de escoamento dos lipossomas com a pressão aplicada obedeceu à lei de Darcy, com a relação linear entre o fluxo e a queda de pressão para os lipossomas elásticos, independente da concentração, demonstrando assim a sua capacidade de deformação no processo de permeação em nanoporos. Lipossomas convencionais mostraram desvios deste comportamento a partir de uma pressão limite e redução de tamanho com o aumento da pressão aplicada, indicando desestruturação das vesículas.

A preparação de lipossomas elástico-magnéticos foi factível, com a incorporação do tensoativo aos magnetolipossomas pré-formados. A incorporação do tensoativo atingiu um máximo de 60% do seu valor inicial.

A presença da magnetita coloidal produziu redução no diâmetro principal dos lipossomas elástico-magnéticos. A permeação através de membranas de polycarbonato apresentou fluxos e elasticidades bem menores quando comparados com os lipossomas elásticos para uma razão fosfolipídio/magnetita 1,3 mMol/g Ferro. A redução em 2 vezes da quantidade de magnetita incorporada nos lipossomas aumentou o fluxo e a permeação dos lipossomas elástico-magnéticos.

A influência do campo magnético não foi avaliada devido à necessidade de um redimensionamento no sistema de permeação acoplado ao campo magnético sem o comprometimento das linhas de campo sobre a célula.

Esses resultados demonstram a potencialidade dos lipossomas elásticos para aplicações transdérmicas de bioativos. A permeação dos lipossomas elástico-magnéticos em membranas, mantendo a sua integridade, depende da otimização da concentração de magnetita nos lipossomas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN osteopathic college of dermatology, Dermatologic Disease Database: Structure & Function. Disponível em: <http://www.aocd.org/skin/struc-1.gif>. Acesso em: 21 Mar. 2005.
- AUNGST, B. J. Skin permeation enhancers for improved transdermal drug delivery. In: SZYCHER, M. ed., High performance biomaterials: a comprehensive guide to medical and pharmaceutical applications. Lancaster : Technomic Pub. Co.,1991. cap.34, p.527–538.
- BABINCOVÁ, M., SOURIVONG, P., CHORVAT, D., BABINEC, P. Laser triggered drug release from magnetoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.194, p.163–166, 1999.
- BABINCOVÁ, M., LESZCZYNSKA, D., SOURIVONG, P. CICMANEC, P., BABINEC, P. Superparamagnetic gel as a novel material for electromagnetically induced hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.225, p.109–112, 2001.
- BARRY, B.W. Dermatological formulations: percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker, 1983. cap.1, p.1–48.
- BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v.6, p.85-97, 1987.
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p.101-114, 2001.
- BENET, L.Z., KROETZ, D.L., SHEINER, L.B. Farmacocinética, a dinâmica da absorção e eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G., eds. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9.ed. New York: MacGraw-Hill, 1996. cap.1, p.3–20.

- BOUWSTRA, J.A., HONEYWELL-NGUYEN, P.L., GOORIS, G.S., PONEC, M.
Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations.
Progress in Lipid Research, v.42, p.1–36, 2003.
- BOUWSTRA, J.A., VAN DEN BERGH, B., A.I., JUNGINGER, H.E., VROOM, J.,
GERRITSEN, H. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in
vitro: electron microscopy and two – photon excitation microscopy. **Biochimica
et Biophysica Acta**, v.1461 p. 155–173, 1999.
- BROUNAUGH, R.L., STEWART, R.F., CONGDON, E.R. Methods for in
percutaneous absorption studies II: Animal models for human skin.. In vitro
model(s) for the percutaneous delivery of active tissue repair agents.
Toxicology and Applied Pharmacology, v.62, n.3, p.481–488, 1982.
- BRUINSMA, R. Rheology and shape transitions of vesicles under capillary flow.
Physica A, v.234, p.249-270, 1996.
- CEVC, G., BLUME G. Lipid vesicle penetrate into intact skin owing to the
transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochimica et Biophysica
Acta**, v.1104, p.226–232, 1992.
- CEVC, G. Transfersomes. European Patent number, 91 114 163 8 – 2114, 1991.
- CEVC, G. Material transport across permeability barriers by means of lipid
vesicles. In: LIPOWSKY,R., SACKMANN, E. eds, Structure and dynamics of
membranes. Amsterdam : Elsevier, 1995. cap.9, p.467–490.
- CEVC, G., SCHÄTZLEIN, A., BLUME, G. Transdermal drugs carries properties,
optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied
peptides. **Journal of Controlled Release**, v.36, p.3–16, 1995.
- CEVC, G., SCHÄTZLEIN, A., BLUME, G. Transfersomes–mediated transepidermal
delivery improve the region – specificity and biological activity of corticosteroids
in vivo. **Journal of Controlled Release**, v.45, p.211-226, 1997.

CEVC, G., GEBAUER, D., STIEBER, J., SCHÄTZLEIN, A., BLUME, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1368, p.201–215, 1998.

CEVC, G., BLUME, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1514, n.2, p.191–205, 2001.

CEVC, G., SCHÄTZLEIN, A., RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1564, n.1, p.21–30, 2002.

CEVC, G., GEBAUER, D. Hydration – driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. **Biophysical Journal**, v.84, p.1010–1024, 2003.

CHEN, P.S., TORIBA, T.Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756–1758, 1956.

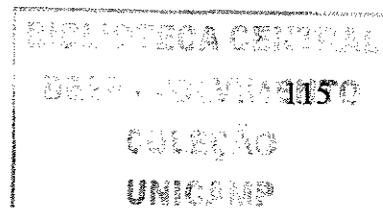
COSTA, P., FERREIRA D.F., LOBO, J.M.S. Sistemas de liberação transdérmica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.53, p.19–26, 1993.

CROMMELIN, D.J.A., SCHREIER, H. Liposomes. In: KREUTER, J. Colloidal drug delivery systems. New York: M. Dekker, 1994. cap.3, p.73-189.

D.ADAIR'S cosmetics, Liposomes. Disponível em:
<http://dadairs.com/liposomes.htm>. Acesso em: 21 mar. 2005.

DE CUYPER, M., JONIAU, M. Magnetoliposomes–formation and structural characterization. **European Biophysics Journal**, v.15, p.311-319, 1988.

DE CUYPER, M., JONIAU, M. Immobilization of membrane enzymes into magnetizable, phospholipid bilayer-coated, inorganic colloids. **Progress in Colloid and Polymer science**, v.82, p.353–359, 1990.



- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Binding characteristics and thermal behavior of cytochrome-C oxidase, inserted into phospholipids-coated, magnetic nanoparticles. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.16, p.201-210, 1992.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Magnetoproteoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.122, p.340–342, 1993.
- DE CUYPER, M., VALTONEN, S. Investigation of the spontaneous transferability of a phospholipid-poly(ethyleneglycol)-biotin derivative from small unilamellar phospholipids vesicles to magnetoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.225, p.89–94, 2001.
- DE CUYPER, M., BULTE, J.W.M., DESPRES, D., FRANK, A. Preparation, relaxometry, and biokinetics of PEGylated magnetoliposomes as MR contrast agent. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.194, p.204–209, 1999.
- DE CUYPER, M., HODENIUS, M., LACAVA, Z., AZEVEDO, R., SILVA, M.F.L., MORAIS, P.C., SANTANA, M.H.A. Attachment of water-soluble proteins to the surface of (magnetizable) phospholipid colloids via neutravidin-derivatized phospholipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.245, p. 274–280, 2002.
- DE CUYPER, M., CRABBE, A., COCQUYT, J., VAN DER MEEREN, P., MARTINS, F., SANTANA, M.H.A. PEGylation of phospholipids improves their intermembrane exchange rate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.6, n.7, p.1487–1492, 2004.
- EDWARDS, K.; ALMGREN, M. Solubilization of lecithin vesicles by C12E8 - structural transitions and temperature effects. **Journal of Colloid Interface Science**, v.147, n.1, p. 1-21, 1991.
- EDWARDS, K. ALMGRE, M., Surfactant-induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effects of surfactant head group size. **Langmuir**, v.8, p.824–832, 1992.

- EL MAGHRABY G.M.M., WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable of surfactant concentration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.196, p.63–74, 2000.
- FRISKEN, B.J.; ASMAN, C., PATTY, P.J. Studies of vesicle extrusion. **Langmuir**, v.16, p.928-933, 2000.
- GONI, F. M., ALONSO, A. Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.51–68, 2000.
- GOLDEN, G.M., GUZEK, D.B., KENNEDY, A.H., MCKIE, J.E., POTTS, R.O. Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. **Biochemistry**, v.26, p.2382–2388, 1987.
- GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. 564p.
- HINZE, W.L., PRAMAURO, E. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.24, n.2p.133–177, 1993.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., DE GRAAFF, A.M., GROENINK, H.W.W., BOUWSTRA, J.A. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1573, p.130–140, 2002.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., BOUWSTRA, J.A. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles trough human skin: a suggested mechanism of action. **Journal of Controlled Release**, v.86, p.145–156, 2003.
- HONEYWELL-NGUYEN, P.L., ARENJA, S., BOUWSTRA, J.A. Skin penetration and mechanisms of action in the deliveryof the D2-Agonist rotigotine from surfactant-based elastic vesicle formulations. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.10, p.1619–1625, 2003.
- HUBBEL, W.L. MCCONNELL, H.M. Molecular motion inspin-labeled phosfolipids and membrane, **Journal of American Chemical Society**, v.93, p.314–326, 1971.

- ISHII, F. Preparation and characterization of lipid vesicle containing magnetite and anticancer drug. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.11, p.581-592, 1990.
- JADOUL, A., BOUWSTRA, J., PREAR, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: review of the biophysical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.35, p.89–105, 1999.
- JOST, P., LIBERTINI L.J., HEBERT V.C., GRIFFITH, O.H. Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains. **Journal of Molecular Biology**, v.59, n.1, p.77–98, 1971.
- JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. Histologia Básica. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p. 301–312.
- KARANDE, P., JAIN, A., MITRAGOTRI, S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. **Nature Biotechnology**, v.22, p.192–197, 2004.
- KYDONIEUS A. Transdermal delivery of drugs: promise/innovation/challenge. **Controlled Released Society Newsletter**, v.19, n.2, p.3–5, 2002.
- LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. Londres: Elsevier, 1993. 575p.
- LI, G.L., VAN DEN GEEST, R., CHANET, L., VAN ZANTEN, E., DANHOF, M., BOUWSTRA, J.A. In *vitro* iontophoresis of R-apomorphine across human stratum corneum. Structure -transport relationship of penetration enhancement. **Journal of Controlled Release**, v.84 p. 49–57, 2002.
- LICHTENBERG, D. Characterization of solubilization of bilayers by surfactants, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.821, p.470–478, 1985.
- LIU, J., LEWIS, T.N., PRAUSNITZ, M.R. Non-invasive assessment and control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. **Pharmacology Research**, v.15 p. 918–924, 1998.

- MARGOLIS, L. B., NAMIOT, V.A., KLJUKIN L.M. Magnetoliposomes: another principle of cell sorting. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.735, p.193–195, 1983.
- MARJUKKA SUHONEN T, BOUWSTRA JA, URTTI A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal Controlled Release**, v.59, n.2, p. 149–161, 1999.
- MARTINS, F. Preparação e caracterização de Magnetolipossomas para aplicações em processos de adsorção por afinidade. Campinas, 1998. 127p. (Dissertação de Mestrado—Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas).
- MASSARANI, G. Fluidodinâmica em Sistemas Particulados, Ed. UFRJ, 1997.
- MERINO, G. KALIA, Y.N., GUY, R.H. Ultrasound-enhanced transdermal transport. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 92, p.1125–1137, 2003.
- MEZEI, M., GULASEKHARAM, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. **Life Science**, v.26, p.1473–1477, 1980.
- MITRAGOTRI, S., KOST, J. Low frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics. **Biotechnology Progress**, v.16, p.488–492, 2000.
- MONTI, D., GIANNELLI, R., CHETONI, P., BURGALASSI, S. Comparison of the effects of ultrasound and chemical enhancers on Transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**. v.229, p.131–137, 2001.
- MORAES, A.M., SANTANA, M.H.A., CARBONELL, R.G. Preparation and characterization of liposomal systems entrapping the boronated compound o-carboranylpropylamine. **Journal of Microencapsulation**, v.16, n.5, p.647–664, 1999.

- MORGANTI, P., RUOCCO, E., WOLF, R., RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.489–501, 2001.
- MURTHY, S.N., HIREMATH, S.R.R. Magnetophoresis: a novel approach in transdermal drug permeation enhancement. **Journal of Controller Release**, v.72, p.225–309, 2001.
- NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H., Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v.3, p.318–326, 2000.
- NEW, R. R. C. Liposomes: a Practical Approach. New York: IRL Press, 1990. 301p.
- NOMURA, F., NAGATA, M., INABA, T, HIRAMATSU, H., HOTANI, H., TAKIGUCHI, K. Capabilities of liposomes for topological transformation. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2340–2345, 2001.
- PAMPLONA, D., SANTANA, M.H.S. Tensile instability of liposomes in presence of surfactants. **Applied Mechanics Reviews**, v.50, n.11, p.162–166, 1997.
- PAUL, A., CEVC, G., BACHHAWAT, B.K. Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. **Vaccine**, v.16, n.2-3, p.188–195, 1998.
- PILLAI, O., NAIR, V., PACHAGNULA, R. Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.109–120, 2004.
- PINHO, S.C. Detecção de autoanticorpos antifosfolípidos por adsorção de afinidade utilizando magnetolipossomas. Campinas, 2000. 115p. (Dissertação de Mestrado—Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas).
- POTTS, R.O., GUY, R.H., Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.5, p. 663–669, 1992.

PRAUSNITZ, M.R. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin eletroporation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.35, p.61–76, 1999.

PRAUSNITZ, M.R., MITRAGOTRI, S., LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews**, v.3, p.115–124, 2004.

RAMACHANDRAN, C, FLEISHER, D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.42, n.3 p.197–223, 2000.

REDELMEIER, T., KITSON, N. Dermatological applications of liposomes. In: JANOFF, A.S. ed. *Liposomes: rational design*. New York: Basel: M. Dekker, 1999. cap.12, p.283–307.

RHEIMERS, G.W., KHALAFALLA, S.E. Magnetic fluids. USA Patent 1.439.031, 1976.

RIBAS, A. M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Campinas, 1997. 92p. (Dissertação de Mestrado—Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas).

ROCHA, F.M., de PINHO, S.C. ZOLLNER, R.L., SANTANA, M.H.A., Preparation and characterization of affinity magnetoliposomes useful for the detection of antiphospholipid antibodies, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.225, n.1-2, p.101–108, 2001.

SAFARIK. I., SAFARÍKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.33–53, 1999.

SCHATZLEIN, A., CEVC, G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). **British Association of Dermatologists**, v.138, n.4, p.584–592, 1998.

SAFARIK. I., SAFARÍKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. **Journal of Chromatography B**, v.722, p.33–53, 1999.

SCHREIER, S., POLNASZEK, C.F., SMITH, I.C.P. Spin label in membranes, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 155, p. 375–436, 1978.

- SCHREIER , S., FREZZATTI, W. A., ARAUJO, P.S., CHAIMOVICH, H., CUCCOVIA, I.M. Effect of lipid membranes on the apparent pk of the anesthetic tetracaine spin label and titration studies, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.769, p.231–237, 1984.
- SCHWARZE, S.R., HO, A., VOCERO-AKBANI, A. DOWDY, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. **Science**, v.285, p. 1569–1572, 1999.
- SHINKAI, M., YANASE., M, SUZUKI, M., HONDA, H., WAKABAYASHIB, T., YOSHIDA, J., KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Material**, v.194, n.1–3, p.176–184, 1999.
- SNYDER, E.L., DOWDY, S.F. Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery, **Pharmaceutical Research**, v.21, n.3, p.389 – 393, 2004.
- UNIVERSITY of Rochester. Ultra-deformable liposomes "Transfersomes®". Disponível em: <http://mail.rochester.edu/~cq001m/bme/future.html>. Acesso em: 21 março 2005.
- US pharmacist. Transdermal Drug Delivery. Disponível em https://www.uspharmacist.com/index.asp?show=article&page=8_1061.htm. Acesso em: 23 março 2005.
- VAN DEN BERGH, B.A.I., VRIES I.S., BOUWSTRA J.A. Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.167, p.57–67, 1998.
- VAN DEN BERGH, B.A., BOUWSTRA, J.A., JUNGINGER, H.E., WERTZ, P.W., Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **Journal of Controlled Release**, v.62, n.3, p. 367–379, 1999.
- VAN DEN BERGH, B. A. I., BOUWSTRA, J. A., JUNGINGER, H. E., WERTZ, P. W. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v.217, n.1-2, p.13–24, 2001.

VILELA, A. L. M., Anatomia e fisiologia humana: sistema tegumentar. Disponível em: <http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>. Acesso em: 21 mar. 2005.

VIROONCHATAPAN, E., SATO, H., UENO, M., ADACHI, I., TAZAWA, K., HORIKOSHI, I. Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on-line perfusion system. **Life Sciences**, v.58 n.24, p.2251–2261, 1996.

WARREN, R.C. Physics and architecture of cell membranes. IOP publishing Ltd., 1987.

WEARLEY, L., LIU, J., CHIEN, Y.W. Iontophoresis facilitated transdermal delivery of verapamil. II. Factors affecting reversibility of skin permeability. **Journal of Controlled Release**, v.9, p.231–242, 1989.

YOE, J.H., JONES, A.L. Colorimetric determination of iron with disodium–dihydroxibenzene–3, 5–disulfonate. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.16, p.111–115, 1944.

ZELLMER, S., PFEIL, W., LASCH, J. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1237, n.2, p.176–182, 1995.

ZOLLNER, T.C., ZOLLNER, R.L., DE CUYPER, M., SANTANA, M.H.A., Adsorption of isotype “E” antibodies on affinity magnetoliposomes, **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.24, n.3–4, p.615–622, 2003

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Estudar a adição de moléculas bioativas de alta massa molar nos lipossomas elásticos e elástico-magnéticos e avaliar as propriedades elásticas, fluxo e permeação dos lipossomas.
- Investir nas adaptações do sistema de permeação acoplado ao campo magnético a fim de maximizar o campo magnético
- Otimizar a concentração e o diâmetro da magnetita coloidal visando aumentar o fluxo dos lipossomas elástico-magnéticos nos ensaios de permeação.

ANEXOS

Anexo I

No Anexo I são apresentadas as curvas de calibração utilizadas nas quantificações feitas neste trabalho em relação ao fosfato, incorporação de tensoativos e ferro.

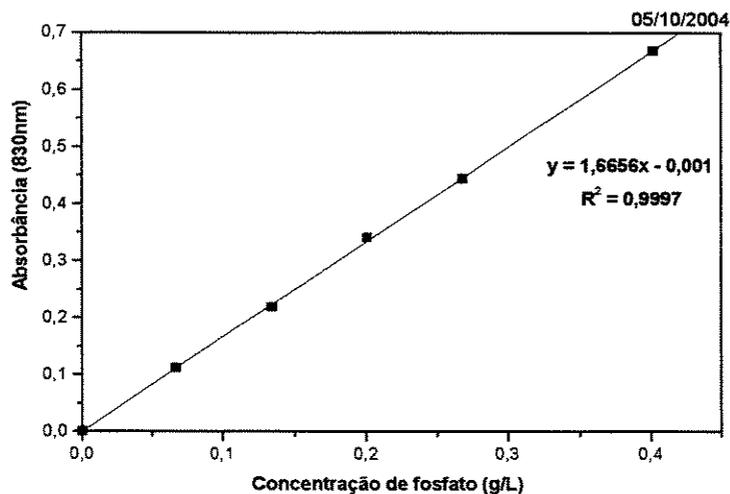
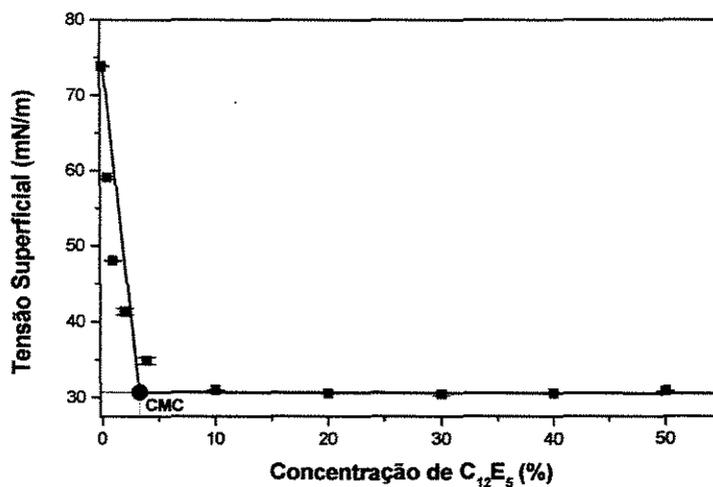
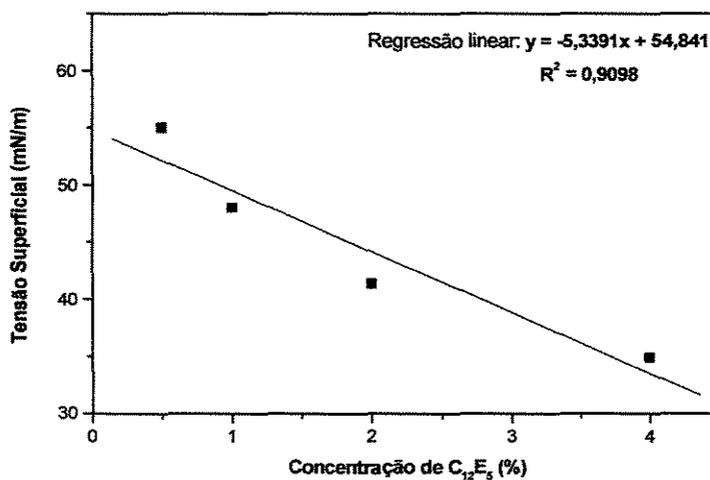


Figura 51: Curva de calibração da análise do fosfolipídio (coeficiente angular = 1,6656, coeficiente linear = 0,001 e coeficiente de correlação da reta = 0,9997).

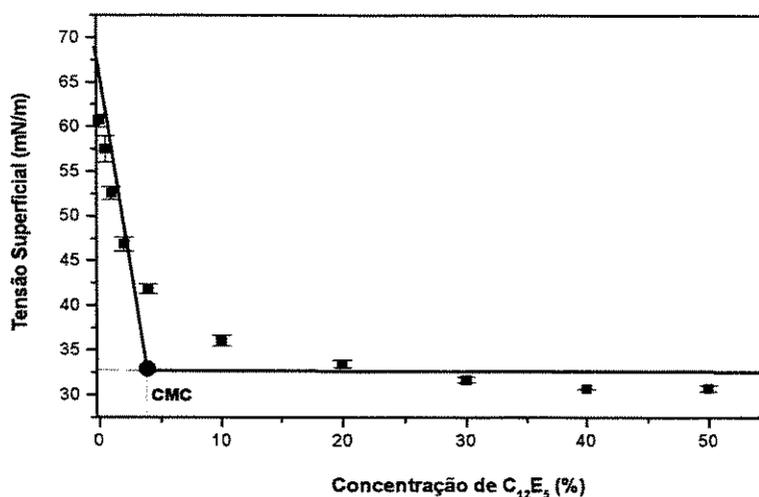


(a)

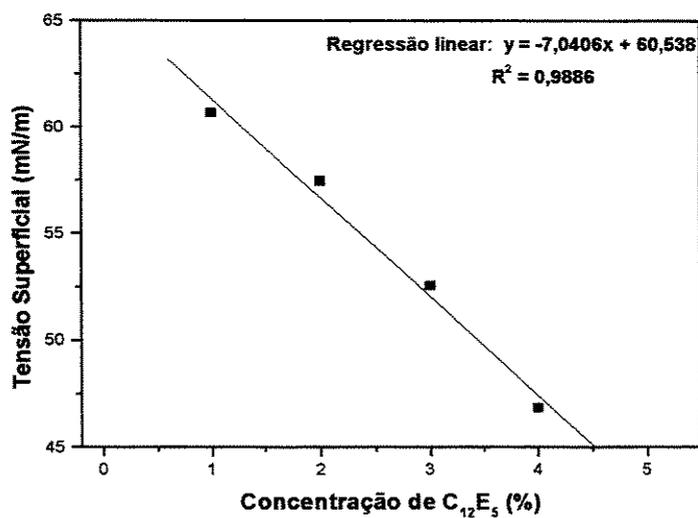


(b)

Figura 52: (a) CMC para o tensoativo C₁₂E₅ em tampão HEPES. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do C₁₂E₅ em lipossomas possui coeficiente angular = -5,3391, coeficiente linear = 54,841 e coeficiente de correlação da reta = 0,9098.

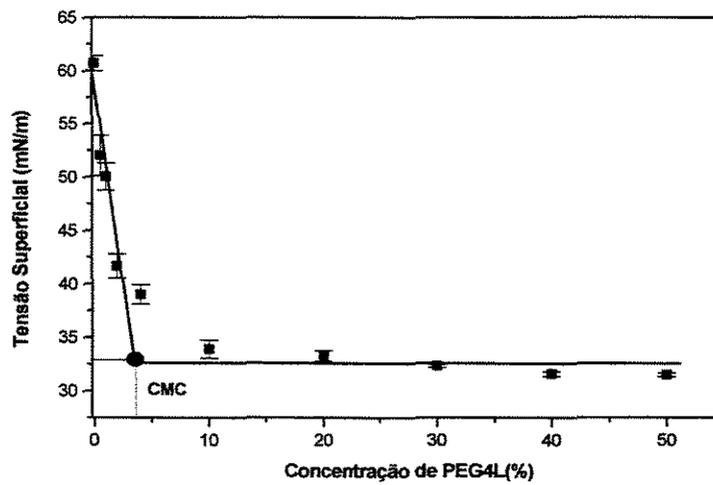


(a)

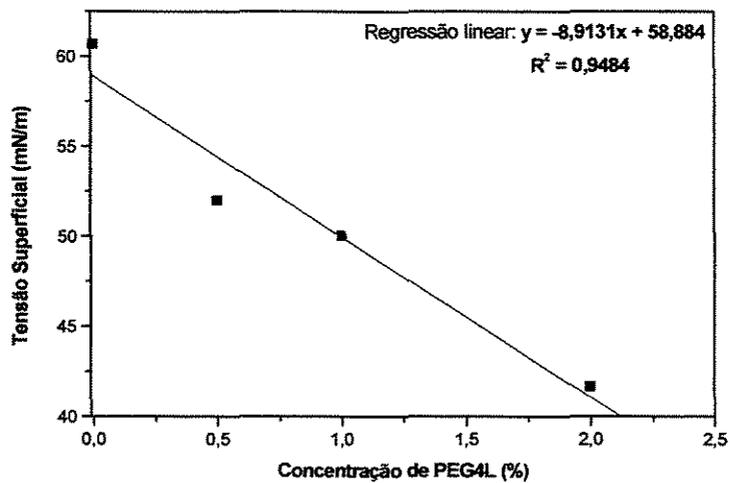


(b)

Figura 53: (a) CMC para o tensoativo C₁₂E₅ presença de 1mM de lipossomas convencionais. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do C₁₂E₅ em lipossomas possui coeficiente angular = - 7,0406, coeficiente linear = 60,538 e coeficiente de correlação da reta = 0,9886.

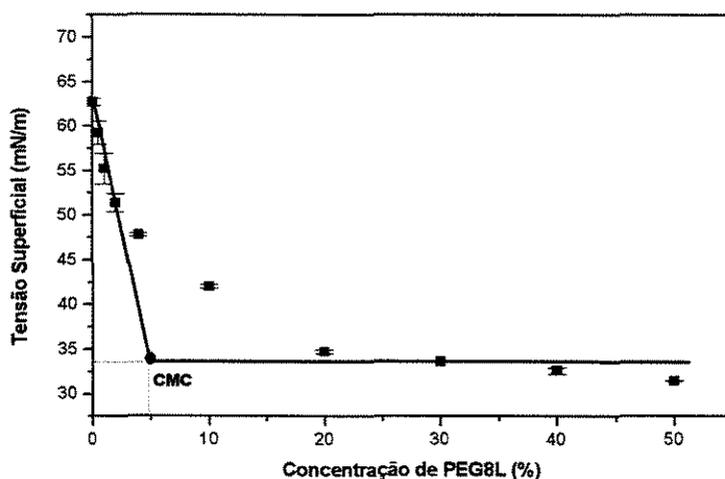


(a)

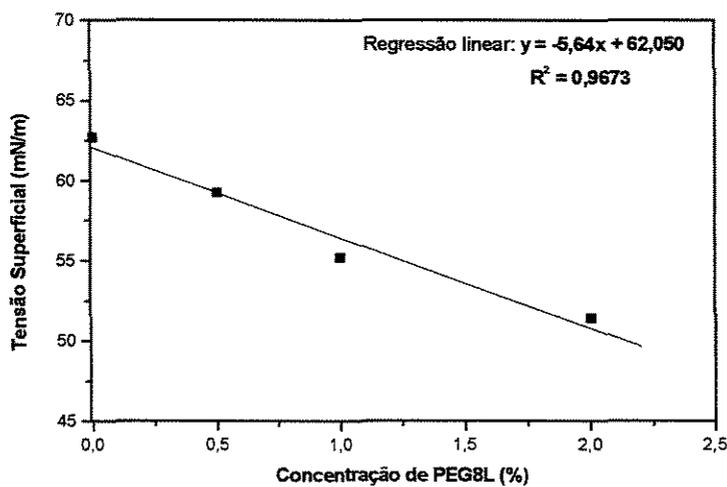


(b)

Figura 54: (a) CMC para o tensoativo PEG4L presença de 1mM de lipossomas convencionais. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do PEG4L em lipossomas possui coeficiente angular = - 8,9131, coeficiente linear = 58,884 e coeficiente de correlação da reta = 0,9484.

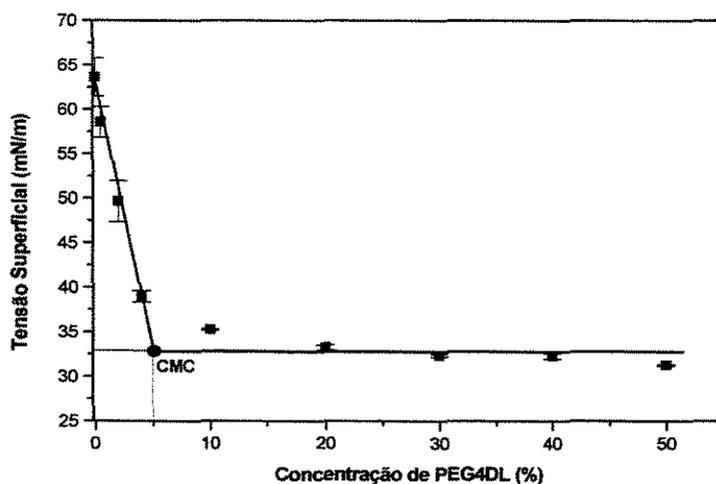


(a)

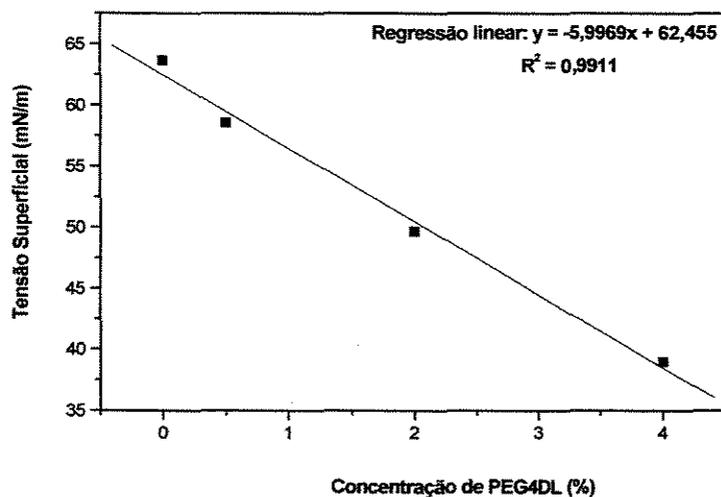


(b)

Figura 55: (a) CMC para o tensoativo PEG8L presença de 1mM de lipossomas convencionais. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do PEG8L em lipossomas possui coeficiente angular = - 5,64, coeficiente linear=62,050 e coeficiente de correlação da reta = 0,9673.

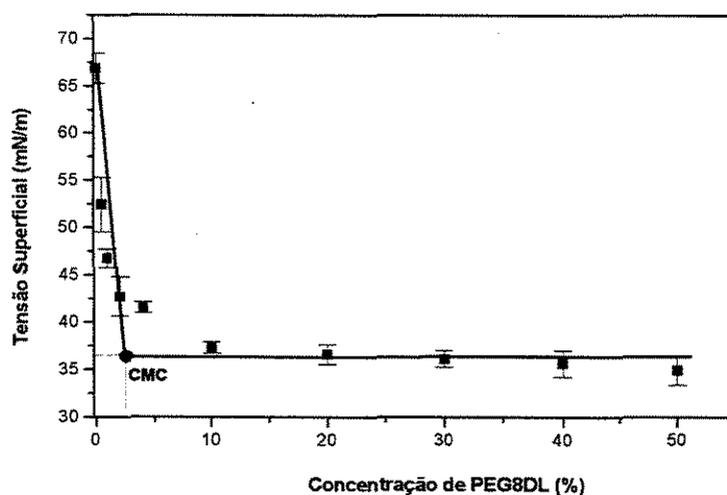


(a)

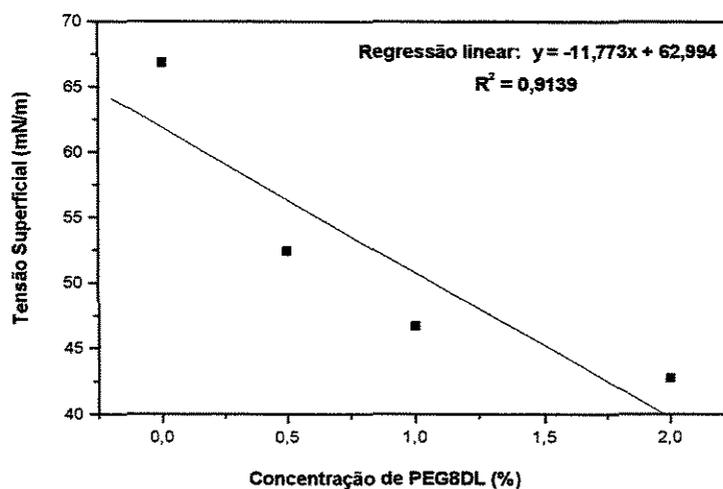


(b)

Figura 56: (a) CMC para o tensoativo PEG4DL presença de 1mM de lipossomas convencionais. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do PEG4DL em lipossomas possui coeficiente angular = - 5,9969, coeficiente linear = 62,455 e coeficiente de correlação da reta = 0,9911.



(a)



(b)

Figura 57: (a) CMC para o tensoativo PEG8DL presença de 1mM de lipossomas convencional. (b) faixa de linearidade utilizada como curva de calibração para valores de incorporação do PEG8DL em lipossomas possui coeficiente angular = -11,773, coeficiente linear = 62,994 e coeficiente de correlação da reta = 0,9139.

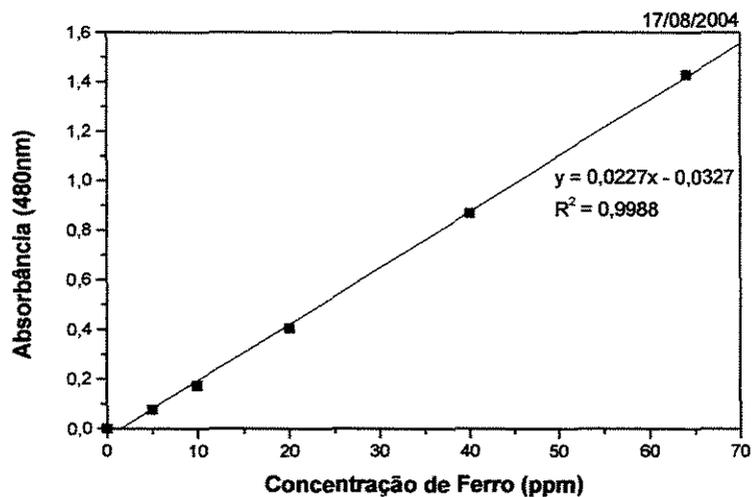


Figura 58: Curva de calibração da análise de ferro (coeficiente angular = 0,0227, coeficiente linear = 0,0327 e coeficiente de correlação da reta = 0,9988).

Anexo II

No Anexo II são apresentadas as distribuições dos magnetolipossomas, lipossomas elástico-magnéticos e dos lipossomas compostos por DMPC:PEG8L (100:0) e DMPC:PEG8L (60:40) antes (a) e após (b) a permeação em membrana com poros de diâmetro nominal de 50nm.

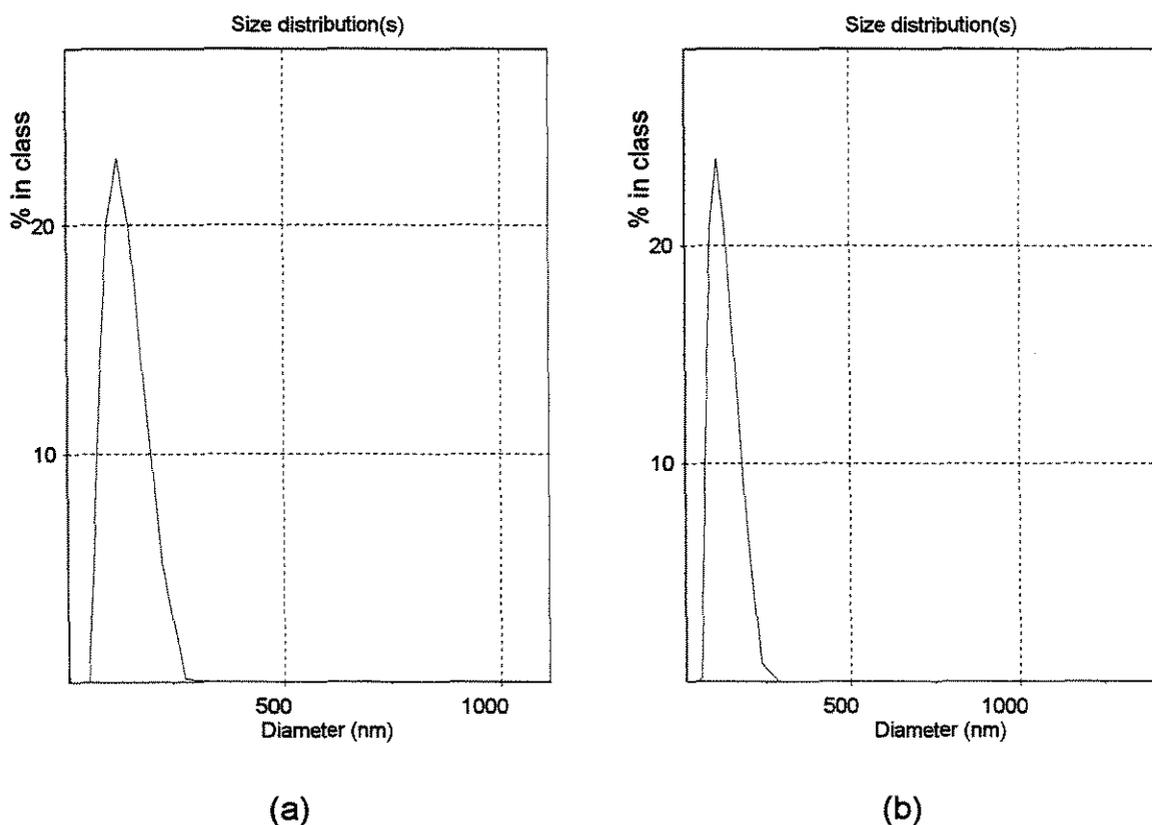
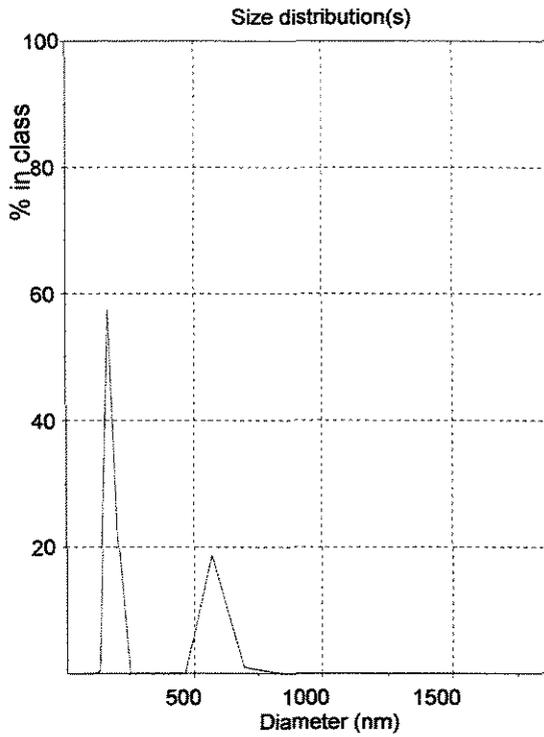
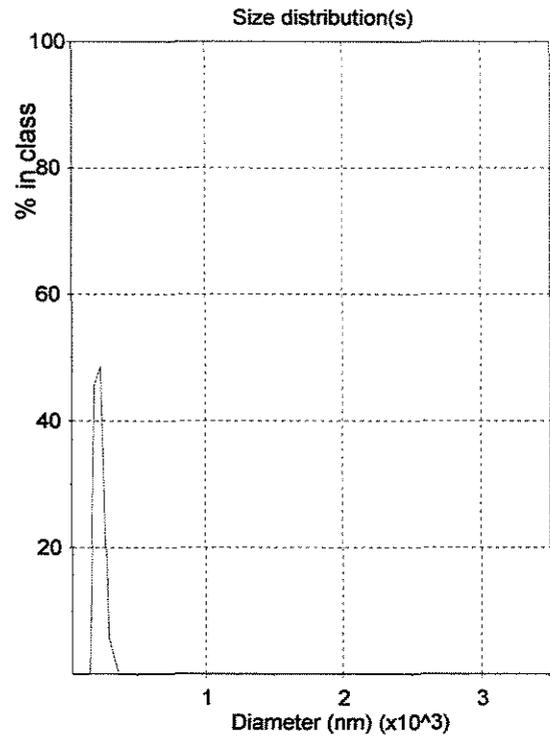


Figura 59: Distribuição de tamanhos de lipossomas convencionais (DMPC:PEG8L, 100:0) antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de diâmetros 50nm.



(a).



(b)

Figura 60: Distribuição de tamanhos de lipossomas elásticos vazios (DMPC:PEG8L, 60:40) antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de 50nm.

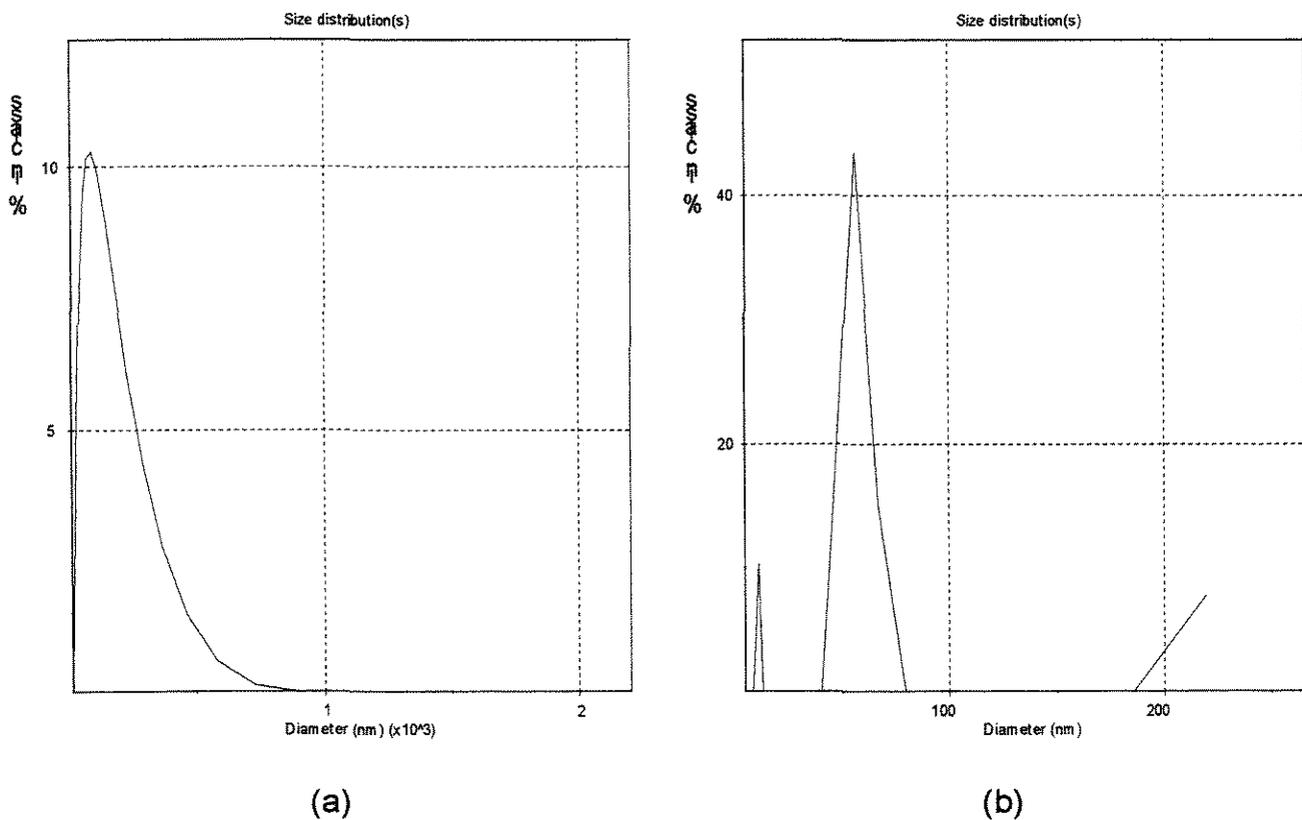
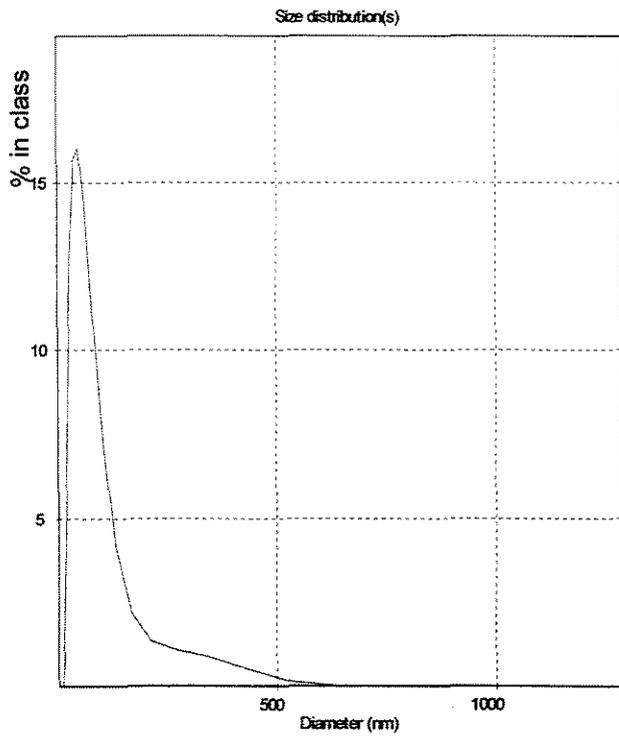
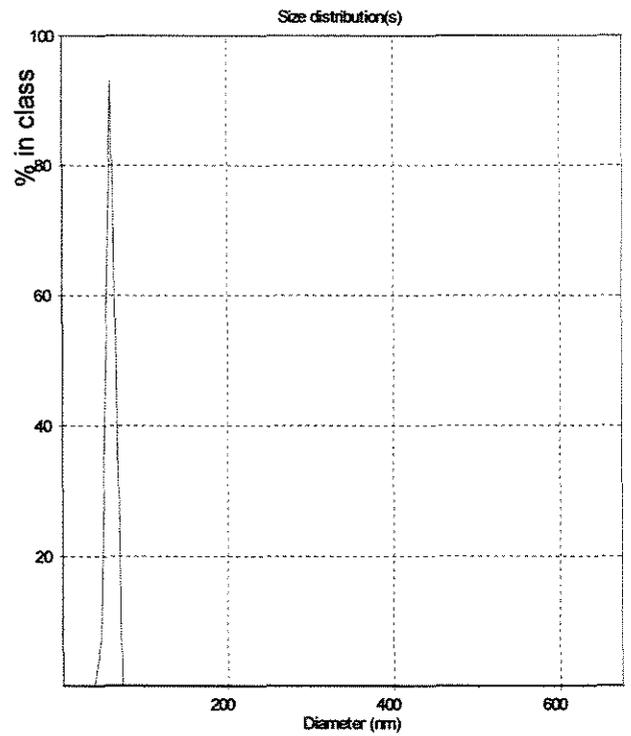


Figura 61: Distribuição de tamanhos de magnetolipossomas antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de 50nm.

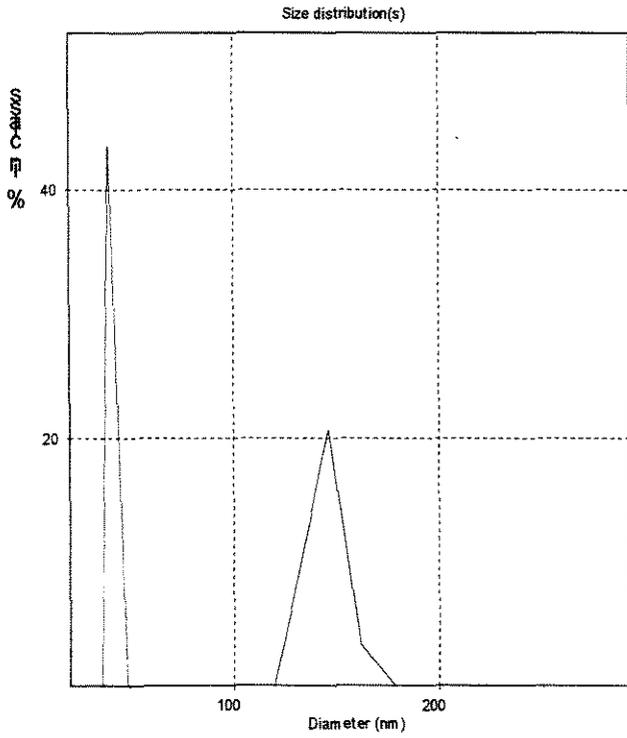


(a)

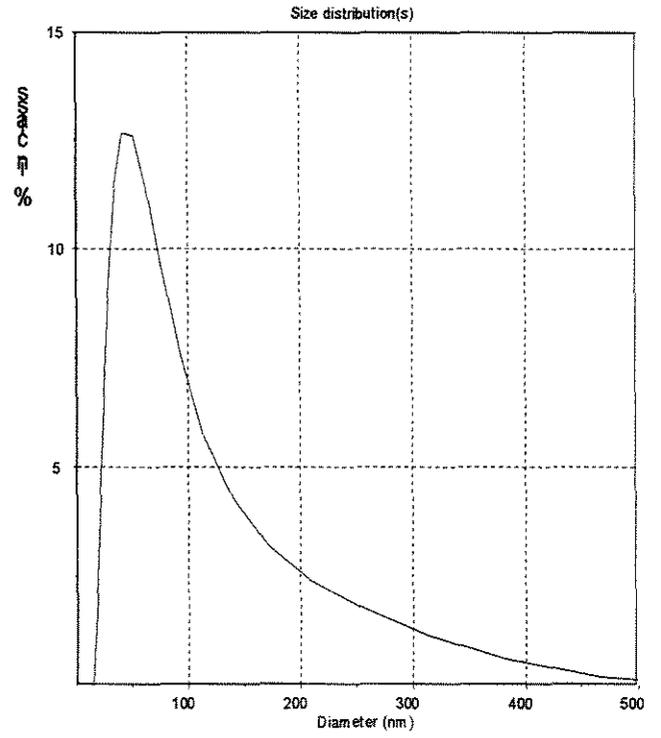


(b)

Figura 62: Distribuição de tamanhos de lipossomas elástico-magnéticos antes (a) e depois (b) da permeação em membrana de policarbonato com poros de 50nm.



(a)



(b)

Figura 63: Distribuição de tamanhos de lipossomas elástico-magnéticos. (a) 30 minutos e (b) 300 minutos após a adição de 40Mol% de PEG8L.

Anexo III

Calibração do campo na Célula Magnética

O campo magnético foi medido no equipamento Mag Meter MGM-20 (Medidor digital de campo magnético) e sendo observada variação menor que 1,5 % nas medidas para uma determinada corrente. A Figura 65 mostra a relação entre a corrente e o campo magnético gerado.

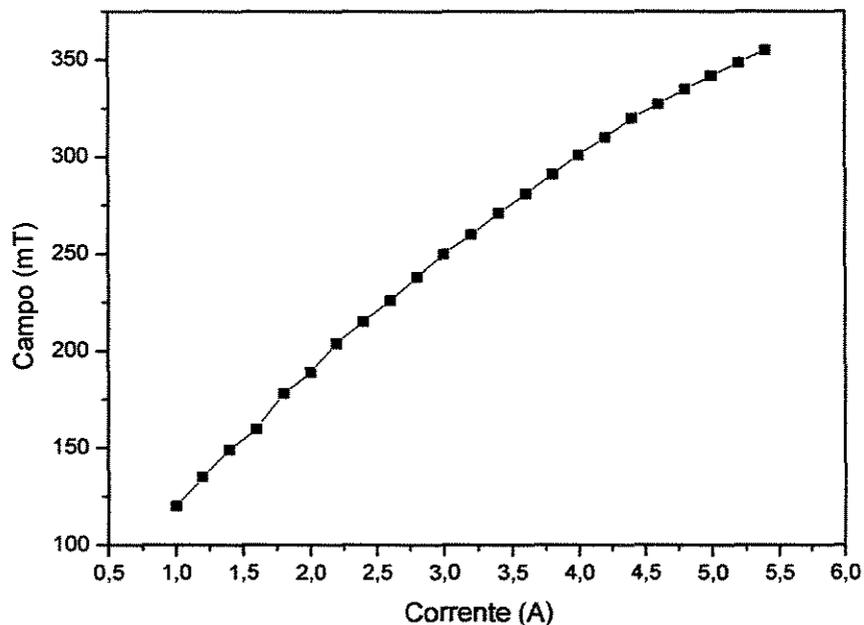


Figura 64: Curva de calibração da intensidade de campo magnético com a corrente elétrica.