



UNICAMP

MARIANA BEATRIZ QUINÁLIA

**“COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA
NITROGENADA PARA O TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA”**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

MARIANA BEATRIZ QUINÁLIA

**“COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA
NITROGENADA PARA O TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA”**

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA BEATRIZ QUINÁLIA
E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Quinália, Mariana Beatriz, 1988-
Q42c Comparação da eficácia de diferentes estratégias de veiculação de
chalcona nitrogenada para o tratamento de leishmaniose cutânea /
Mariana Beatriz Quinália. — Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Lipossomas. 2. Escalonamento de produção. 3. Cisalhamento. 4.
Leishmaniose. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison of efficiency of different strategies to
nitrochalcone delivery for cutaneous leishmaniasis treatment

Palavras-chave em inglês:

Liposomes
Production
scheduling Shear
Leishmaniasis

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]
Francisco Benedito Teixeira Pessine
Marco Vinícius Chaud

Data de defesa: 26-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de aprovação

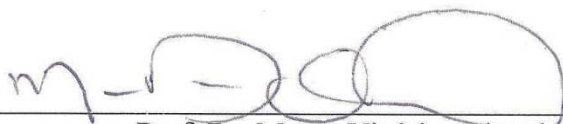
Dissertação de Mestrado defendida por Mariana Beatriz Quinália e aprovada em 26 de julho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine



Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

RESUMO

Processos de alto cisalhamento têm sido utilizados para redução e homogeneização da distribuição de tamanhos de lipossomas em sua produção escalonável. No entanto, a aplicação do cisalhamento pode modificar estruturalmente essas nanopartículas, influenciando a incorporação de fármacos hidrofóbicos. Neste estudo, a chalcona sintética 3-nitro-2-hidroxi-4,6-dimetoxichalcona (CH8), fármaco altamente hidrofóbico indicado para tratamento de leishmaniose cutânea, foi incorporada em lipossomas convencionais produzidos por processos escalonáveis de alto cisalhamento. Os lipossomas foram compostos por fosfatidilcolina de ovo e produzidos por injeção de etanol. Foram utilizados agitador mecânico com impelidor Cowles, Ultra Turrax[®] e microfluidizador para reduzir e homogeneizar o tamanho das partículas. A influência da taxa de cisalhamento foi controlada pelo método de Bangham seguido por extrusão em membranas. Espectros de espalhamento de raios-X a baixo ângulo mostraram que o cisalhamento leva a uma redução na distância interlamelar dos lipossomas, quando comparados ao controle. A distância interlamelar não variou com a intensidade do cisalhamento na faixa de agitação obtida com o impelidor Cowles, mas diminuiu com o aumento do cisalhamento provocado pelo Ultra Turrax[®]. A constante elástica, relacionada com a rigidez da bicamada e dependente da estrutura dos lipossomas, aumentou proporcionalmente com a taxa de cisalhamento para os dois agitadores. O cisalhamento também diminuiu o diâmetro médio dos lipossomas e a distribuição de tamanhos. Inicialmente, CH8 foi incorporada em lipossomas pré-formados. Os resultados mostraram que a expulsão e precipitação do fármaco incorporado foram proporcionais à intensidade do cisalhamento aplicado. Essa limitação foi contornada pela incorporação de uma baixa concentração de CH8 durante a formação dos lipossomas. A taxa de cisalhamento produzida pelo impelidor Cowles favoreceu a elasticidade da bicamada lipossomal, proporcionando alta eficiência de incorporação e capacidade de carregamento da CH8. Assim, a elasticidade da bicamada é fator determinante para a capacidade de incorporação de fármacos hidrofóbicos em lipossomas. Estas descobertas constituem uma melhoria nos processos de alto cisalhamento utilizados para carregamento de CH8 e contribuem para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes para o tratamento de leishmaniose cutânea.

Palavras chave: Lipossomas, cisalhamento, CH8, escalonamento, leishmaniose.

ABSTRACT

High shear processes have been used to reduce the size and homogenize the size distribution of liposomes in their scalable production. However, high shear rates modify the liposome structure which may affect the loading of hydrophobic drugs. In this study, synthetic chalcone 3-nitro-2-hydroxy-4,6-dimethoxychalcone (CH8), a highly hydrophobic drug indicated to treat cutaneous leishmaniasis, was incorporated in conventional liposomes produced by scalable high shear processes. Liposomes were composed by egg phosphatidylcholine and produced by ethanol injection. Cowles impeller, Ultra Turrax[®] stirrers and microchannel microfluidizer were used to reduce and homogenize the size of the liposomes. The shear rate was controlled by Bangham's method followed by membrane extrusion. Small angle X-ray scattering spectra showed that the shearing reduced the interlamellar distance of the liposomes compared to the control. The interlamellar distance did not change with the shearing intensity in the range of Cowles stirring, but it decreased for higher shearing provided by the Ultra Turrax[®]. The elastic constant, which is related to the stiffness and depends on the structure of the liposomes, increased with increasing shearing intensity for both stirrers. The shearing also reduced the mean diameter of the liposomes and the size distributions. Initially, CH8 was incorporated into pre-formed liposomes. The results showed the expulsion and precipitation of loaded CH8 was proportional to the intensity of the applied shear rate. This limitation was circumvented by incorporating a low concentration of CH8 (0.2 mol/m³) during the formation of liposomes. The shear rate provided by the Cowles stirrer favored the elasticity of the bilayer and yielded high incorporation efficiency and CH8-loading. Therefore, the elasticity of the bilayer is a determining factor for the loading of hydrophobic drugs in liposomes. These findings constitute an improvement in the high shear process used to load CH8 and to the development of most effective pharmaceutical forms for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key words: Liposomes, CH8, scale-up, high shear processes, leishmaniasis.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xv
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. TECNOLOGIA PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS	5
3.1.1. LIPOSSOMAS.....	5
3.1.1.1. LIPOSSOMAS EM SISTEMAS TRANSDÉRMICOS	7
3.1.1.2. PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS	9
3.1.1.2.1. MÉTODOS ESCALONÁVEIS	11
3.1.1.3. FORÇAS DE CISALHAMENTO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO.....	13
3.1.1.3.1. AGITAÇÃO MECÂNICA COM IMPELIDORES	15
3.1.1.3.2. MICROFLUIDIZADOR DE MULTICANAIS.....	17
3.1.1.4. INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS HIDROFÓBICOS	19
3.2. LEISHMANIOSE	21
3.2.1. EPIDEMIOLOGIA	23
3.2.2. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS	24
3.2.3. NITROCHALCONA CH8	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAL	31
4.2. EQUIPAMENTOS	32
4.3. PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS VAZIOS (LC)	33
4.3.1. MÉTODO DE BANGHAM COM EXTRUSÃO EM MEMBRANAS	33
4.3.2. MÉTODO DE INJEÇÃO DE ETANOL	34
4.3.3. MICROFLUIDIZAÇÃO	35
4.3.4. INCORPORAÇÃO DE CHALCONA CH8.....	35
4.4. CÁLCULO DA TAXA DE CISALHAMENTO	35
4.5. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES ELÁSTICAS DOS LIPOSSOMAS	36

4.6.	DISTÂNCIA INTERLAMELAR DOS LIPOSSOMAS	36
4.7.	CARACTERIZAÇÕES.....	37
4.7.1.	DIÂMETRO E POLIDISPERSIDADE.....	37
4.7.2.	POTENCIAL ZETA	38
4.7.3.	QUANTIFICAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	39
4.7.4.	QUANTIFICAÇÃO DA CH8	40
4.7.4.1.	PRECISÃO	40
4.7.4.2.	EXATIDÃO.....	40
4.7.5.	EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E CAPACIDADE DE CARREGAMENTO DA CH8	41
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.	Elasticidade de lipossomas produzidos por alto cisalhamento e incorporação de nitrochalcona CH8	45
5.2.	Melhoria de processos com altas taxas de cisalhamento para incorporação de nitrochalcona CH8 em lipossomas.....	67
6.	CONCLUSÕES	89
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
8.	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE I: CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FOSFATO.....	101
	APÊNDICE II: CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH8	102

*Aos meus pais, Rosa Maria Polimeno Quinália e Dilson Quinália,
e à minha irmã, Vivian Quinália, que sempre respeitaram minhas decisões
e me apoiaram em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só foi possível graças a Deus e a uma série de pessoas a quem devo muitos e sinceros agradecimentos. Primeiramente agradeço à Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela orientação e incentivo durante todo o período de trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre e à Eng. Júlia Exaltação Trevisan pela oportunidade de acompanhar e aprender com seu trabalho durante meu período de estágio no laboratório.

Agradeço em especial ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela paciência, amizade e disponibilidade.

Agradeço aos professores da Faculdade de Engenharia Química pelos conhecimentos e experiências transmitidas.

Agradeço a Dra. Leide Passos Cavalcanti, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo espaço cedido para as análises de SAXS e pelo auxílio fundamental na interpretação dos dados obtidos.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas da UNICAMP que de alguma forma estiveram presentes, participaram e contribuíram para meu processo de aprendizado. Em especial, agradeço aos colegas Rafael Lichy e Jessica Lessa Bernardes pelo tempo que passamos trabalhando e aprendendo juntos. Aos colegas do LDPB que tanto me ajudaram com sua amizade e experiência.

Agradeço em especial aos meus pais, Rosa Maria Polimeno Quinália e Dilson Quinália, e à minha irmã, Vivian Quinália, que estiveram sempre presentes me apoiando, me incentivando e rezando por mim, bem como a todos os meus familiares que são minha base e meu apoio. Muito obrigada.

Agradeço também a todos os meus amigos pessoais e a meu namorado, Gabriel Losada Saraiva, que são fundamentais para meu equilíbrio emocional, por toda paciência, compreensão, carinho e incentivo.

Agradeço, por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência”

Santo Agostinho

1. INTRODUÇÃO

Lipossomas são agregados coloidais de fosfolipídios. São amplamente utilizados para encapsulação e/ou incorporação de fármacos visando aumento da especificidade dos compostos ativos com seus sítios de ação, proteção das moléculas sujeitas à degradação, redução de toxicidade e possibilidade de promover liberação sustentada (ISRAELACHVILI, 1992; LASIC, 1993; FRÉZARD, 1999; BAWARSKI *et al.*, 2008).

A inserção de fármacos hidrofóbicos na bicamada lipídica tende a desestabilizar a estrutura do lipossoma. Lipossomas produzidos pelo método laboratorial de Bangham (BANGHAM *et al.*, 1965) possuem bicamadas fluidas, propícias à inserção dessas moléculas. Contudo, quando são utilizadas altas taxas de cisalhamento no processo de produção, a distância interlamelar dos lipossomas é reduzida pela perda de água, conforme descrito por análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (TREVISAN *et al.*, 2011). Esse estreitamento da distância interlamelar torna a bicamada do lipossoma mais rígida, dificultando a incorporação de fármacos hidrofóbicos.

Processos que envolvem altas taxas de cisalhamento possuem características atrativas para redução e homogeneização de tamanhos de lipossomas. Há disponibilidade comercial de equipamentos como agitadores mecânicos, microfluidizadores de multicanais e impactores de alta pressão, que têm operação simples e possibilitam aumento de escala da produção de lipossomas. Porém, quando fármacos hidrofóbicos são incorporados, os lipossomas produzidos com alto cisalhamento promovem expulsão e precipitação das moléculas, levando à perda de eficiência no processo. Essa dificuldade tem incentivado a busca por alternativas, tais como alteração da composição lipídica, adição a lipossomas pré-formados e complexação desses fármacos à ciclodextrinas (GREGORIADIS, 1993; SHARMA, 2003; JOGUPARTHI & ANDERSON, 2009; ZANCHETTA, 2009; KAN *et al.*, 2011).

Leishmaniose é uma doença infecciosa, causada por protozoários intramacrofágicos do gênero *Leishmania*. O Brasil está entre os 6 países (Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil, e Peru) que, juntos, apresentam 90% dos casos de leishmaniose cutânea, forma mais comum da doença, com incidência global de aproximadamente 1,5 milhões de casos (MITROPOULUS *et al.*, 2010; ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2011). Nos últimos anos, a leishmaniose deixou de ser característica de áreas rurais e tem estado cada vez mais presente nos centros urbanos. Por isso, a

pesquisa de formas farmacêuticas mais eficazes para administração tópica de antileishmaniais tem sido incentivada como necessidade imediata (BEZERRA *et al.*, 2004).

A nitrochalcona 3-nitro-2-hidroxi-4,6-dimetoxichalcona (CH8) é um agente antileishmanial indicado para tratamento da forma cutânea da doença. Estudos anteriores têm demonstrado seletividade da CH8 contra o parasita, com dose intralesional eficaz de apenas 0,3 mM, 100 vezes mais potente que o antimonial de primeira escolha clínica Pentostam[®]. Além disso, CH8 apresenta menor citotoxicidade em relação aos fármacos de referência (BOECK *et al.*, 2006). No entanto, a alta hidrofobicidade da CH8 limita sua penetração nas camadas da pele.

A incorporação de CH8 em lipossomas compostos por lipídios com baixa temperatura de transição de fases, como fosfatidilcolina de ovo (EPC), foi utilizada na produção de lipossomas elásticos na tentativa de buscar melhor eficácia do fármaco em tratamentos tópicos. Foram utilizados lipossomas convencionais ou recobertos com polioxietilenoglicol-8-lauril éster (PEG-8L). Lipossomas foram preparados pelo método laboratorial de Bangham seguido por extrusão através de membranas de polycarbonato, resultando em diâmetro médio próximo a 100 nm. A CH8 foi incorporada a lipossomas pré-formados. Os resultados mostraram maior quantidade de CH8 em tecidos de ratos infectados quando lipossomas convencionais foram administrados. Assim, a incorporação de CH8 conferiu maior elasticidade aos lipossomas convencionais devido ao seu empacotamento na bicamada lipídica, promovendo maior penetração na pele (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2011). A formulação bem sucedida incentiva a busca pela produção escalonável de lipossomas contendo CH8, visando desenvolvimento tecnológico de um novo produto.

O presente trabalho parte dos resultados anteriores para estudar os efeitos da taxa de cisalhamento sobre a incorporação de CH8 em lipossomas de EPC, buscando comparar diferentes processos escalonáveis, em termos de eficiência de incorporação, capacidade de carregamento do fármaco e propriedades físico-químicas dos lipossomas.

2. OBJETIVO

Contribuir com o desenvolvimento de produtos, processos de produção e formas farmacêuticas mais eficazes para tratamento de leishmaniose cutânea a partir do estudo da incorporação da chalcona sintética 3-nitro-2-hidroxi-4,6-dimetoxichalcona (CH8) em lipossomas convencionais produzidos por processos escalonáveis de alto cisalhamento.

As seguintes metas foram estabelecidas para atingir o objetivo proposto:

- Incorporação da CH8 em lipossomas pré-formados por injeção de etanol com redução e homogeneização de tamanhos;
- Otimização do processo de incorporação da CH8 durante a produção dos lipossomas pelo método de injeção combinada de etanol e fármaco com redução e homogeneização de tamanhos;
- Avaliação da elasticidade das bicamadas de lipossomas produzidos por alto cisalhamento determinando a variação da distância interlamelar por análises de SAXS;
- Determinação da concentração de CH8 nos lipossomas a fim de prevenir precipitação do fármaco e aumentar a estabilidade do sistema;
- Caracterização dos lipossomas com e sem CH8 em relação a tamanho, polidispersidade, potencial zeta, capacidade de carregamento e eficiência de incorporação de CH8;
- Análise das características dos lipossomas obtidos a fim de identificar as melhores condições de processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tecnologia para veiculação de fármacos

Desenvolvimento de novas estratégias para veiculação de fármacos é um dos maiores desafios na área da saúde. São muitas as dificuldades nesse sentido, tais como fármacos que apresentam insolubilidade, afinidade por tecidos específicos e toxicidade, levando por consequência à baixa biodisponibilidade da substância no local de ação (RAWAT *et al.*, 2006).

A nanotecnologia possibilita o controle da matéria em escalas muito reduzidas, até mesmo subatômicas (RAWAT *et al.*, 2006), o que a torna essencial para a área da saúde, especialmente a farmacêutica. Avanços em desenvolvimento de novos produtos e processos mais eficientes para veiculação de fármacos são as principais aplicações da nanotecnologia nessa área (D'AQUINO *et al.*, 2006).

Os chamados *nanocarreadores* são partículas de dimensões nanométricas utilizadas na administração de fármacos. Apresentam alta razão área/volume e propriedades de superfície que podem ser manipuladas, de acordo com a ação desejada, através da engenharia de partículas. Com isso, é possível o aumento da especificidade de interação das substâncias ativas com o organismo (D'AQUINO *et al.*, 2006).

Nesse contexto, os lipossomas apresentam-se como um dos tipos de nanocarreadores de maior destaque por possuírem grande similaridade estrutural com as células, o que lhes confere maior capacidade de penetração intracelular.

3.1.1. Lipossomas

Lipossomas são vesículas compostas por agregados de fosfolipídios, de caráter anfifílico, que, em meio aquoso, se auto-organizam em bicamadas, podendo ser formados por uma ou mais lamelas concêntricas em torno de um volume aquoso central (Figura 3.1). Para atingir estabilidade termodinâmica, essas estruturas curvam-se e fecham-se sobre si mesmas, formando vesículas esféricas com diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micrômetros.

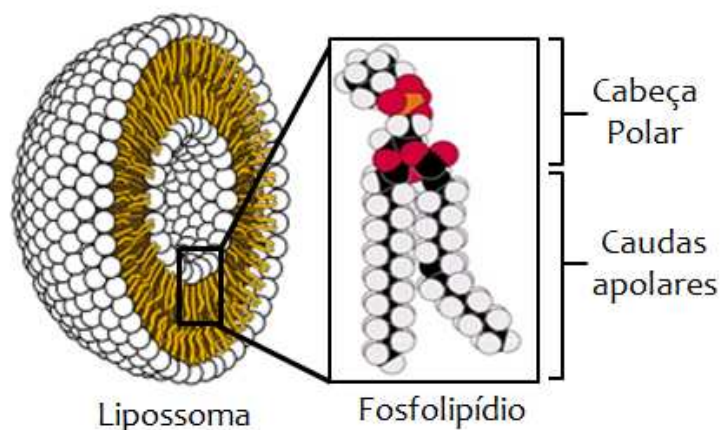


Figura 3.1 Estrutura do lipossoma e caráter anfifílico dos fosfolípidios

Durante sua formação, o lipossoma encapsula parte do meio aquoso em que se encontra disperso, englobando as substâncias hidrofílicas presentes no meio. A bicamada, por sua vez, é capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas e comporta-se como uma membrana semipermeável em relação ao material encapsulado no cerne aquoso das vesículas. Além disso, algumas substâncias com caráter anfifílico podem se alojar na interface lamelar (Figura 3.2). Por essa versatilidade, os lipossomas são considerados nanocarreadores de ampla aplicação (ISRAELACHVILI, 1992; LASIC, 1993; FRÉZARD, 1999; BAWARSKI *et al.*, 2008).

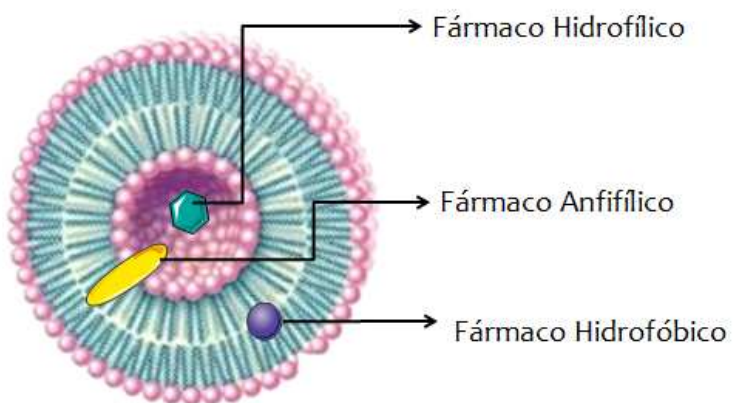


Figura 3.2: Localização de moléculas no lipossoma de acordo com sua hidrofiliicidade

Lipossomas são biodegradáveis, não tóxicos e capazes de interagir muito bem com as células devido à similaridade da composição de suas membranas (LASIC, 1993). A utilização dessas nanopartículas para veiculação de fármacos protege o ativo da degradação, leva à redução da toxicidade do fármaco e possibilita tratamentos de liberação sustentada. Para aumentar ainda

mais a aplicação terapêutica, a superfície dos lipossomas é passível de modificações que lhe conferem propriedades específicas, através da adição de ligantes (BATISTA *et al.*, 2007; BAWARSKI *et al.*, 2008).

Costuma-se classificar os lipossomas com base em suas propriedades físico-químicas ou mecanismo de ação. Algumas classificações mais comuns são: convencionais (compostos apenas por fosfolipídios e colesterol); multilamelares (MLV's) ou unilamelares (SUV's); catiônicos ou aniônicos; pH-sensitivos; elásticos; imunolipossomas, entre outros (BAWARSKI *et al.*, 2008).

O desempenho desses nanocarreadores é determinado por características específicas como: temperatura de transição de fases dos fosfolipídios, lamelaridade, carga superficial e tamanho das partículas. Tais características dependem da composição lipídica e do processo de produção utilizado para formação das vesículas.

Dentre os fosfolipídios mais utilizados para constituir lipossomas, as fosfatidilcolinas destacam-se por apresentarem certa estabilidade frente a variações de pH e da concentração de sal no meio, tendendo a formar bicamadas estáveis em solução aquosa (BATISTA *et al.*, 2007). Lipossomas considerados ideais para utilização em sistemas de veiculação de fármacos possuem tamanhos na faixa nanométrica, com baixa polidispersidade e altíssima área superficial (LASIC, 1993).

Apesar de todos os aspectos positivos relacionados aos lipossomas, suas aplicações ainda são limitadas por problemas no escalonamento do processo de produção, dificuldades na remoção de solventes residuais, baixo percentual de carregamento de fármacos, dificuldades na esterilização, baixa estabilidade das partículas formadas e alto custo associado (BATISTA *et al.*, 2007, ZUO *et al.*, 2012).

3.1.1.1. Lipossomas em sistemas transdérmicos

Quando a administração de um fármaco se dá por via oral, ocorre o fenômeno chamado “efeito de primeira passagem”, que consiste na degradação da substância ativa pelas enzimas gástricas, intestinais, bacterianas e hepáticas antes da sua chegada à corrente sanguínea, reduzindo drasticamente a concentração do fármaco no local de ação. Para evitar este efeito, é possível utilizar a via transdérmica para administração de fármacos de maneira não invasiva e possibilitar maior adesão ao tratamento através de mecanismos de liberação controlada (CEVC E BLUME, 2001).

A via transdérmica, no entanto, está sujeita à baixa permeabilidade da pele humana, que possui poros com cerca de 30 nm de diâmetro, além de possíveis irritações dérmicas relacionadas a determinadas formulações (CEVC E BLUME, 2001; CEVC *et al.*, 2002).

Para que seja possível aplicação de lipossomas em sistemas transdérmicos, é necessário que estes possuam propriedades elásticas suficientes para vencer a resistência imposta pelas camadas da pele (Figura 3.3). A incorporação de tensoativos na superfície dos lipossomas resulta na desestabilização da bicamada lipídica por diminuição da tensão superficial, conferindo-lhe alta fluidez e elasticidade, o que os torna capazes de atravessar barreiras semipermeáveis mantendo sua integridade (VAN DEN BERGH *et al.*, 1999; CEVC *et al.*, 2002; ELSAYED *et al.*, 2007).

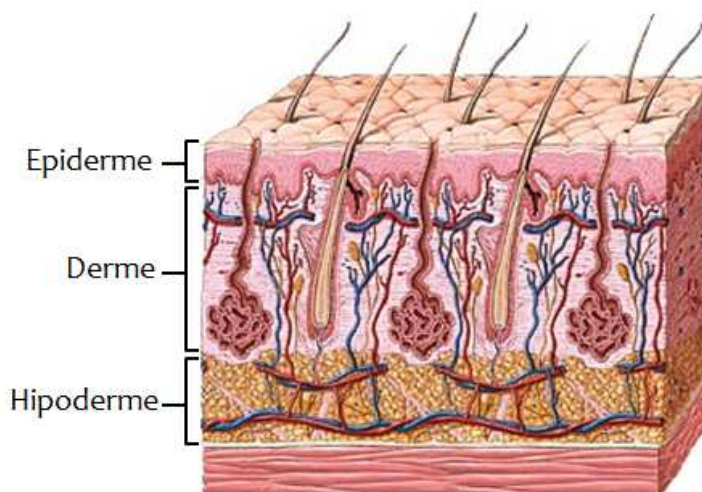


Figura 3.3: Esquema de secção transversal da pele humana

Com o objetivo de estudar o comportamento de lipossomas elásticos, OLIVEIRA (2007) incorporou o tensoativo polioxietilenoglicol-8-lauril éster (PEG-8L) em lipossomas convencionais compostos por fosfatidilcolina de ovo (EPC). Foi constatado que a presença do PEG-8L reduz a tensão superficial da dispersão, mais expressivamente para concentração inicial de tensoativo da ordem de 40% molar em relação ao lipídio. O coeficiente de permeabilidade dos lipossomas elásticos foi 10 vezes maior que dos convencionais.

Paralelamente às modificações físico-químicas, as propriedades elásticas dos lipossomas estão também relacionadas com empacotamento e propriedades mecânicas da estrutura, ou seja, o modo de produção das partículas pode fornecer diferentes quantidades de energia ao sistema, resultando em comportamentos estruturais distintos (TREVISAN, 2010).

3.1.1.2. Produção de lipossomas

A preparação de lipossomas tem sido estudada desde 1965, quando o hematologista britânico Alec D. Bangham descreveu um método de formação de lipossomas por hidratação de filmes lipídicos. O método de Bangham é até hoje o mais conhecido e difundido para produção dessas partículas e parte da evaporação rotatória de uma solução orgânica de fosfolipídios, colesterol e outros compostos hidrofóbicos para formação de um filme lipídico seco. A posterior hidratação do filme em um meio aquoso causa desprendimento gradativo dos lipídios com consequente formação de lipossomas (BANGHAM *et al.*, 1965; LASIC, 1993). Lipossomas produzidos pelo método de Bangham são geralmente MLV's e se distribuem em larga faixa de tamanhos.

Desde então, muitos outros métodos de fabricação de lipossomas têm sido desenvolvidos e empregados. Dentre eles, destacam-se a evaporação em fase reversa, a remoção de detergentes e o método de injeção de solventes voláteis.

Evaporação em fase reversa consiste na solubilização dos lipídios em um solvente orgânico volátil, adição de água sob agitação e posterior remoção do solvente, provocando inversão das micelas para formação de lipossomas (SZOKA & OLSON, 1980).

No método de remoção de detergentes, lipídios são solubilizados em tensoativos formando uma solução de micelas mistas detergente/fosfolipídios. A formação dos lipossomas se dá na fase de remoção do detergente, que é feita através de diluição, diálise ou filtração em gel (NEW, 1990).

Já no método de injeção de solventes voláteis, lipídios são solubilizados em solvente orgânico (usualmente etanol ou éter) a baixas concentrações e injetados no meio aquoso onde se deseja formar os lipossomas. O solvente é posteriormente removido através de diálise, diafiltração ou evaporação (BATZRI & KORN, 1973; CAFISO *et al.*, 1981).

Além destas técnicas principais, outras envolvem a formação de lipossomas a partir de vesículas pré-formadas através de fusão, ciclos de resfriamento/aquecimento ou de desidratação/hidratação. Algumas das técnicas empregadas para a produção de lipossomas, bem como suas principais vantagens e desvantagens podem ser vistas na Tabela 1.

Observando características comuns aos processos de produção de lipossomas, pode-se afirmar que estes partem de duas abordagens diferentes. A abordagem “*top-down*” (cominuição) envolve a formação de partículas maiores e com larga distribuição de diâmetros seguida de

processos que aplicam força mecânica, química ou outra forma de energia para redução e homogeneização dos tamanhos (LASIC, 1993). A segunda abordagem, “*bottom-up*” (síntese), preconiza a formação dos lipossomas já em escala nanométrica e com baixa polidispersidade, o que demanda alto conhecimento sobre mecanismos de formação da partícula (JAHN *et al.*, 2004).

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos principais métodos de preparação de lipossomas (Adaptado de VILLANOVA & CONSIGLIERI, 2000)

Métodos de Preparação	Vantagens	Desvantagens
Hidratação de Filme Lipídico com Agitação Mecânica	Simples e rápido Formação de MLV's	Baixa eficiência de encapsulação Dispersão heterogênea dos MLV Não adaptável à escala industrial
Sonicação	Homogeneidade da suspensão Formação de SUV's	Aquecimento degrada os lipídios Não adaptável à escala industrial Baixa eficiência de encapsulação Contaminação pela sonda
Extrusão com Prensa Francesa	Simples, reproduzível e não agressivo Altas concentrações de lipídios Alta eficiência de encapsulação Adaptável à escala industrial	Difícil manutenção do aparelho Preparação prévia de MLV's
Extrusão com membranas de policarbonato	Simples e reproduzível Altas concentrações de lipídios Alta eficiência de encapsulação	Preparação prévia de MLV's Pequenos volumes são utilizados
Microfluidização	Alta eficiência de encapsulação Adaptável à escala industrial	Preparação prévia de MLV's Difícil manutenção do aparelho
Injeção de Etanol	Homogeneidade da suspensão Simples e rápido Adaptável à escala industrial	Baixa eficiência de encapsulação Baixa concentração de vesículas
Evaporação em Fase Reversa	Alta eficiência de encapsulação	Exposição a ultrassom e solventes Técnica complexa Não adaptável à escala industrial
Infusão de Éter	Adaptável à escala industrial	Baixa eficiência de encapsulação Exposição a altas temperaturas e solventes Heterogeneidade da suspensão
Liofilização/Reidratação	Adaptável à escala industrial Alta eficiência de encapsulação Estabilidade da preparação	Heterogeneidade da suspensão Preparação prévia de MLV's
Congelamento/Descongelação	Alta eficiência de encapsulação Simples e rápido	Preparação prévia de MLV's ou SUV's Dificuldade de preparação na presença de fosfolipídios neutros
Remoção de detergentes	Homogeneidade da suspensão Condições suaves	Baixa eficiência de encapsulação Processo lento Difícil remoção do detergente

3.1.1.2.1. Métodos escalonáveis

A partir da década de 90, com aumento do interesse na aplicação de lipossomas em diversas áreas, estudos têm sido desenvolvidos no sentido de atender a demanda por esse tipo de partículas através de processos escalonáveis. Os principais métodos envolvem atomização por “*spray drying*”, desidratação-rehidratação (DRV), injeção de etanol e homogeneização em alta pressão.

O método “*spray drying*”, ou secagem por atomização, utiliza um solvente orgânico volátil para dissolução dos lipídios, realiza a atomização da solução orgânica em uma câmara de secagem com ar quente e coleta as partículas formadas em um ciclone. Os lipossomas assim formados são MLV's, possuem alta estabilidade em refrigerador, elevada área superficial e elevada eficiência de hidratação. Outras vantagens desta técnica são a facilidade de operação, boa reprodutibilidade, grande versatilidade na composição das vesículas e elevada produtividade (KIKUCHI *et al.*, 1991; LASIC, 1993)

No método DRV, lipossomas pré-formados são submetidos à desidratação por liofilização e posteriormente reconstituídos por reidratação. Dependendo da sua composição, os lipossomas podem ser reconstituídos em MLV's ou grandes agregados e em SUV's. Em geral, adiciona-se um açúcar (trealose, manitol ou sacarose) para proteção térmica das estruturas na desidratação e reidratação (GREGORIADIS, 1993).

O método de injeção de etanol consiste na adição rápida de uma solução de etanol, contendo os lipídios dissolvidos, em uma fase aquosa bem agitada. Os lipossomas formados são do tipo MLV's com população heterogênea, sendo necessário associar o método a uma etapa para homogeneização dos tamanhos (LASIC, 1993). Uma maneira de aplicar essa etapa é manter alta frequência de agitação mesmo após injeção da solução de etanol, a fim de atingir menor polidispersidade do sistema. A eficiência da agitação mecânica para cominuição das partículas depende do grau de cisalhamento empregado, como será abordado na seção 3.1.1.3. JUSTO (2003) analisou o potencial de escalonamento do método de injeção de etanol com agitação do tipo hélice para produção e homogeneização do tamanho de lipossomas de fosfatidilcolina de soja e colesterol. Foi utilizada a Equação (1), proposta por SCHMIDELL *et al.* (2001), para ampliação de escala:

$$N_2^3 = N_1^3 \cdot \left(\frac{V_2}{V_1} \right) \quad (1)$$

onde: N = Frequência de rotação (rpm) e V = Volume de amostra (mL).

Os estudos mostraram também que o tipo e a intensidade da agitação da fase aquosa, temperatura do processo e vazão de injeção foram as variáveis operacionais que mais influenciaram o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das vesículas.

Outro método de destaque para produção industrial de lipossomas consiste na utilização de homogeneizadores a alta pressão, ou microfluidizadores. Esta técnica usa a força de duas ou mais correntes de dispersões de lipossomas que colidem entre si a altas pressões, fazendo com que vesículas lipídicas se reorganizem (VILLANOVA & CONSIGLIERI, 2000). Por ser um método atualmente muito estudado, será tratado com mais detalhes na seção 3.1.1.3.2.

Muitos outros métodos de preparação de lipossomas que podem sofrer aumento de escala já foram descritos na literatura científica. CARNEIRO (2003) sugeriu a produção escalonável de lipossomas de lecitina natural hidrogenada de soja a partir da hidratação de estruturas lipídicas secas formadas no interior de um sistema multitubular. Com base no método de Bangham, os lipídios foram solubilizados em etanol e injetados lentamente através de um sistema composto por 37 tubos. Em seguida, o solvente foi evaporado com auxílio de pressão reduzida e o filme foi então hidratado com solução tampão. Foi obtida uma população heterogênea de lipossomas com diâmetro médio variando entre 800 e 2000 nm dependendo da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios. OTAKE e colaboradores (2001) estudaram a técnica de evaporação em fase reversa usando como solvente CO₂ supercrítico, que produziu lipossomas com alta eficiência de encapsulação para moléculas hidrofílicas.

Os processos mais estudados para a etapa de uniformização de tamanhos de lipossomas envolvem sonicação, extrusão através de membranas com porosidade controlada e aplicação de altas pressões (PAPAHADJOPOULOS & WATKINS, 1967; SZOKA & OLSON, 1980; TALSMAN *et al.* 1989; BRANDL *et al.*, 1993). WIGGENHORN (2007) sugeriu a adaptação de técnicas de secagem por *spray-drying* para a etapa de homogeneização de tamanhos dos lipossomas, devido ao alto cisalhamento empregado.

Além dos métodos citados, há a abordagem “*bottom-up*”, que envolve controle do processo no nível da partícula. Forças interfaciais exercem influência muito relevante na formação das partículas, ressaltando fenômenos de transferência de calor e de massa. Para possibilitar o controle do processo, utiliza-se a técnica de microfluídica na qual, em fluxo laminar, observa-se uma região interfacial bem definida e previsível entre os fluidos. (WAGNER

et al., 2002; JAHN *et al.*, 2007). O escalonamento de processos “*bottom-up*” se dá a partir do uso de grande número de dispositivos, conceito chamado de “*scaling-out*”. Dessa forma, não é necessário projeto de equipamentos de maiores dimensões, reduzindo custos e tempo de estudo. (SHENK *et al.*, 2004).

Um dos estudos mais recentes ligados à produção “*bottom up*” escalonável é de KAKUMANU & SCHROEDER (2012), que descreveram a utilização da tecnologia *Adaptive Focused Acoustics*[®] (AFA) para produção de lipossomas sem uso de co-solventes para solubilização dos lipídios e sem necessidade de contato com amostra. Essa tecnologia é baseada na aplicação de energia acústica ultrassônica, com frequência 15 a 30 vezes superior à dos sonicadores comuns, de maneira focalizada sobre a amostra, o que permite controle preciso do processo. O sistema utilizado está representado na Figura 3.4, onde se observa a aplicação das ondas focalizadas pelo transdutor no recipiente contendo a mistura lipídio/água para formação dos lipossomas. O escalonamento do método ocorre com uso de uma célula de fluxo contínuo que permite recirculação da amostra.

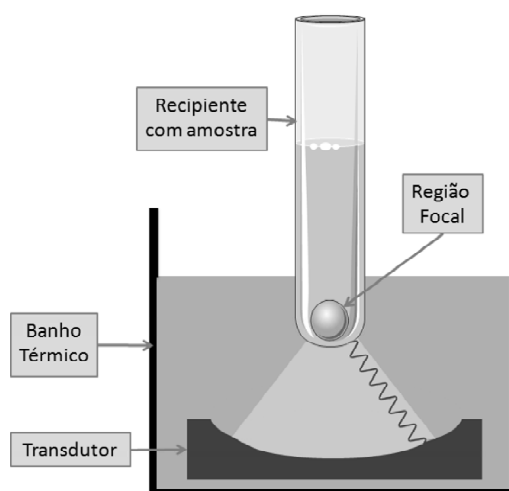


Figura 3.4: Esquema de funcionamento da tecnologia AFA[®]

3.1.1.3. Forças de cisalhamento no processo de produção

Muitos são os fatores que influenciam o processo de formação dos lipossomas, dentre eles pressão empregada, princípio de funcionamento do equipamento, geometria dos elementos utilizados para redução de tamanhos e força de cisalhamento aplicada (MAYHEW *et al.*, 1987).

DIAT e colaboradores (1993) determinaram a relação entre forças elásticas e viscosas e o diâmetro médio de lipossomas, sendo que este decai proporcionalmente ao inverso da raiz quadrada da taxa de cisalhamento, de acordo com a Equação (2):

$$R = \sqrt{\frac{4 \cdot \pi \cdot (2 \cdot k + \bar{k})}{\mu \cdot d \cdot \dot{\gamma}}} \quad (2)$$

onde R (nm) é o raio do lipossoma, k e $\bar{k}$ (J) o módulo e a constante elástica gaussiana da membrana, respectivamente, μ (cP) a viscosidade da solução, $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) a taxa de cisalhamento e d (Å) a distância entre lamelas.

No caso dos lipossomas, o módulo elástico (k) é uma propriedade intensiva inerente aos lipídios que o compõem, enquanto a rigidez da bicamada, representada pela constante elástica $\bar{k}$, é uma propriedade extensiva dependente da estrutura e do empacotamento do agregado de fosfolipídios.

Com esse conhecimento, TREVISAN e colaboradores (2010; 2011) observaram a influência da taxa de cisalhamento aplicada em processamentos *top-down* na estruturação das bicamadas dos lipossomas e estudaram o empacotamento lamelar através de análise por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) – estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB/FEQ/UNICAMP). O método utilizado para produção das partículas foi de injeção de etanol (LASIC, 1993), porém modificado por utilizar elevada concentração lipídica na fase alcoólica e alta taxa de alimentação de etanol na fase aquosa. Esta modificação, implementada por TREVISAN (2010), apresenta a vantagem de utilizar altas concentrações de lipídio. Após formação dos lipossomas em Ultra Turrax[®], esses foram processados em microfluidizador de multicanais e caracterizados. De acordo com resultados obtidos, o diâmetro hidrodinâmico médio cumulativo dos lipossomas cai exponencialmente com aumento da taxa de cisalhamento (Figura 3.5). A análise por SAXS mostrou que a distância interlamelar tem influência direta na quantidade de água retida na bicamada e que o estreitamento dessa distância, pela aplicação de altas taxas de cisalhamento, provoca aumento da rigidez da bicamada dos lipossomas. As alterações nas características das partículas são tão mais acentuadas quanto maior a taxa de cisalhamento aplicada.

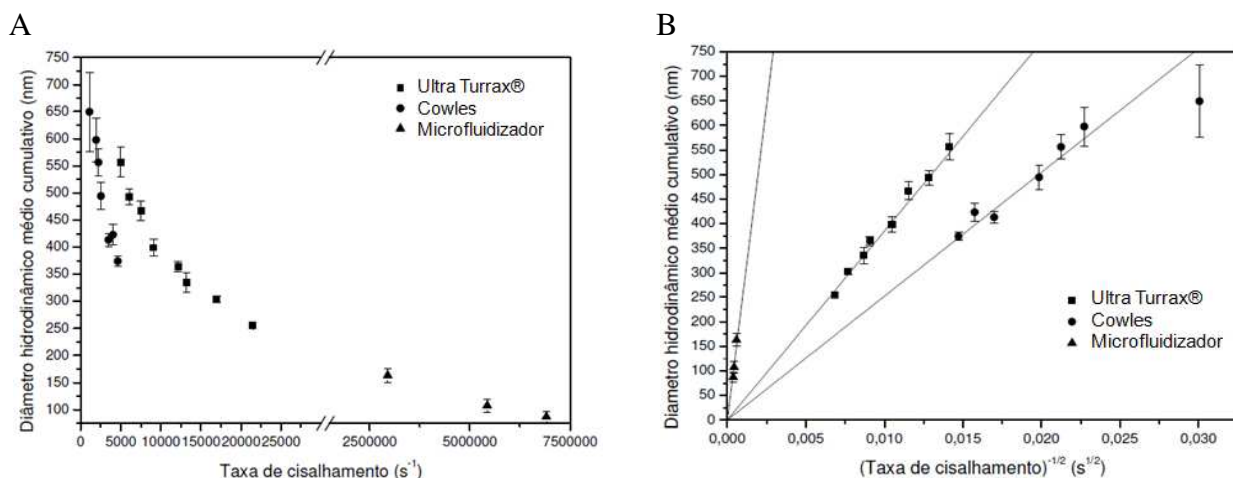


Figura 3.5 Diâmetro hidrodinâmico médio cumulativo em função da taxa de cisalhamento aplicada para dispersão em Ultra Turrax®, impelidor do tipo Cowles e microfluidizador. A) Medidas fornecidas diretamente por medidas de equipamento DLS; B) Relação linear sugerida pela Equação (2) (Adaptado de TREVISAN, 2010)

Assim, pode-se dizer que o cisalhamento aplicado na produção de lipossomas influencia a capacidade de encapsulação e liberação de moléculas, bem como a elasticidade dos lipossomas.

Dentre as estratégias que aplicam alto cisalhamento para redução de tamanho de lipossomas, são destacadas nas próximas seções a agitação mecânica com uso de impelidores e aplicação de altas pressões em microfluidizador de multicanais.

3.1.1.3.1. Agitação mecânica com impelidores

O princípio da maioria dos equipamentos destinados à agitação mecânica de um fluido consiste na transferência do movimento de um motor a um líquido através de um impelidor inserido no tanque. Um esquema simplificado da configuração desse sistema está ilustrado na Figura 3.6:

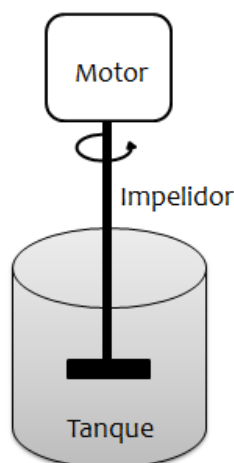


Figura 3.6: Esquema simplificado de um sistema de agitação mecânica

A intensidade da agitação depende das características do produto que se deseja obter, das propriedades físico-químicas dos componentes da mistura e da configuração do sistema de agitação.

O fluxo gerado pode ser axial (paralelo ao eixo), tangencial (seguindo o círculo de rotação) ou radial (perpendicular ao eixo) dependendo da direção das componentes vetoriais da velocidade em relação ao eixo do impelidor. Diferentes geometrias de impelidor podem gerar diferentes padrões de fluxo e, portanto, diferentes regimes de mistura (CEKINSKI *et al.*, 2007).

Impelidores com diâmetro próximo ao do tanque associados à baixa frequência de rotação do motor tendem a gerar fluxo tangencial com regime de mistura laminar, ao passo que impelidores destinados à maior transferência de momento possuem diâmetro inferior ao raio do tanque e possuem geometrias que permitem associação de padrões de fluxo, levando a um regime de mistura turbulento (CEKINSKI *et al.*, 2007).

No caso do impelidor do tipo Cowles, representado na Figura 3.7, a geometria do sistema favorece o bombeamento da mistura, por gerar fluxo com componentes radiais e tangenciais. Combinados a altas rotações, esses impelidores promovem alto cisalhamento da mistura, o que contribui para redução do tamanho das partículas em suspensão (<http://www.linkindustrial.es/>, 2013).

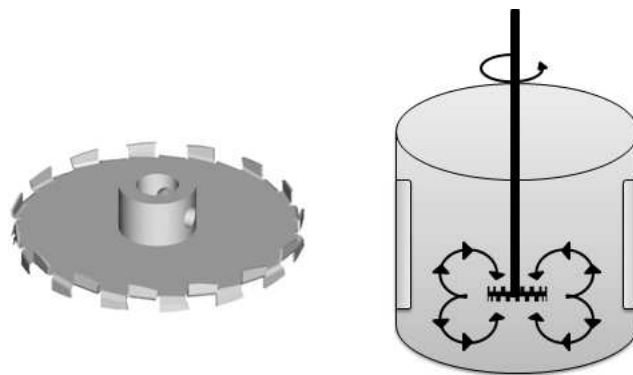


Figura 3.7 Formato do impelidor do tipo Cowles e esquema do fluxo que proporciona
(<http://www.linkindustrial.es/>, 2013)

O impelidor de alto cisalhamento utilizado no equipamento Ultra Turrax[®] (Figura 3.8) possui geometria semelhante à de um viscosímetro rotacional (rotor interno) (TREVISAN, 2010). Com essa geometria a mistura é conduzida para a região central do tanque e todo o líquido é forçado a passar através de fendas laterais do impelidor, provocando altíssimas taxas de cisalhamento quando seu uso é combinado a altas rotações. Porém, sua capacidade de bombeamento é reduzida.

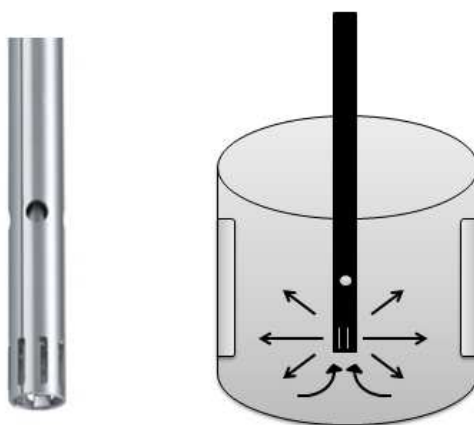


Figura 3.8 Elemento dispersor S25N-10G, Ultra Turrax[®] e esquema do fluxo que proporciona
(<http://www.ika.net/>, 2013)

3.1.1.3.2. Microfluidizador de multicanais

O equipamento microfluidizador consiste de uma bomba de alta pressão (geralmente até 40000 psi) que força a passagem do fluido de entrada através de câmaras de interação sucessivas. A pressão empregada provoca alto cisalhamento e promove homogeneização da dispersão e redução do tamanho médio das partículas (VUILLEMARD, 1991). Para atingir as características

pretendidas, a amostra pode ser reprocessada através de passagens (ou ciclos) adicionais pelo equipamento. Estes equipamentos operam com vazões da ordem de 160 mL/min, permitindo que seja processado grande volume em pouco tempo. A vantagem da microfluidização é a produção de vesículas unilamelares pequenas, “*small unilamellar vesicles*” (SUV’s). Porém, dependendo das condições de processo, as vesículas têm tamanho tão reduzido que conduzem à instabilidade e baixa eficiência de encapsulação (SORGI & HUANG, 1996; THOMPSON & SINGH, 2006).

A Figura 3.9 mostra o diagrama de fluxo do homogeneizador de alta pressão fornecido pela Microfluidics International Corp. (<http://www.microfluidicscorp.com/>, 2012).

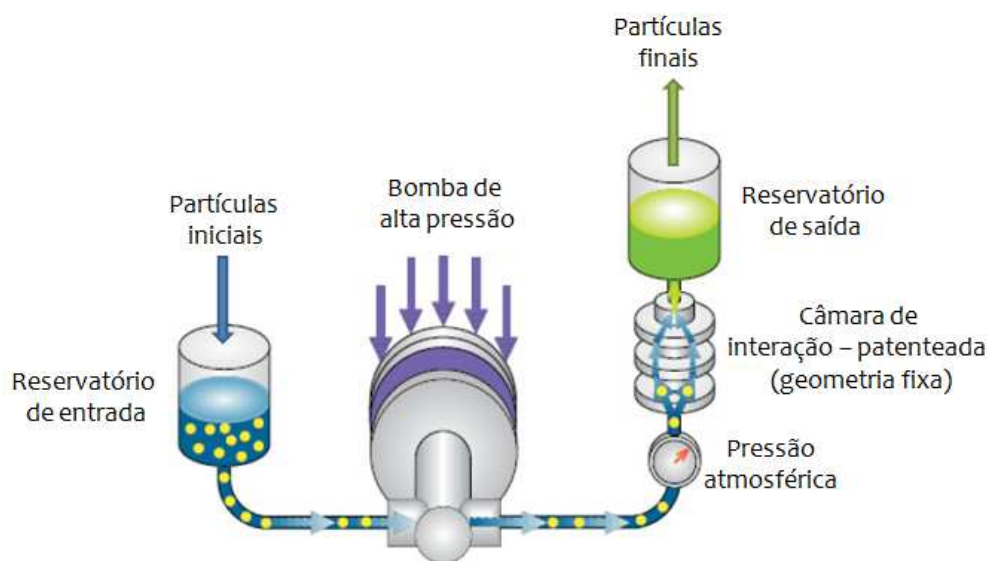


Figura 3.9 Diagrama de fluxo do homogeneizador Microfluidics® (<http://www.microfluidicscorp.com/>, 2012)

No caso do microfluidizador ilustrado na Figura 3.9, o principal componente é a câmara de interação com geometria fixa (configuração em Y). O fluxo bombeado por essa câmara se divide em dois microcanais ($2 \times 100 \mu\text{m}$), produzindo alta força de cisalhamento. O tempo de residência do fluido na câmara de interação é estimado em 25 a 40 ms (SAUER *et al.*, 1988).

Utilizando esse tipo de equipamento, TALSMA e colaboradores (1989) produziram lipossomas de fosfatidilcolina de soja com tamanhos entre 50 e 200 nm com tamanho e polidispersidade estabilizados após cinco passagens pelo equipamento (Microfluidizer M-110). VEMURI e colaboradores (1990) processaram uma suspensão hidratada de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo, fosfatidilglicerol e colesterol no homogeneizador (Microfluidizer M-110) a 3000 psi e obtiveram partículas de tamanho de 160 nm e

polidispersidade de cerca de 0,50 estabilizados após três passes. Em 1996, SORGI & HUANG produziram lipossomas catiônicos utilizando método de Bangham e em seguida processaram as partículas por microfluidização (Microfluidics® M110S) a 17000 psi para redução do tamanho. Estes lipossomas apresentaram-se estáveis durante cerca de um ano, com diâmetro médio de 200 nm. THOMPSON & SINGH (2006), obtiveram lipossomas de gordura de leite no homogeneizador M-110Y e observaram que o efeito na redução do tamanho da partícula e na estabilização da polidispersidade é mais significativo nas primeiras três passagens pelo equipamento.

Foi estudada a influência das variáveis operacionais sobre o diâmetro e estabilidade das partículas produzidas através de planejamento estatístico fatorial e superfícies de resposta. BARNADAS-RODRIGUÉZ & SABÉS (2001) variaram o número de ciclos (1 a 9) e a pressão de alimentação (0 a 4 bar) no equipamento, concluindo que o diâmetro das partículas é inversamente proporcional à essas variáveis. TREVISAN (2010) variou o número de ciclos, a pressão de alimentação e a vazão na entrada, concluindo que a pressão, associada à taxa de cisalhamento empregada, é a variável que mais influencia o diâmetro, polidispersidade e potencial zeta das partículas produzidas.

3.1.1.4. Incorporação de fármacos hidrofóbicos

Conforme apresentado anteriormente, a composição estrutural dos lipossomas favorece a acomodação de moléculas hidrofóbicas no interior da bicamada, junto à extremidade apolar dos fosfolipídios. Contudo, a inserção dessas moléculas pode desestabilizar a estrutura da vesícula. Para que ocorra incorporação eficaz, a bicamada lipídica deve proporcionar um microambiente favorável à solubilização desses fármacos (JANOFF, 1999).

Tendo em vista a solubilização de fármacos hidrofóbicos em meios aquosos, GREGORIADIS (1993) sugeriu a complexação de ciclodextrinas a desidro-epiandrosterona, retinol e ácido retinóico, todos com característica hidrofóbica, antes da inserção destes em lipossomas. O complexo fármaco-ciclodextrina, hidrossolúvel, foi encapsulado no cerne aquoso dos lipossomas. Estudos posteriores (SHARMA, 2003; JOGUPARTHI & ANDERSON, 2009) relatam associação de ciclodextrinas às formulações para facilitar a incorporação lipossomal de moléculas com baixa hidrossolubilidade.

Muitas são as estratégias adotadas para facilitar a incorporação de fármacos hidrofóbicos em lipossomas sem necessidade de solubilização em água. As principais delas são: associação de fosfolipídios a colesterol e variação da composição lipídica.

A *associação de fosfolipídios a colesterol* na composição dos lipossomas tem sido uma estratégia relatada para incorporação do agente antineoplásico Paclitaxel (SHARMA *et al.*, 1997; CROSASSO *et al.*, 2000), possibilitando obtenção de lipossomas com razão molar fármaco/lipídio entre 3 e 4 %. Em 2005, ZHANG e colaboradores relataram que aumento na concentração de colesterol na composição do lipossoma provoca decréscimo na capacidade de incorporação de fármaco, sugerindo mecanismo de competição das moléculas pelo interior da bicamada.

Considerando o efeito competitivo, LIU e colaboradores (2006) relataram a utilização de lipossomas livres de colesterol para incorporação de ML220, um fármaco hidrofóbico antineoplásico derivado do imidazol, sugerindo que a *variação da composição lipídica* das partículas pode aumentar a solubilidade do fármaco na bicamada. Lipossomas foram produzidos pelo método de Bangham seguido de agitação por 48 h, sonicação por 90 minutos e 10 ciclos de extrusão em membrana de polycarbonato com poro de 100 nm. O estudo relatou que aumento da concentração de lipossomas peguados na composição lipídica levou à diminuição da eficiência de incorporação do fármaco e à redução na fluidez da bicamada lipossomal, mas por outro lado permitiu produção de partículas com distribuição de tamanhos mais homogênea, em torno de 90 nm.

Seguindo a estratégia de variação da composição lipídica, KAN e colaboradores (2011) propuseram a incorporação de Paclitaxel em lipossomas compostos por dois tipos de fosfatidilcolina, com cerca de 60 °C de diferença em suas temperaturas de transição de fases. Os lipossomas foram produzidos pelo método de Bangham seguido de sonicação por 10 minutos para redução dos diâmetros. A razão molar fármaco/lipídio foi cerca de 15 % e o diâmetro médio dos lipossomas obtidos foi 125,4 nm . Observou-se aparecimento de macrodomínios na bicamada lipossomal devido à coexistência da fase gel e da fase cristalina dos lipídios. A hipótese apresentada pelos autores para explicar o aumento na capacidade de incorporação em relação às formulações com colesterol assume que os macrodomínios formados na bicamada impediram a difusão das moléculas, diminuindo agregação e precipitação do fármaco.

Além desses métodos, MOISEEVA e colaboradores (2011) estudaram incorporação lipossomal de 4-aril-cumarina (ArC), pró-farmaco hidrofóbico do antineoplásico Combretastatina A-4 (CA-4), baseando-se no tamanho das moléculas. Os autores relataram que o tamanho da molécula de CA-4 não favorecia sua acomodação no interior da bicamada, então optaram pela utilização do pró-fármaco, com tamanho molecular reduzido. Os lipossomas foram produzidos pelo método de Bangham, seguido de 5 ciclos de congelamento/descongelamento e 20 ciclos de extrusão por uma membrana de policarbonato com poros de 100 nm. A formulação apresentou eficiência de incorporação próxima a 100% e lipossomas com cerca de 100 nm.

De acordo com as estratégias apresentadas, a eficiência de incorporação de fármacos hidrofóbicos depende da composição lipídica da bicamada e das características do fármaco de interesse. Além disso, conforme estudo realizado por TREVISAN (2010), a taxa de cisalhamento aplicada no processo de obtenção dos lipossomas também pode influenciar eficiência de incorporação de moléculas hidrofóbicas na medida em que altera a distância interlamelar e a rigidez da bicamada.

3.2. *Leishmaniose*

Também conhecida como Úlcera de Bauru, nariz de tapir e botão do Oriente, a Leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por cerca de 20 espécies diferentes de protozoários obrigatoriamente intramacrofágicos do gênero *Leishmania*. É primariamente uma infecção zoonótica, na qual canídeos geralmente servem como reservatórios para estes patógenos, que podem ser transmitidos a seres humanos por picada das fêmeas de mais de 30 espécies diferentes de flebotomíneos (Figura 3.10), vetores da doença (CROFT E COOMBS, 2003).



Figura 3.10 Flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, popular Birigui ou mosquito palha

No ciclo de transmissão da leishmaniose, fêmeas dos flebotomos regurgitam promastigotas, formas livres, flageladas e extracelulares do parasito, durante a alimentação (picada). Promastigotas penetram no hospedeiro, onde se ligam aos macrófagos tissulares, pelos quais são fagocitados. Depois disso, se transformam em amastigotas, que residem e se multiplicam no interior dos fagolisossomas dos macrófagos até que a célula se rompa. Os amastigotas então liberados propagam a infecção, invadindo mais macrófagos. Quando flebotomos se alimentam novamente e ingerem amastigotas, estes se transformam novamente em promastigotas, completando assim o ciclo de transformações representado na Figura 3.11 (BRUNTON *et al.*, 2007).

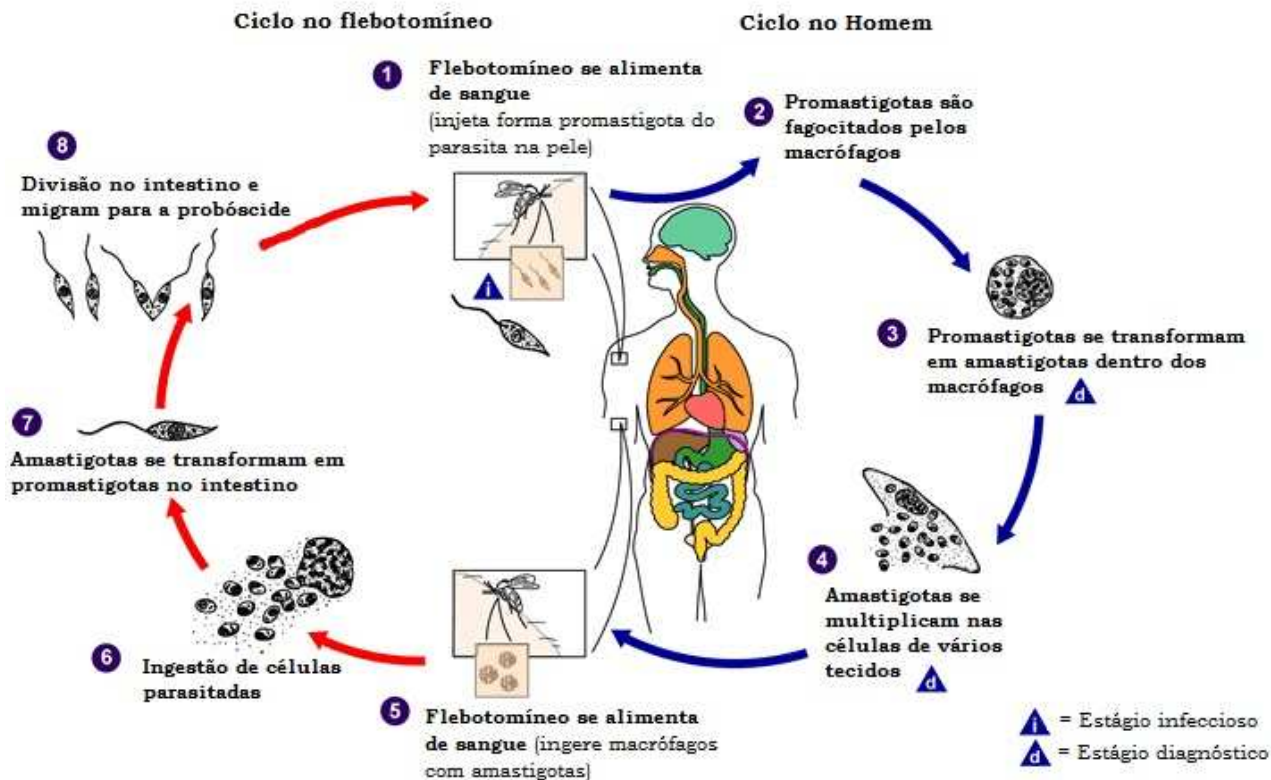


Figura 3.11 Ciclo de transmissão da leishmaniose (Adaptado de <http://www.cdc.gov>)

Em sua forma visceral a doença é sistêmica, caracterizada por febre duradoura, perda de peso, fraqueza, adinamia e anemia dentre outras manifestações. Mais de 90% dos casos não tratados podem evoluir para óbito (BRASIL, 2005). A forma mucosa caracteriza-se por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe, podendo haver até mesmo perfurações do septo nasal e/ou palato. Já a forma cutânea da doença se inicia

com o aparecimento de pápulas, que evoluem para úlceras com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, únicas ou múltiplas, podendo levar à formação de lesões desfigurantes (BRASIL, 2010). A leishmaniose é cada vez mais reconhecida como uma infecção oportunista associada à AIDS (BERMAN, 1997).

O diagnóstico clínico de um processo infeccioso é feito pelo encontro do parasito ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros, sendo necessária utilização de método parasitológico. Quando a doença está em sua forma cutânea, pode ser feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, além dos dados epidemiológicos serem de grande importância (BRASIL, 2010). Vale considerar também que as manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

3.2.1. Epidemiologia

Uma das formas de classificação da Leishmaniose é a geográfica, dividida em duas formas: do Velho Mundo, cujos principais vetores seriam insetos do gênero *Phlebotomus*, presentes principalmente na África, Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo e a do Novo Mundo, transmitida principalmente por insetos do gênero *Lutzomyia* nos países americanos.

Dados de 2010 estimam que, dentre todas as formas de apresentação clínica da doença, ocorrem anualmente cerca de 2 milhões de novos casos no mundo, dos quais 1,5 milhões são atribuídos à forma cutânea. Sabe-se ainda que quaisquer estatísticas sobre essa doença possam estar subestimadas, uma vez que grande parte dos casos não é notificada por dificuldades no diagnóstico ou por manifestações subclínicas da leishmaniose (MITROPOULOS, 2010).

O Brasil está entre os 6 países (Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil, e Peru) que, juntos, apresentam 90% dos casos de leishmaniose cutânea. No país, bem como em toda a América do Sul, prevalecem protozoários do gênero *Leishmania* e subgênero *Viannia*, onde estão inclusos *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) colombiensis* e *L. (Viannia) guyanensis* (MITROPOULOS, 2010).

No Brasil existem duas formas de leishmaniose, denominadas leishmaniose visceral (LV), cuja letalidade média de 2006 a 2009 foi de 6,3% dos casos (BRASIL, 2010), e leishmaniose tegumentar americana (LTA), que pode se manifestar clinicamente nas formas cutânea e mucocutânea, consistindo em uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, pois

embora não mate, pode provocar lesões desfigurantes que acabam por prejudicar psicossocialmente o paciente. (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LTA apresenta-se em expansão geográfica no país, inclusive nos centros urbanos. Antes vista como zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começou a ocorrer em zonas rurais praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. Além dos focos antigos, observa-se atualmente a ocorrência de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas em ambientes favoráveis ao surgimento da doença, tais como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo (BRASIL, 2005).

Ao se observar o período de 1988 a 2007, é possível verificar uma tendência no crescimento da endemia no Brasil, pois a LTA apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes. No ano de 2003 todos os estados registraram autoctonia da doença (BRASIL, 2010).

Dentre as regiões brasileiras, a região Norte vem contribuindo com maior número de casos (cerca de 36,0% do total registrado no período estudado) e com coeficientes médios de detecção mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes) (BRASIL, 2010).

BASANO & CAMARGO (2004) ressaltam em seu trabalho o despreparo das unidades de saúde brasileiras para diagnóstico e tratamento da LTA. Para melhorar o quadro epidemiológico, seria importante levar em conta que a maioria dos casos da doença ocorre em áreas de difícil acesso, o que dificulta tanto a aplicação parenteral dos fármacos atualmente disponíveis como monitoramento de seus efeitos colaterais. Assim, os autores destacam a necessidade de pesquisar moléculas alternativas que facilitem o tratamento.

3.2.2. Tratamentos convencionais

O tratamento de primeira escolha para leishmanioses é baseado nos fármacos antimonials pentavalentes (Sb^{5+}), introduzidos em 1937, em substituição ao antimônio trivalente utilizado até então, que causava muitos efeitos colaterais (GOODWIN & PAGE, 1943). Estes medicamentos inibem a biossíntese de macromoléculas nas formas amastigotas do parasita, interferindo na glicólise e β -oxidação dos ácidos graxos, além de apresentarem diversos efeitos sobre o

metabolismo da *Tripanotoma*. Acredita-se que o antimonial na forma pentavalente é, na verdade, um pró-fármaco, que se converte a trivalente quando próximo de seu local de ação, o interior dos macrófagos (BERMAN, 1997). Antimoniais pentavalentes, disponíveis nas formas de estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Figura 3.12), podem ser administrados por via intravenosa ou intramuscular na concentração de 20 mg/kg durante 28 dias, dependendo da espécie do parasita e das manifestações clínicas do paciente (ROBERTS *et al.*, 1995; PISCOPO & AZZOPARDI, 2007). A dificuldade de adesão ao tratamento parenteral somada aos efeitos colaterais têm estimulado pesquisas na busca por novas formulações para estes fármacos, incluindo a utilização de lipossomas (FRÉZARD *et al.*, 2005).

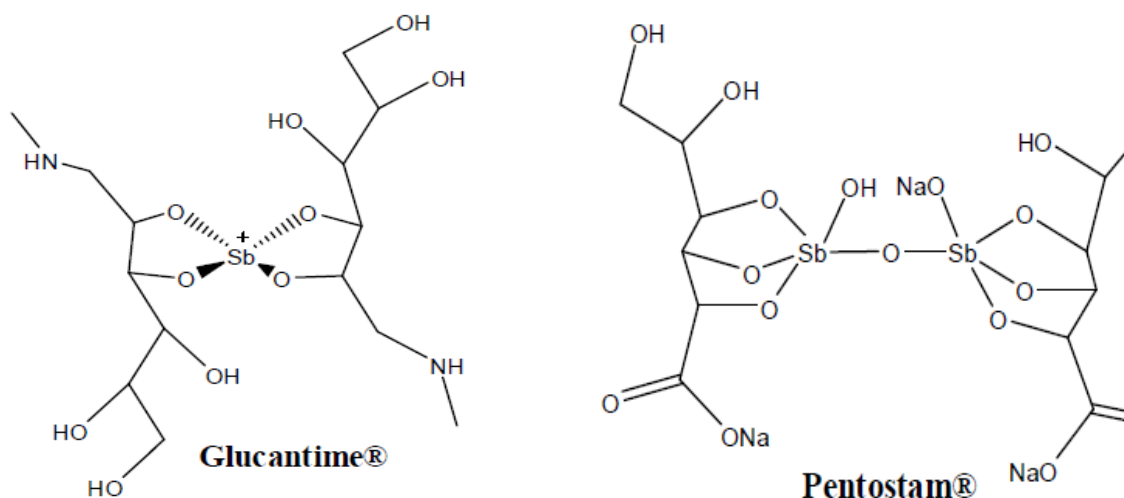


Figura 3.12: Antimoniais pentavalentes: Antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e Estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (FRÉZARD *et al.*, 2005).

O antibiótico poliênico anfotericina B também pode ser utilizado para casos mais graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional. Seu mecanismo de ação baseia-se em sua ligação aos esteróis encontrados nos microrganismos formando poros aquosos na membrana celular e levando à sua morte. Muitos são seus efeitos tóxicos, tais como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e de níveis séricos de cálcio e potássio (BERMAN, 1998). Em geral, formulações lipossomais de anfotericina B são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual as *Leishmanias* residem.

Outra linha de tratamento são as diamidinas aromáticas, das quais se destaca a pentamidina, também aplicada via parenteral, que apresenta atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral. Seu mecanismo de ação é devido ao maior

acúmulo deste fármaco na célula parasitária do que nas células humanas e, possivelmente, à ligação ao DNA do cinetoplasto, provocando sua desintegração e colapso do potencial de membrana mitocondrial. Apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos e casos não responsivos aos antimoniais pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos adversos como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão (BASSELIN *et al.*, 1997; BERMAN, 1997, BRAY *et al.*, 2003).

Paromomicina (Aminosidina), um antibiótico aminoglicosídeo desenvolvido na década de 1960 com conhecida ação leishmanicida, atua na alteração da síntese de proteínas e atividade mitocondrial do parasita, porém não é usada como um fármaco de primeira escolha devido aos muitos casos de resistência no tratamento da leishmaniose (MAAROUF *et al.*, 1997).

Além destes, a miltefosina, uma alquilfosfocolina, começou a ser utilizada na Índia para tratamento de pacientes com leishmaniose resistente a antimoniais e tem apresentando resultados bastante promissores principalmente para tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que pode ser administrada por via oral (SINDERMANN *et al.*, 2003). O fármaco induz morte celular por apoptose, com condensação e fracionamento do DNA, exposição da fosfatidil-serina e compactação celular (PARIS *et al.*, 2004). No entanto, o fármaco pode afetar o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de poder aumentar os níveis sanguíneos de transaminases e elevar a uremia e creatininemia (FISCHER *et al.*, 2001).

Em geral, fármacos atualmente utilizados para tratamento da leishmaniose apresentam problemas como resistência do parasita e indução de efeitos colaterais, que limitam sua utilização e eficácia. Além disso, a via de administração utilizada é a parenteral, que representa desconforto ao paciente. Por isso, a pesquisa de formas farmacêuticas mais eficazes para administração tópica tem sido incentivada como necessidade imediata, sendo importante desvendar os mecanismos de escape dos parasitas à resposta imune do hospedeiro para desenvolvimento de formulações específicas contra vias metabólicas de *Leishmania sp* (BEZERRA *et al.*, 2004).

3.2.3. Nitrochalcona CH8

Na busca por tratamentos menos invasivos para leishmaniose, algumas alternativas são isolamento de produtos naturais e síntese de análogos químicos a fim de identificar novos fármacos antileishmaniais biologicamente ativos. A classe química dos flavonóides tem sido amplamente explorada nesse sentido por suas conhecidas propriedades farmacológicas.

Flavonóides são metabólitos secundários presentes em muitas plantas e representam uma classe de substâncias que tem como estrutura base a 1,3-diarilpropano, podendo assumir arranjos cíclicos e acíclicos, conforme variação do nível de oxidação. Chalconas são flavonóides de cadeia aberta, onde os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema ceto- α,β -insaturado, sendo 1,3-difenil-2-propen-1-ona a estrutura básica. (YUNES *et al.*, 2006; ÁVILA *et al.*, 2008) (Figura 3.13).

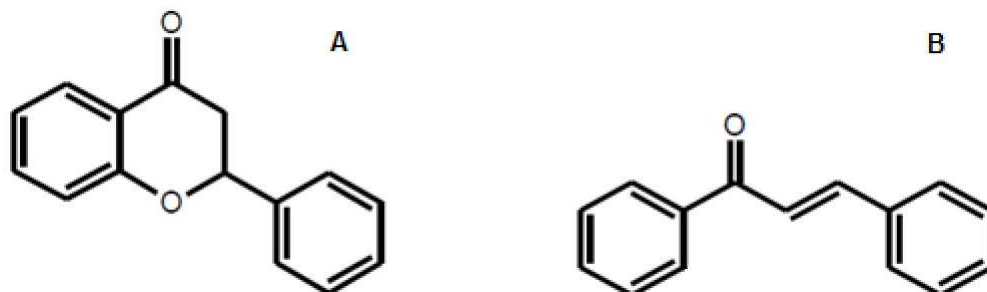


Figura 3.13: Estrutura do flavonóide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona (A) e estrutura básica das chalconas (B) (Adaptado de BELLO, 2010).

Chalconas apresentam arranjo planar devido aos anéis aromáticos presentes em sua estrutura, o que propicia à molécula certa estabilidade química e favorece atividade farmacológica. Algumas chalconas sintéticas tiveram sua estrutura cristalina elucidada, porém não é possível estabelecer um arranjo padrão, uma vez que há presença de interações de hidrogênio fortes $O-H\cdots O$ e fracas $C-H\cdots O$ que contribuem para estabilidade das estruturas cristalinas (SALLUM, 2012).

Em 1990, o laboratório de imunofarmacologia da UFRJ testou extratos de 130 espécies de plantas em macrófagos contaminados com *leishmania*. O extrato isolado das inflorescências da planta *Piper aduncum against* em diclorometano foi selecionado como o mais ativo e menos tóxico para as células (BOECK *et al.*, 2006). A chalcona natural 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (DMC) foi então isolada e identificada como componente ativo antileishmanial (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). A partir disso, sua atividade biológica foi melhorada por inclusão de substituintes em sua molécula, onde vários análogos sintéticos foram produzidos e patenteados — PI 0204079-4 (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2004; FALCÃO, 2005). CHEN e colaboradores (2001) estudaram o mecanismo de ação leishmanicida das chalconas e mostraram que ocorre uma

inibição seletiva da enzima fumarato redutase (FRD), presente na cadeia respiratória dos parasitas do gênero *Leishmania* sp.

A nitrochalcona CH8 (MM = 329 Da) (Figura 3.14) apresenta características promissoras como novo antileishmanial. Foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Rosendo Yunes, da Universidade Federal de Santa Catarina, a partir da introdução de um grupamento nitro no anel B da molécula de DMC. Possui característica predominantemente lipofílica e tem pico de absorção no comprimento de onda de 337 nm (BOECK *et al.*, 2006). Macroscopicamente a CH8 se apresenta como um pó amarelo e aspecto de cristais do tipo agulha (Figura 3.15).

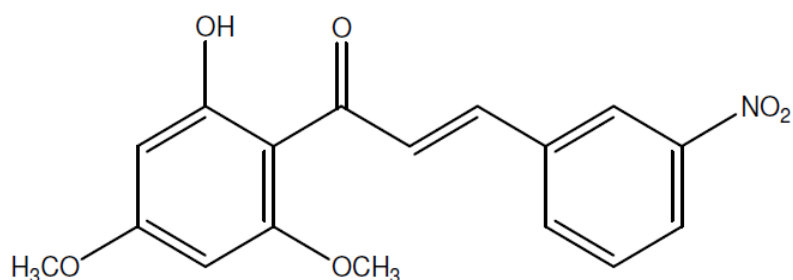


Figura 3.14 Estrutura da 3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona (Chalcona CH8) (BOECK *et al.*, 2006)



Figura 3.15: Chalcona CH8 em pó. (ZANCHETTA, 2009)

FALCÃO (2005) estudou 17 análogos sintéticos da DMC e selecionou a nitrochalcona CH8 para ensaios *in vivo*, onde foi constatado seu alto desempenho, com elevada seletividade e baixíssima toxicidade. A CH8 mostrou IC₅₀ (concentração necessária para reduzir 50% da carga parasitária) de 0,7 μ M e 16 μ M em promastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente, e efeito tóxico em macrófagos com IC₅₀ de 170 μ M, indicando sua seletividade contra o parasito.

Além disso, demonstrou eficácia *in vivo* com doses intralesionais de apenas 0,3 μ M, sendo 100 vezes mais potente que o fármaco de referência, Pentosan[®] (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2004). Seu mecanismo de ação foi descrito como a capacidade de interferir na biossíntese de esteróis do parasito (TORRES-SANTOS *et al.*, 2009).

Ensaio com chalcona CH8 na sua forma livre mostrou-a como alternativa para o modelo murino de leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*) (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 2002) e também para tratamento oral da leishmaniose visceral, reduzindo parcialmente a carga parasitária no baço de camundongos infectados com *Leishmania chagasi*. Ainda que a inibição parasitária tenha sido parcial, a utilização da via oral é um importante avanço, tendo em vista que fármacos atualmente utilizados na clínica são inócuos por esta via (BOECK *et al.*, 2006).

ROSSI-BERGMANN e colaboradores (2011) estudaram a incorporação da chalcona CH8, altamente hidrofóbica, em lipossomas elásticos ou flexíveis, na tentativa de buscar melhor eficácia do fármaco em tratamentos tópicos. Comparando o sistema contendo CH8 incorporada em lipossomas elásticos modificados a partir do recobrimento com PEG-8L e o sistema com CH8 incorporada em lipossomas convencionais, o segundo apresentou maior flexibilidade da bicamada lipídica, inserindo-se em maior quantidade nos tecidos infectados. Este resultado indica que a hidrofobicidade do fármaco incorporado pode ser utilizada como estratégia para obtenção de lipossomas elásticos sem que haja necessidade da peguilação, o que facilita e diminui os custos do processo de produção das partículas, além de evitar a imunotoxicidade de lipossomas peguilados.

O presente trabalho estuda a incorporação da nitrochalcona CH8 em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC), livres de PEG, produzidos a partir de processos passíveis de escalonamento que se baseiam na aplicação de alto cisalhamento para redução e homogeneização de tamanhos. Assim, espera-se contribuir para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes para tratamento da leishmaniose cutânea, com processos passíveis de produção industrial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Material*

- (i) O fármaco incorporado aos sistemas lipossomais foi chalcona CH8 (3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona) sintetizada no Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ);
- (ii) O lipídio utilizado para preparo dos lipossomas foi L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC 760 mM), 80 a 85 % de pureza, Lipoid E-80, da Lipoid GmbH (Rhineland-Palatinate, Alemanha);
- (iii) Álcool etílico, 99,5 % de pureza, da LABSYNTH Ltda. (São Paulo, Brasil), clorofórmio, 99,8 % de pureza, da LABSYNTH Ltda. (São Paulo, Brasil) e álcool metílico (metanol), 99,8 % de pureza, da LABSYNTH Ltda. (São Paulo, Brasil) foram utilizados como solvente dos lipídios nos diferentes métodos;
- (iv) Como diluentes dos lipossomas nos diferentes métodos foram utilizados água deionizada e tampão HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico]), 99,5 % de pureza, da Sigma-Aldrich Co. (Missouri, E.U.A.);
- (v) Na etapa de extrusão, membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 100 nm – Osmonics, Inc. (Minnessota, E.U.A.) foram utilizadas.
- (vi) No ensaio de quantificação do teor de fóstato dos lipossomas, foram utilizados: fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 99-100 % de pureza, da ECIBRA-CETUS Ltda. (São Paulo, Brasil); ácido sulfúrico, 95-97 % de pureza, da Merck Chemicals Co. (Darmstadt, Alemanha); peróxido de hidrogênio, 30 % de pureza, da Merck Chemicals Co. (Darmstadt, Alemanha); ácido ascórbico, 99 % de pureza, da LABSYNTH Ltda. (São Paulo, Brasil); molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 81-83 % de pureza, da LABSYNTH Ltda. (São Paulo, Brasil);

4.2. Equipamentos

- (i) Sistema de água ultrapura, marca Milli-Q Millipore, catálogo QTUM000EX;
- (ii) Sistema base para produção e homogeneização do tamanho de lipossomas composto de:
 - a. Rotaevaporador Fisatom , modelo 802;
 - b. Bomba a vácuo Tecnal, modelo TE-058;
 - c. Extrusora de aço inox, com volume de 10 mL e camisa térmica para circulação de água, Lipex Biomembranes, Inc., modelo T.001;
- (iii) Sistema escalonável para produção e homogeneização do tamanho de lipossomas composto de:
 - a. Agitador Ultra Turrax[®], Ika Works, modelo IKA T25 Digital, com impelidor S25N-10G;
 - b. Agitador mecânico digital Tecnal, modelo TE-039/l, com impelidor do tipo Cowles com 27 mm de diâmetro;
 - c. Bomba dosadora peristáltica MILAN, modelo BP-601, com mangueira de silicone de 3 mm de diâmetro interno;
 - d. Béquer de 150 mL com quatro chicanas de acrílico de 5 mm de largura e 50 mm de altura, espaçadas de maneira simétrica;
 - e. Microfluidizador Microfluidics[®], modelo M-110P;
- (iv) Equipamento para caracterização de tamanho e potencial zeta, fabricado pela Malvern Instruments, modelo Zetasizer Nano ZS, ZEN3600, com ângulo fixo de 173°;
- (v) Microscópio óptico Cambridge Scientific Instruments, Inc., modelo Reichert-Jung Series 150.
- (vi) Para quantificação do teor de fosfato e de chalcona nos lipossomas:
 - a. Placa de aquecimento Fisatom;
 - b. Banho termostatizado Tecnal, modelo TE-184;
 - c. Espectrofotômetro de massa UV/Visível, Thermo Electron Corp., modelo Genesys 6 e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm;
 - d. Banho sonificador Cole-Parmer, modelo 8890.

4.3. Produção de lipossomas convencionais vazios (LC)

ZANCHETTA (2009) estudou a incorporação da CH8 em lipossomas produzidos em escala laboratorial e, com base nos estudos de toxicidade realizados por RODAS e colaboradores (2009), selecionou a concentração lipídica 10 mM para produção dos lipossomas de EPC, uma vez que esta condição proporcionou menor citotoxicidade e maior capacidade de incorporação do fármaco. Em vista disso, esta foi a concentração adotada neste trabalho para escalonamento do processo.

4.3.1. Método de Bangham com extrusão em membranas

O método de Bangham (BANGHAM *et al.*, 1965) foi utilizado para avaliar a eficiência do processo escalonável, como referência de produção em escala laboratorial.

A formação do filme lipídico foi feita por evaporação rotativa de solventes, partindo da mistura clorofórmio e metanol na razão de 9:1 (v/v) com EPC em balão de fundo redondo. Não foi necessário aquecimento da mistura durante a evaporação, uma vez que a temperatura ambiente era superior à temperatura de transição de fases do lipídio ($T_m = -8\text{ }^{\circ}\text{C}$). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida de 650 mmHg a uma rotação de 90 rpm por 30 minutos, até a visualização do filme seco. A água no interior da coluna de condensação foi resfriada à 4 °C para impedir a passagem de solventes para a bomba de vácuo do sistema. O sistema permaneceu em agitação rotativa por mais duas horas a 200 rpm para garantir a remoção dos resíduos de solventes orgânicos.

A hidratação do filme lipídico foi feita com tampão HEPES (pH 7,4). Após adição do tampão ao balão de fundo redondo, o sistema foi submetido à agitação em rotaevaporador a 80 rpm, em pressão ambiente, por 30 minutos.

Para estabilizar a agregação e acomodação da bicamada, os lipossomas foram deixados por pelo menos duas horas em repouso sob refrigeração a 8 °C. Em seguida, para redução e homogeneização do tamanho das vesículas, os lipossomas foram extrudados através de duas membranas de policarbonato sobrepostas, com poros de 100 nm de diâmetro, em extrusora de aço inox sob pressão de 12 kgf/cm² em ciclos de 15 passagens.

4.3.2. Método de injeção de etanol

O método de injeção de etanol (LASIC, 1993) foi utilizado para escalonamento da produção de lipossomas. Modificações foram introduzidas no processo original, utilizando elevada concentração lipídica na fase etanólica e alta taxa de alimentação na fase aquosa, de acordo com TREVISAN (2010).

O processo foi realizado em batelada, com volume de 100 mL. O aparato experimental utilizado está representado na Figura 4.1, onde é possível observar um reservatório contendo suspensão lipídica em etanol (1), bomba peristáltica (2), tanque (150 mL) com 4 chicanas contendo água (3) e agitador mecânico (4).

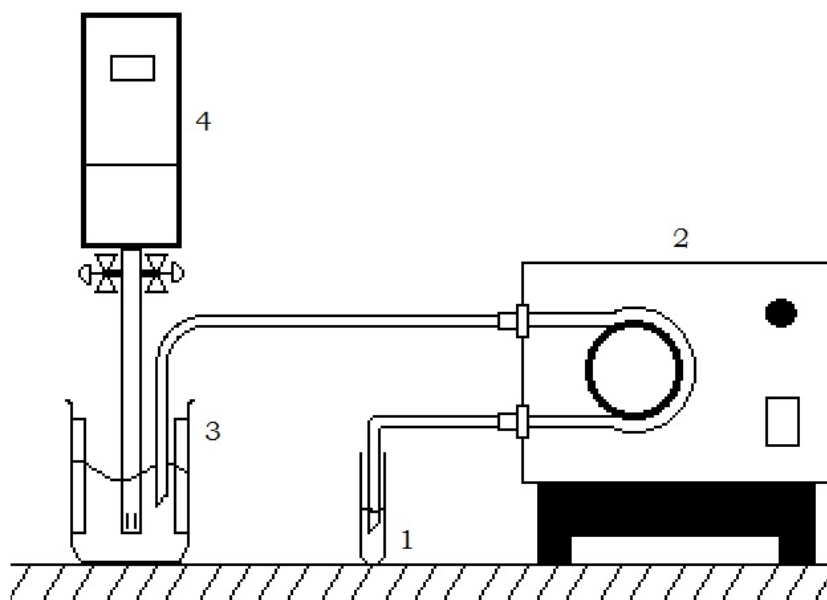


Figura 4.1 Esquema do aparato experimental para a produção de lipossomas. 1) Reservatório contendo suspensão lipídica em etanol; 2) bomba peristáltica; 3) tanque (150 mL) com 4 chicanas contendo água e 4) agitador mecânico

Os agitadores utilizados foram:

Ultra Turrax[®] com rotação de 24000 rpm;

Agitador mecânico digital com impelidor do tipo Cowles com 27 mm de diâmetro, com rotação de 1800 rpm.

Inicialmente foi preparada uma suspensão a 200 mM de lipídios em etanol. Com auxílio de uma bomba peristáltica com vazão de 0,3 mL/s, 5 mL dessa suspensão foram adicionados no tanque contendo 95 mL de água, sob agitação contínua. Após alimentação da suspensão

etanólica, a dispersão de lipossomas foi mantida em agitação por mais 15 minutos e armazenada sob refrigeração a 8 °C por pelo menos 12 horas para consolidação das estruturas.

4.3.3. Microfluidização

A dispersão de lipossomas pré-formados, provenientes do processamento descrito no item anterior, foi submetida à homogeneização de alta pressão em microfluidizador de multicanais, com pressão de 850 bar em 2 ciclos, conforme sugerido por TREVISAN (2010).

4.3.4. Incorporação de chalcona CH8

Inicialmente, uma suspensão CH8 (10 mM em etanol), foi gradualmente adicionada às dispersões de lipossomas pré-formados (10 mM de fosfolipídio) sob agitação mecânica de baixo cisalhamento, utilizando um impelidor tipo âncora, a 120 rpm. A suspensão do fármaco foi gotejada em volumes de 0,1 mL a cada 10 minutos sob agitação até que fosse observada precipitação da chalcona, indicativa da saturação da bicamada lipídica.

Outra estratégia adotada foi incorporação da CH8 durante a formação dos lipossomas, através da solubilização prévia do fármaco na suspensão lipídica em etanol (fase orgânica) antes de sua adição à fase aquosa. Neste caso, foram estudadas duas concentrações de CH8 nas dispersões: 0,9 mM, correspondente à capacidade máxima descrita (ZANCHETTA, 2009) para incorporação em lipossomas pré-formados produzidos pelo método de Bangham e 0,2 mM, selecionada de acordo com resultados preliminares em lipossomas pré-formados para evitar precipitação do fármaco durante a produção e expulsão do conteúdo dos lipossomas durante o armazenamento.

4.4. Cálculo da taxa de cisalhamento

A taxa de cisalhamento para os agitadores mecânicos varia linearmente em função da velocidade angular do impelidor, como descrito pela Equação (3):

$$\dot{\gamma} = k \cdot \omega \quad (3)$$

onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, ω a velocidade angular (rad/s) e k uma constante dependente da geometria do impelidor utilizado (DORAN, 1995). O valor de k para o impelidor tipo Cowles não foi descrito na literatura. No entanto, como a geometria deste impelidor é semelhante aos impelidores turbina Rushton e do tipo pá (k entre 10 e 13 (NAGATA, 1975)),

adotou-se o valor intermediário de 11 para a constante k do impelidor Cowles, de acordo com TREVISAN (2010).

Para o Ultra Turrax[®], foi considerada uma aproximação entre a geometria de seu impelidor e a de um viscosímetro rotacional, cuja taxa de cisalhamento é dada pela Equação (4) (STEFFE,1992):

$$\dot{\gamma} = 2 \cdot \omega \cdot \frac{\alpha^2}{\alpha^2 - 1} \quad (4)$$

onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, ω a velocidade angular (rad/s) e α é uma relação expressa pela Equação (5) (STEFFE,1992), na qual R_S e R_R são o raio do estator e do rotor do Ultra Turrax[®], respectivamente.

$$\alpha = \frac{R_S}{R_R} \quad (5)$$

No caso do Microfluidizador, a taxa de cisalhamento foi obtida através de gráficos de pressão de alimentação por cisalhamento, fornecidos pelo fabricante.

4.5. Determinação das constantes elásticas dos lipossomas

A constante elástica $\bar{k}$ dos lipossomas foi calculada a partir da Equação (6), com o valor de k para o EPC descrito por PETRACHE *et al.* (1998) e as distâncias interlamelares definidas por análise de SAXS.

$$R = \sqrt{\frac{4 \cdot \pi \cdot (2 \cdot k + \bar{k})}{\mu \cdot d \cdot \dot{\gamma}}} \quad (6)$$

onde R (nm) é o raio do lipossoma, k e $\bar{k}$ (J) o módulo e a constante elástica gaussiana da membrana, respectivamente, μ (cP) a viscosidade da solução, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) a taxa de cisalhamento e d (Å) a distância entre lamelas.

4.6. Distância interlamelar dos lipossomas

As informações estruturais sobre os lipossomas formados, tais como o número de bicamadas e a distância entre as lamelas foram analisadas pela aplicação da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).

Assumindo que o sistema lipossomal obtido era composto por duas frações, uma de lipossomas unilamelares e outra de multilamelares, a intensidade de espalhamento $I(q)$ pode ser escrita como na Equação (7):

$$I(q) = P(q) \cdot S(q) \quad (7)$$

onde $P(q)$ é o fator de forma da bicamada, que carrega informações sobre o formato da bicamada e o seu contraste eletrônico e $S(q)$ é o fator estrutural, relacionado com a periodicidade da bicamada lipídica, descrito por um modelo baseado na teoria de Caillé modificada (MCT) para sistemas lamelares (TREVISAN *et al.*, 2011).

Além disso, a intensidade de luz espalhada varia em função do ângulo de espalhamento, que pode ser encontrado de acordo com a definição do vetor de espalhamento (q), dada pela Equação (8):

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (8)$$

onde 2θ é o ângulo de espalhamento e λ é o comprimento de onda da radiação.

A partir do vetor de espalhamento é possível definir a periodicidade dos lipossomas, que indica a distância de repetição das bicamadas (CAVALCANTI, 2001). Assim, a distância interlamelar é dada pela Equação (9):

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (9)$$

Os experimentos foram conduzidos na linha SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) usando uma energia luminosa de 8 keV ($\lambda = 1,55 \text{ \AA}$) e distância de 561 mm entre amostra e detector.

4.7. Caracterizações

4.7.1. Diâmetro e polidispersidade

O diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das partículas produzidas foram determinados através do espalhamento dinâmico de luz (DLS) através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) utilizando laser de alta potência, em equipamento Malvern, Zetasizer Nano Series ZS com ângulo fixo de 173° em relação ao feixe de raio laser (He-Ne) incidente.

O princípio do método baseia-se no movimento Browniano e o relaciona ao tamanho das partículas. Isso é feito a partir da medida da intensidade da luz espalhada quando um feixe de laser é incidido sobre a amostra. A Equação (10) é utilizada para prever a relação entre tamanho e velocidade da partícula no movimento Browniano, chamada Equação de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot D \cdot \eta} \quad (10)$$

onde R_h é o raio hidrodinâmico da partícula, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, D é o coeficiente de difusão das partículas e η é a viscosidade do solvente (LASIC, 1993).

A intensidade de luz espalhada pelas partículas fornece a distribuição em intensidade, que é proporcional ao diâmetro à sexta potência, segundo a teoria de Mie, convertida facilmente à distribuição em número (VAN DE HULST, 1957).

Os diâmetros dos lipossomas foram analisados em relação às distribuições de intensidade e de número de partículas, polidispersidade (PI) e ao seu diâmetro hidrodinâmico médio cumulativo (Z-average), calculado por uma média cumulativa ($n = 3$) dos diâmetros por intensidade de luz espalhada.

4.7.2. Potencial zeta

O potencial zeta representa o potencial elétrico de superfície das partículas, que é influenciado pela viscosidade, constante dielétrica do meio e intensidade do campo elétrico. Esses fatores estão relacionados à dissociação de grupos funcionais e à adsorção de espécies iônicas presentes no meio. Este potencial indica a estabilidade do sistema coloidal, sendo que cargas iguais de valor alto (maiores que 30 mV em módulo) tendem a se repelir, permanecendo estáveis por mais tempo.

O potencial zeta das partículas produzidas foi determinado em água utilizando o equipamento Malvern, Zetasizer Nano Series ZS. As medidas foram feitas em triplicata para cada uma das amostras analisadas.

4.7.3. Quantificação de fosfolipídios

A concentração molar de fosfolipídios nas dispersões lipossomais foi determinada indiretamente através da quantificação do teor de fosfato (PO_4^{3-}) através de um ensaio colorimétrico baseado no método de CHEN *et al.* (1956).

Todo o material utilizado no ensaio foi limpo com detergente livre de fosfato. As soluções lipossomais analisadas foram previamente diluídas a 1 mM para garantir a adequação ao limite de detecção do método. Adicionaram-se a tubos de ensaio 100 μL de amostra (soluções-padrão, lipossomas ou branco) e 500 μL de ácido sulfúrico 10 N, que promove oxidação das cadeias de ácido graxo dos fosfolipídios até que estas se decomponham em carbonos elementares. Os tubos foram aquecidos em chapa de aquecimento a aproximadamente 280 °C por 30 minutos – para garantir uma distribuição de calor uniforme na mistura foram colocadas 2 a 3 esferas de vidro nos tubos antes de adicionar as amostras. Após os 30 minutos, os tubos foram retirados do aquecimento e resfriados à temperatura ambiente para posterior adição de 165 μL de peróxido de hidrogênio, com a finalidade de garantir a oxidação total dos carbonos a dióxido de carbono (CO_2) – esta adição foi conduzida sob um exaustor para remoção do CO_2 produzido. Nesta etapa, os tubos foram reaquecidos a 280° C por mais 30 minutos e novamente resfriados à temperatura ambiente.

Terminada a digestão, o fósforo é liberado na forma de ortofosfato. Para tornar possível sua quantificação, adicionaram-se a cada um dos tubos: 4 mL de água deionizada, 500 μL de molibdato de amônio a 2,5 % (m/m) e 500 μL de ácido ascórbico a 8 % (m/m). O ortofosfato e o molibdato de amônio formam um complexo que é reduzido pelo ácido ascórbico e adquire a coloração azul.

Para intensificação da cor, os tubos foram agitados e aquecidos em banho termostatzado a 80° C por 5 minutos, sendo então rapidamente resfriados em água à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 830 nm e seu valor foi convertido em concentração utilizando a relação representada pela equação da reta obtida com a curva padrão (Apêndice I).

A curva padrão foi determinada utilizando soluções aquosas de fosfato de sódio dibásico heptahidratado com concentrações conhecidas de 0,25 a 1,50 mM e solução isenta de fosfato (branco). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.4. Quantificação da CH8

O solvente utilizado para quantificação da chalcona CH8 foi etanol, uma vez que apesar de sua baixa lipofilicidade foi capaz de solubilizar completamente o fármaco em concentrações abaixo de 0,15 mM (50 mg/L). Foi realizada uma varredura da CH8 solubilizada em etanol para determinação do comprimento de onda a ser utilizado.

As dispersões lipossomais contendo CH8 foram diluídas na razão 1:10 (v/v) em etanol e submetidas à sonicação por 5 minutos para liberação da CH8 da matriz lipídica. A absorbância foi medida em espectrofotômetro com cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico). O comprimento de onda utilizado foi 337 nm. O valor da absorbância foi convertido em concentração a partir da relação representada pela equação da reta obtida com a curva padrão (Apêndice II).

A curva padrão foi determinada utilizando soluções de CH8 em etanol com concentrações conhecidas de 0,01 a 0,05 mM. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para validar a utilização do método, também são apresentados no Apêndice II os dados de precisão e exatidão relacionados à quantificação de CH8.

4.7.4.1. Precisão

A precisão intraensaio utilizando os mesmos padrões de chalcona foi determinada a partir da média da triplicata das absorbâncias dos padrões de 0,01; 0,03 e 0,05 mM de chalcona analisadas em um único dia. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação (11):

$$CV\% = \frac{\sigma}{CMe} \cdot 100 \quad (11)$$

onde σ = desvio padrão; CMe = Concentração média experimental.

O limite estabelecido pela resolução RDC nº 135, de 29 de maio de 2003, é um CV% de no máximo 10% (ANVISA, 2003).

4.7.4.2. Exatidão

A exatidão intraensaio foi determinada a partir da média da triplicata das absorbâncias dos padrões de 0,01; 0,03 e 0,05 mM de chalcona analisadas em um único dia. Os resultados foram

expressos como a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a Equação (12):

$$E = \frac{CMe}{Ct} . 100 \quad (12)$$

onde CMe = Concentração média experimental; Ct = Concentração teórica

Os cálculos de exatidão devem estar em 80 - 120% e os desvios não devem exceder 15% (ANVISA, 2003).

4.7.5. Eficiência de incorporação e capacidade de carregamento da CH8

A eficiência de incorporação (EI) da CH8 em lipossomas foi determinada pelas razões mássicas finais e iniciais do fármaco e do lipídio (F, F₀, L, L₀), sendo a massa final de CH8 determinada conforme seção 4.7.4 e a massa final de lipídios, conforme seção 4.7.3. Assim, a E foi calculada através da Equação (13):

$$E = \left[\frac{(F/L)}{(F_0/L_0)} \right] . 100 \quad (13)$$

A capacidade de carregamento do fármaco (DL) foi determinada pela razão entre a massa de CH8 incorporada (C) e a massa dos fosfolipídios (F), segundo a Equação (14):

$$DL = \frac{C}{M} \quad (14)$$

4.8. Análise estatística

O método utilizado para avaliar estatisticamente a variância dos dados de caracterização obtidos foi ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste-t bicaudal a 5% de significância (p < 0,05).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção será apresentada na forma de capítulos, contendo os artigos submetidos a periódicos científicos, selecionados de acordo com a afinidade do periódico com o aspecto abordado.

Inicialmente foi realizado um estudo dos processos que empregam altas taxas de cisalhamento na produção de lipossomas visando verificar a influência da elasticidade dos lipossomas produzidos por alto cisalhamento na incorporação da CH8 (artigo 1). A partir desse estudo foi possível propor o melhoramento do processo de incorporação da CH8 em lipossomas de EPC (artigo 2).

***5.1. ELASTICIDADE DE LIPOSSOMAS PRODUZIDOS POR ALTO CISALHAMENTO E
INCORPORAÇÃO DE NITROCHALCONA CH8***

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
“JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY”

ELASTICITY OF LIPOSOMES SIZED BY SHEARING AND INCORPORATION OF CH8 NITROCHALCONE

Mariana Beatriz Quinália and Maria Helena Andrade Santana.*

*Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil*

**Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of
Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil. Av. Albert
Einstein, 500 – CEP 13083-852 – Campinas – SP – Brasil.*

+55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Keywords: liposomes, CH8, high shear processes, leishmaniasis.

Abstract

High shear processes have been used to reduce the size and homogenize the size distribution of liposomes in their scalable production. However, high shear rates modify the liposome structure, which may affect the loading of hydrophobic drugs. This work aimed to study the influence of shearing on the elasticity of liposomes and its effects on the incorporation of CH8 nitrochalcone, a highly hydrophobic drug indicated to treat cutaneous leishmaniasis. The liposomes were composed of egg phosphatidylcholine. They were produced and sized in a single step by ethanol injection under shearing with a Cowles impeller and an Ultra Turrax[®]. Small angle X-ray scattering spectra showed that the shearing reduced the interlamellar distance of the liposomes. The interlamellar distance did not change with the shearing intensity in the range of Cowles stirring, but it decreased for higher shearing provided by the Ultra Turrax[®]. The elastic constant, which is related to the stiffness of the bilayer and depends on the structure of the liposomes, increased with increasing shearing intensity for both stirrers. The shearing also reduced the mean diameter of the liposomes and the size distributions. The lowest shearing, provided by the Cowles stirrer, was beneficial for the elasticity and the loading of CH8 in the liposomes. Therefore, the elasticity of the bilayer is a determining factor for the loading of hydrophobic drugs in liposomes.

1 INTRODUCTION

Liposomes are colloidal phospholipid aggregates, widely used for drug encapsulation, controlled delivery and specific targeting¹⁻⁴. The insertion of hydrophobic drugs in the phospholipid membrane tends to destabilize the liposome structure, and a favorable microenvironment is required for the incorporation of these drugs⁵. Liposomes produced in the laboratory by Bangham's method, followed by sonication or extrusion through polycarbonate membranes, have a fluid bilayer. However, when high shear rates are used, the interlamellar distance is reduced by the loss of water, as shown by small angle X-ray scattering (SAXS) measurements⁶. This makes the bilayer stiffer, which affects the encapsulation of hydrophobic drugs. High shear processes using stirrers have been attractive for the production of liposomes because drugs can be loaded during the formation of the liposomes, and because liposomes of a smaller size and narrower size distribution can be formed in a single step. Furthermore, this method boasts ease of operation and scalability with available commercial equipment⁷⁻¹¹.

Cutaneous leishmaniasis is the most common form of leishmaniasis, with a global incidence of 1-1.5 million cases around the world¹². The nitrochalcone 3-nitro-2-hydroxy-4,6-dimethoxychalcone (CH8) is an antileishmanial agent derived from natural chalcone¹³ (Figure 1). Previous studies have demonstrated the selectivity of CH8 against the parasite, as well as its efficacy *in vivo* with intralesional doses of only 0.3 mM (1 mM = 10^{-7} mol/cm³); its potency is over 100 times greater than the reference drug Pentosan^{®14}. However, the high hydrophobicity of CH8 limits its penetration into the skin in topical treatments.

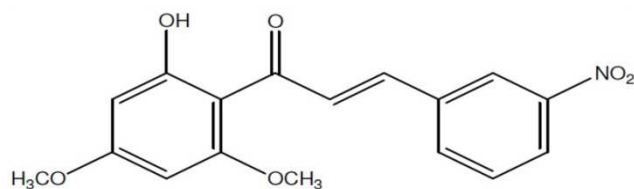


Figure 1: Molecular structure of CH8 nitrochalcone.

Incorporating CH8 in liposomes composed of low-phase transition temperature phospholipids, such as egg phosphatidylcholine, were used to produce elastic liposomes in an effort to enhance the efficacy of CH8 in topical treatments. Conventional liposomes were prepared by Bangham's method. The results show a higher amount of CH8 in the tissues of infected rats when conventional liposomes were administered because the CH8 can penetrate the skin more deeply. Thus, the incorporation of CH8 conferred favorable packing in the lipid bilayer, thereby promoting a deeper penetration of CH8 in the skin¹². To scale up the liposome production, we studied the effects of shearing on the elasticity of the bilayer in conventional liposomes and also on the incorporation of CH8. To the best of our knowledge, there are no studies in the literature on the influence of the shear rate on the incorporation of hydrophobic drugs in liposomes.

Initially, the effects of shearing on the interlamellar distance of the liposomes were analyzed using SAXS. The elastic constant, which is related to the stiffness of the structure, was then calculated. Afterwards, the hydrodynamic diameter and the size distribution of the liposomes were also determined, along with the zeta potential. CH8 was loaded during the formation of the egg phosphatidylcholine liposomes under two levels of shear rates provided by Cowles and Ultra Turrax[®] stirrers. The size, distribution and zeta potential were evaluated for empty and CH8-loaded liposomes. The incorporation of CH8 in the liposomes was characterized by the efficiency and drug loading. The results obtained are useful for the scaling up of liposome production and the technological development of novel pharmaceutical products based on nanotechnology.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. Liposome production

Liposomes were formed by using egg L- α -phosphatidylcholine (EPC) at 80 to 85 % purity (Lipoid E-80, Lipoid GmbH). The chalcone 3-nitro-2-hydroxy-4,6-dimethoxychalcone (CH8) was synthesized in the Immunopharmacology Laboratory of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. A lipid concentration of 10 mM was used according to previous studies^{15,16}.

2.1.1. Ethanol injection process

Ethanol injection with mechanical stirring was the scalable process used to produce the liposomes². The modification of high lipid concentration (10 mM) was introduced to the original process, according to a procedure from Trevisan *et al.*⁶.

The experiments were carried out by continuously feeding a lipid suspension (200 mM) in ethanol (5 mL) through a peristaltic pump at a flow rate of 0.3 mL/s into a 150 mL glass tank with four baffles containing deionized water (95 mL) under mechanical stirring. Afterwards, the liposome dispersion was stirred at the selected speed for 15 min and stored for at least 12 h. The used stirrers were an Ultra Turrax[®] T25 (IKA, impeller type 10G) at 24000 rpm and a Cowles impeller (TE-039/l, Tecnal, 27 mm diameter) at 1800 rpm.

2.1.2. Incorporation of CH8

CH8 was incorporated into the liposomes during their formation by adding the drug to the lipid-containing phase, which was dispersed in ethanol, for a 0.2 mM CH8 concentration in the liposome dispersions. That concentration was chosen to prevent drug precipitation during liposome preparation or drug expulsion from the liposomes during storage, based on preliminary results on pre-formed liposomes prepared under high-shear processes.

2.2. Shear rate calculation

For stirrers, the shear rate is a linear function of the angular velocity of rotation of the impeller, given by Equation 1:

$$\dot{\gamma} = k \cdot \omega \quad (\text{Eq. 1})$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate, ω is the angular velocity (rad/s) and k is a constant dependent on the design of the impeller used¹⁸. The k values for Cowles impeller are not reported in the literature. However, because the geometry of Cowles impellers is similar to that of the Rushton turbine and shovel impellers (k from 10 to 13)¹⁹, we adopted an intermediate value of 11 for value of the Cowles impeller's constant, k .

The shear rate of the Ultra Turrax[®] stirrer was determined using an approach between the geometry of this impeller and the rotational viscometer, whose shear rate is given by Equation 2²⁰:

$$\dot{\gamma} = 2 \cdot \omega \cdot \frac{\alpha^2}{\alpha^2 - 1} \quad (\text{Eq. 2})$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate, ω is the angular velocity (rad/s) and α is given by Equation 3²⁰, in which R_S and R_R are the stator radius and rotor radius of the Ultra Turrax[®], respectively.

$$\alpha = \frac{R_S}{R_R} \quad (\text{Eq. 3})$$

For the microfluidizer, the shear rate was obtained from graphs relating pressure *versus* shear, provided by the equipment manufacturer.

2.3. Interlamellar distance of liposomes

Structural information about the liposomes, such as the number of bilayers and interlamellar distances, were provided by small angle X-ray scattering (SAXS) analysis.

Assuming that the system was composed of two phases, unilamellar and multilamellar vesicles, the scattering intensity $I(q)$ can be written as shown in Equation 4:

$$I(q) = P(q) \cdot S(q) \quad (\text{Eq. 4})$$

where $P(q)$ is the bilayer form factor⁶, which carries information about the shape of the bilayer and its electronic contrast, and $S(q)$ is the structural factor, which is related to the periodicity of the lipid bilayer and described by a model based on the modified Caillé Theory (MCT) for lamellar systems.

The scattering intensity varies as a function of the scattering angle, which can be determined according to the definition of the scattering vector (q), given by Equation 5:

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad (\text{Eq. 5})$$

where 2θ is the scattering angle and λ is the incident wavelength of the radiation.

The periodicity of the liposomes can be defined from the vector scattering, which indicates the repeat distance of the bilayers²¹. Thus, the interlamellar distance is given by Equation 6:

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (\text{Eq. 6})$$

The SAXS experiments were performed on the beamline SAXS1 at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using a beam energy of 8 keV ($\lambda = 1.55 \text{ \AA}$) and a sample to detector distance of 561 mm.

The interlamellar distances were determined in unloaded liposomes at 6, 30, 72 and 145 mM EPC. The liposomes were produced under shearing from Cowles stirrer working at 1300, 2500 and 4800 rpm, Ultra Turrax[®] at 6400, 12000 and 22000 rpm and at 20 MPa and 85 MPa pressure in the microfluidizer.

2.3.1. Microfluidization process

The dispersion of EPC pre-formed liposomes obtained by ethanol injection was submitted to high-pressure homogenization in a microchannel microfluidizer (M-110P, Microfluidics) for 2 cycles at 20 and 85 MPa.

2.4. Elastic constant of the liposomes

According to Diat *et al.*²², the size of the liposomes varies with the shear rate as shown in Equation 7:

$$R = \sqrt{\frac{4 \cdot \pi \cdot (2 \cdot k + \bar{k})}{\mu \cdot d \cdot \dot{\gamma}}} \quad (\text{Eq. 7})$$

where R (nm) is the radius of the liposomes, k (J) is the modulus elastic constant of the membrane and $\bar{k}$ (J) is the Gaussian elastic constant of the membrane (related to the stiffness), μ (cP) is the viscosity of the solution, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) is the shear rate and d (Å) is the interlayer distance.

2.5. Liposome characterization

2.5.1. Physicochemical properties

The mean hydrodynamic diameter and the size distribution of the liposomes were determined by dynamic light scattering using a (He-Ne) laser at a fixed angle of 173° in a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments). The diameters were analyzed in terms of their intensity (I-distribution) and number (N-distribution). The zeta potential was determined using the same equipment. The measurements were performed in triplicate.

2.5.2. Quantification of the CH8 in the liposomes

Initially, the samples were diluted in a 1:10 ratio (v/v) in ethanol and sonicated (Cole-Parmer, 8890, Illinois, USA) for 5 min to release the CH8 from the lipid matrix. Afterwards, the CH8 concentration was determined in triplicate by spectrophotometry at 337 nm (U2001, Hitachi), using a standard curve for CH8 concentrations from 0.01 to 0.05 mM.

2.5.3. Quantification of the phospholipids

The phospholipid concentration was determined by phosphate quantification, using a colorimetric method described by Chen *et al.*²³. Briefly, the samples were diluted to 1 mM and digested in an acidic medium to produce inorganic phosphate. Afterwards, ammonium molybdate was added to the samples to generate a complex, which was reduced by ascorbic acid, resulting in a blue color. The concentration of the phospholipids was determined in triplicate by absorbance measurements at 830 nm, using a standard curve.

2.5.4. Efficiency of the CH8 incorporation and loading in the liposomes

The efficiency (E) of the CH8 incorporation in the liposomes was determined from the initial and final molar ratios of the CH8 and the phospholipid (Equation 8).

$$E = \frac{\left(\text{CH8/phospholipid}\right)_{\text{final}}}{\left(\text{CH8/phospholipid}\right)_{\text{initial}}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

The CH8 loading (L) in the liposomes was calculated using Equation 9:

$$L = \frac{\text{mass of incorporated CH8}}{\text{mass of phospholipids}} \quad (\text{Eq. 9})$$

2.6. Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA, and the averages were compared by t-test at 5% significance ($p < 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Interlamellar distances of the liposomes

Figure 2 shows the SAXS profiles obtained from liposome dispersions prepared under shear by Cowles impeller at 4200 rpm and containing lipid concentrations 6, 30, 72 and 145 mM.

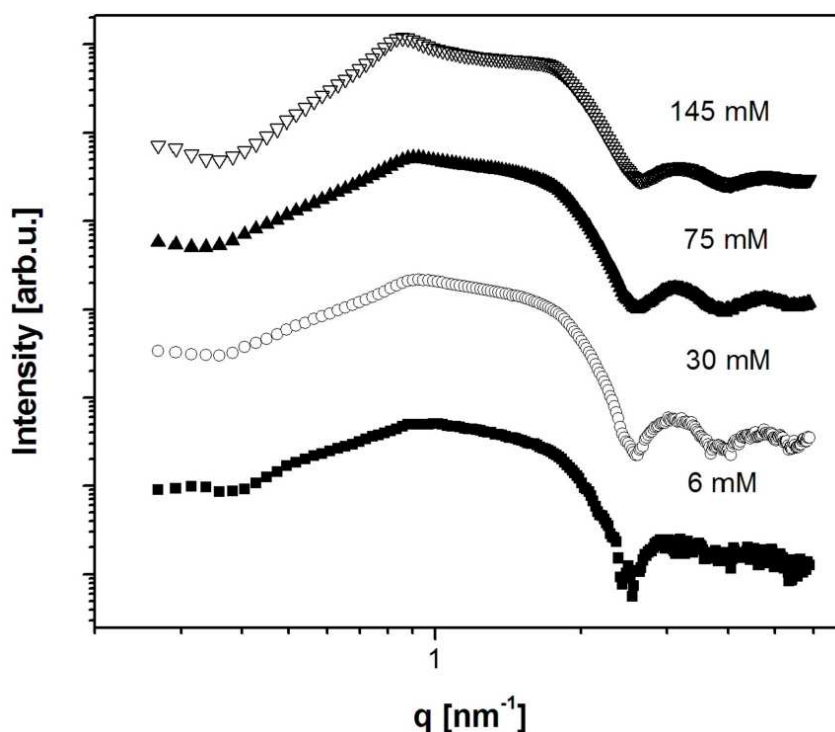


Figure 2. Small angle X-ray scattering (SAXS) profiles of the unloaded liposomes produced at 6, 30, 72 and 145 mM lipid concentration and under shear by Cowles impeller at 4200 rpm.

The lipid concentration influenced the scattering profiles of SAXS. Higher lipid concentrations showed better resolution of the curve. The diffraction peak was well defined for 145 mM lipid. Thus this concentration was used to calculate the interlamellar distances in the further experiments. Figure 3 compares the SAXS profiles for Cowles impeller and Ultra Turrax[®] at three different speeds of rotation and microfluidizer at two different pressure levels.

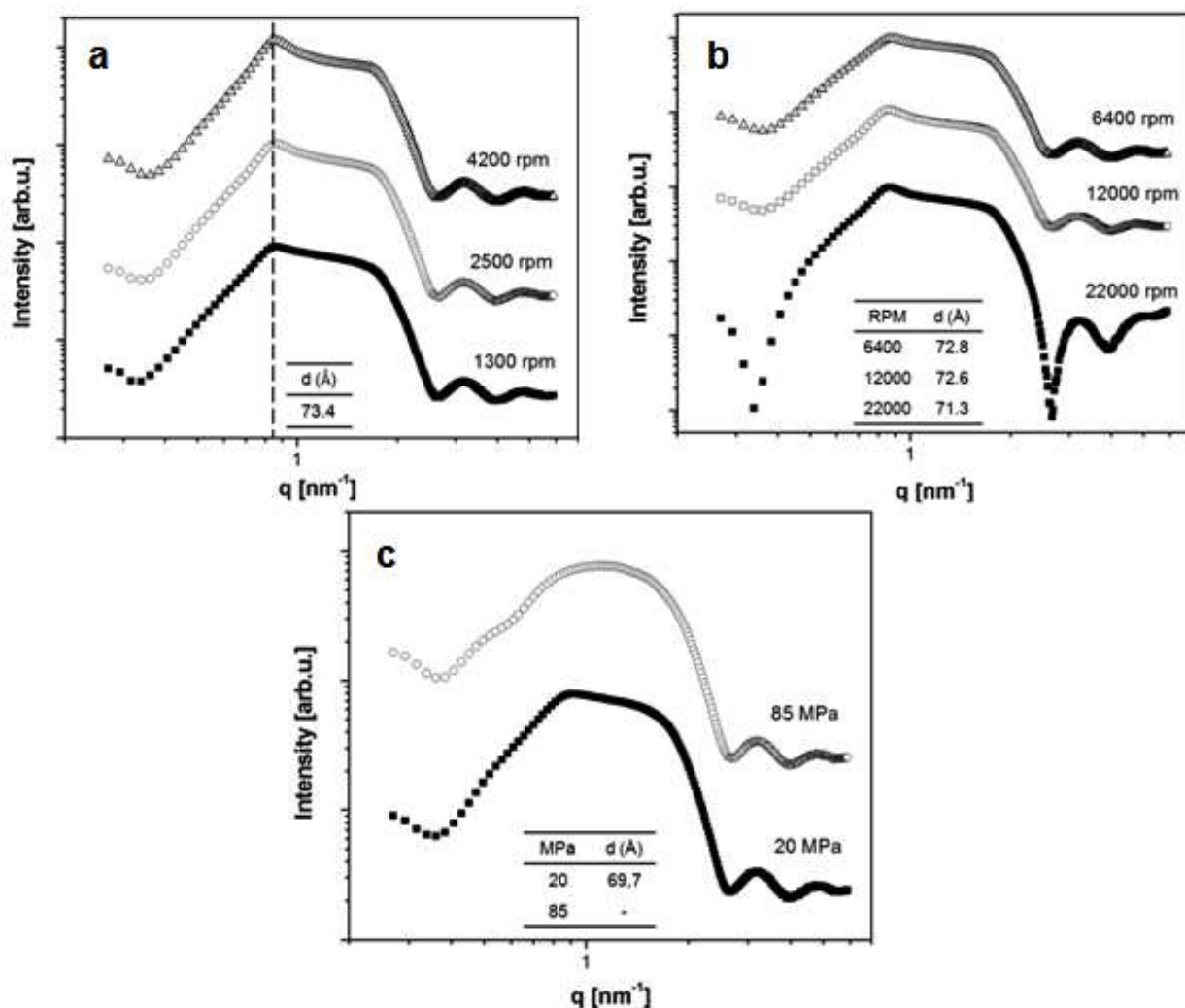


Figure 3. Small angle X-ray scattering (SAXS) profiles of the unloaded liposomes produced under high shear by a Cowles impeller (A) and an Ultra-Turrax® (B) at three different speeds of rotation, and a microfluidizer (C) at two different pressures. The calculated interlamellar distances for each curve are also presented.

The curves from Figure 3a show that the diffraction peak of the bilayer does not change with the shearing intensity for the Cowles stirrer, causing no change in the interlamellar distance. However, slight changes in the peaks with increasing shearing from the Ultra Turrax® could be observed, indicating a reduction in the interlamellar distance and an increased stiffness of the liposome bilayer (Figure 3b). Figure 3c shows that the curve from higher shear level (85 MPa) appears more rounded, with no visible peak, indicating that the effect of light scattering rather

than diffraction (characteristic of the presence of repeated lamellae) is dominant. Therefore, the highest shearing from microfluidizer produces unilamellar liposomes predominantly.

Figure 4 compares the curves generated by the different methods, in which the displacement of the peaks can be observed.

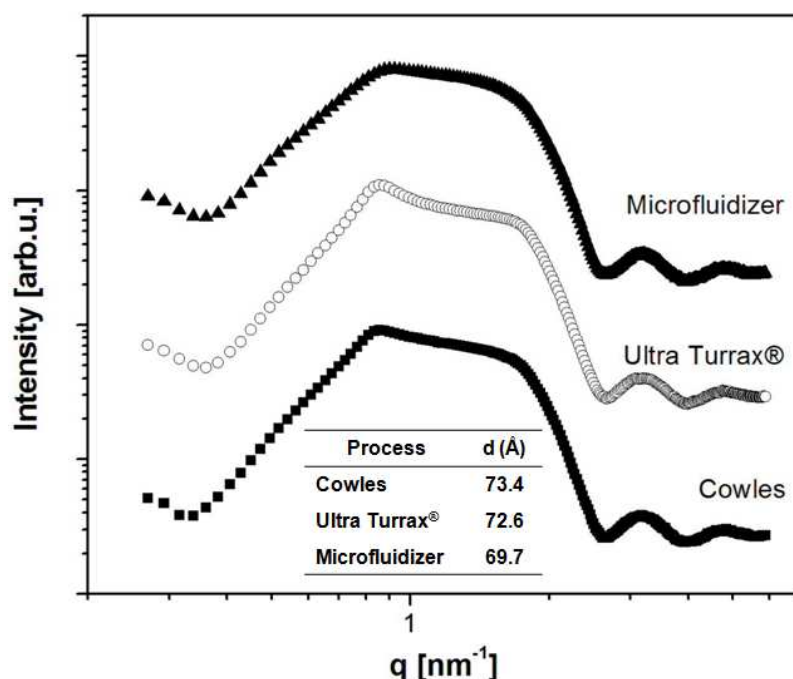


Figure 4. Comparison of the profiles from the high shear equipments: Cowles (1300 rpm), Ultra Turrax® (12000 rpm) and Microfluidizer (20 MPa).

The variations in the interlayer distance are dependent on the level and intensity of the applied shearing. The lowest value for the distance was obtained from liposomes prepared by microfluidizer process. The shape of the curves from Figure 4 indicates that the liposomes produced by different methods have two populations of particles. Peaks indicate a multilamellar fraction, most visible in Ultra Turrax® process, and “shoulders” represents a fraction with fewer lamellae, which is higher in microfluidizer process.

3.2. Elasticity of the liposome bilayer

Table 1 compares the interlamellar distances, radius and the constant $\bar{k}$ calculated for liposomes produced by the Cowles or Ultra Turrax[®] stirrers and microfluidizer. The viscosity values showed no large variations as a function of the applied shear, resulting in a mean value of 2.0 cP for microfluidizer and 4.2 cP for other processes. For the interlamellar distance, the period given by Equation 6 was based on the data shown in Figure 3 for each stirrer. The elastic modulus k for EPC was considered 58 kJ, as described by Petrache *et al*²⁴.

Table 1. Elastic constants for the unloaded liposomes produced under high shear by the Cowles impeller and the Ultra Turrax[®] stirrer

Stirrer	Rotational speed (rpm)	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	d (Å)*	R (μm)	$\bar{k}$ (10 ⁻³ J)**
Cowles	1300	1497	73.4	0.312	-112.43
	2500	2880	73.4	0.227	-112.36
	4200	4838	73.4	0.187	-111.85
Ultra Turrax [®]	6400	5714	72.8	0.262	-106.42
	12000	10715	72.6	0.194	-106.21
	22000	19643	71.3	0.150	-105.47
Microfluidizer	-	2951849	69.7	0.075	68.2

* d = 2π/q, where q is given by SAXS analysis

** $\bar{k} = (R^2 \cdot \mu.d. \dot{\gamma} / 4\pi) - 2.k$ (from Equation 6), where k = 58 kJ²⁴

The elastic constant $\bar{k}$ is inversely proportional to the elasticity or directly proportional to the stiffness of the liposomal bilayer. The results indicate that the bilayer stiffness increases at higher rates of applied shear, which explains the difficulty of inserting hydrophobic molecules into liposomes produced at higher shear rates. Microfluidization process presented the highest

stiffness, with elastic constant value over 100 times higher than the stirrers. Thus, the microfluidizer was not used for incorporating CH8 in the further studies.

3.3. Physicochemical properties of the liposomes

The size distributions of the liposomes are shown in Figure 5, where each curve represents an independent assay with three separate measurements.

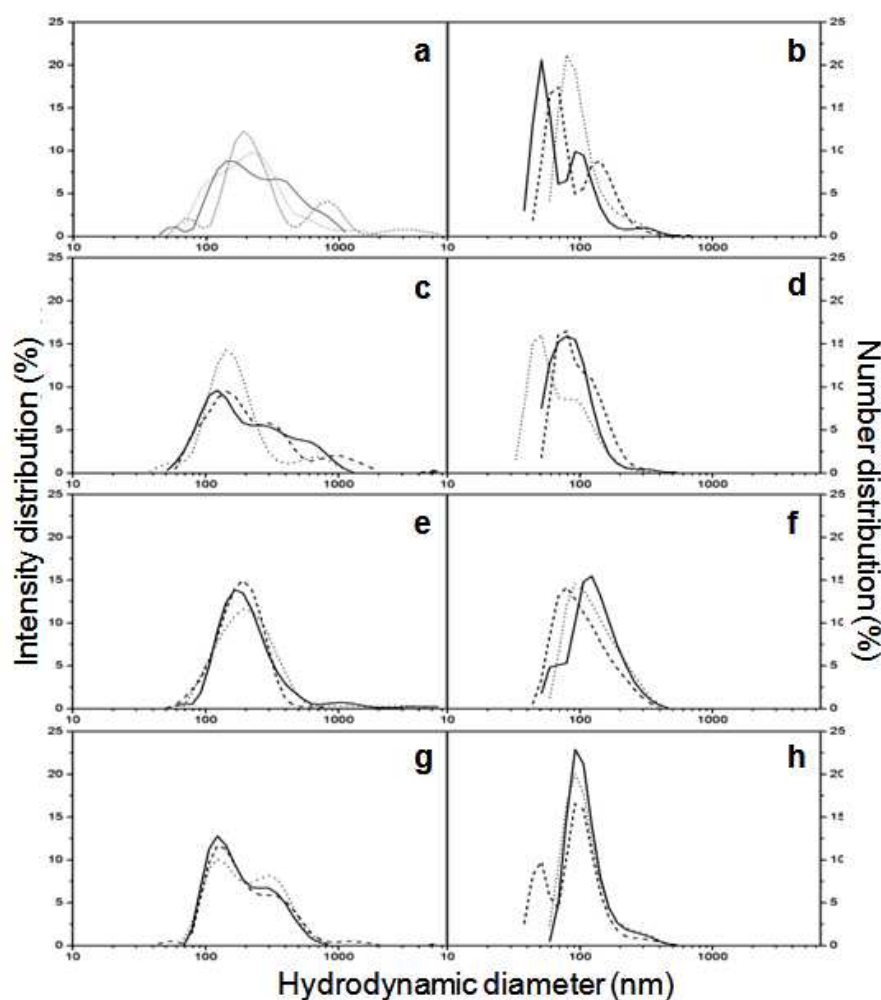


Figure 4. Size distribution profiles for unloaded liposomes (a and b) and CH8-loaded liposomes (c and d) produced under Cowles stirring and unloaded liposomes (e and f) and CH8-loaded liposomes (g and h) produced under Ultra Turrax® stirring. The distributions are shown as the intensity of scattered light (a, c, e and g) and the number of particles (b, d, f and h). Each curve represents an independent assay with triplicate measurements.

The unloaded liposomes produced with the Cowles impeller and the Ultra Turrax[®] had a diameter distribution ranging from 40 to 300 nm and from 50 to 400 nm, respectively. Besides that, the intensity distribution shows that there is a wide range of diameters, varying by 50-5000 nm in both cases (Figures 5a, 5b, 5e and 5f).

The curves shows that the Ultra Turrax[®] process had a higher reproducibility.

The intensity distribution for the CH8-loaded liposomes produced by the Ultra Turrax[®] stirring process (Figure 5g) shows an enlargement of the peaks, suggesting that the insertion of CH8 caused an increase in the diameter of the liposomes, although the number distribution (Figure 5h) indicates that this increase is not statistically significant.

CH8 incorporation in the Cowles process resulted in a narrowing of the intensity distribution peaks (Figure 5c), and the number distribution peaks are shifted slightly to the left, indicating a significant reduction of the diameter. These results suggest that the incorporation of CH8 increased the lamellar packing of the liposomes, thereby contributing to an increase of their elasticity, as previously reported¹². Therefore, the deeper incorporation of CH8 in the liposomes counterbalanced the bilayer stiffness caused by the high shearing and contributed to its stability inside the liposomes.

Table 2 presents the results obtained in the analysis of the zeta potentials (ZP) of the loaded and unloaded liposomes according to the stirrer used, the rotational speed and the corresponding shear rate ($\dot{\gamma}$).

Table 2. Zeta potentials (ZP) of the unloaded and CH8-loaded liposomes produced by ethanol injection under stirring according to the stirrer used and the corresponding shear rate ($\dot{\gamma}$).

Stirrer	Rotational speed (rpm)	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	ZP (mV)
Cowles - unloaded	1800	2074	-39 $\pm$ 2
Cowles - 0.2 mM CH8	1800	2074	-35 $\pm$ 1*
Ultra Turrax [®] - unloaded	24000	21430	-43 $\pm$ 7
Ultra Turrax [®] - 0.2 mM CH8	24000	21430	-39 $\pm$ 1

* Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to the unloaded liposomes

The zeta potential was higher for the unloaded liposomes produced by Cowles process, indicating a higher exposure of the phosphate groups of the lipids in the external layer of the unloaded liposomes. The small difference between zeta potential of loaded and unloaded liposomes indicates that the internalization of the CH8 in the lipid bilayer produced no substantial changes in the charge density of the layer adjacent to the surface of liposomes.

The high absolute values of the zeta potential are an indication of the stability of the systems.

3.4. Efficiency of the CH8 incorporation and loading in the liposomes

The incorporation efficiencies and loading of CH8 during the formation of the liposomes under shearing are shown in Table 3.

Table 3. Incorporation efficiency and loading of CH8 by ethanol injection under shearing

Stirrer	Incorporation efficiency (%)	CH8 Loading (mg CH8/ g phospholipid)
Cowles	95 $\pm$ 8	9,0 $\pm$ 0,6
Ultra Turrax [®]	80 $\pm$ 16	7,5 $\pm$ 0,9

These results confirm the tendency of higher CH8 loading in liposomes obtained by processes with lower levels of shear¹². Furthermore, the incorporation of low concentrations (0.2 mM) of CH8 avoided the precipitation of drug crystals during storage of the liposomes.

4 CONCLUSIONS

The production of liposomes by ethanol injection under high shearing provided by Cowles and Ultra Turrax[®] stirrers was efficient for the production of nanosized liposomes and the incorporation of CH8 in a single step. The elasticity of the bilayer, which is dependent of its interlamellar distance, was the determining factor in the incorporation of CH8 in the liposomes. These findings contribute to the development of a new product for the treatment of cutaneous leishmaniasis, as well as for further studies involving other hydrophobic drugs.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq / Brazil), Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS/Brazil) and Dr. Leide Passos Cavalcanti for the SAXS analysis, Dr. Bartira Rossi-Bergmann for donation of CH8 and for the previous studies, and Rafael Lichy for the collaboration in the experiments.

6 REFERENCES

1. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 2^a Ed., Academic Press, Oxford (1992)
2. D. D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam (1993)
3. F. Frézard, Braz. J. Med. Biol. Res., 32, 181-189 (1999)
4. W. E. Bawarski, E. Chidlowsky, D. J. Bharali and S. A. Mousa, Nanomedicine: NBM, 4, 273-282 (2008)
5. A. S. Janoff, *Liposomes: rational design*. Marcel Dekker, Inc., New York (1999)
6. J. E. Trevisan, L. P. Cavalcanti, C. L. P. Oliveira, L. G. de La Torre and M.H.A. Santana in *Non-Viral Gene Therapy* edited X. Yuan, Intech (2011), p. 267.
7. F. L. Sorgi and L. Huang, Int. J. Pharm., 144, 131-139 (1996).
8. J. C. O. Villanova and V. Consigliere, Braz. J. Pharmac. Sci., 36, 179-200 (2000)
9. R. Barnadas-Rodríguez and M. Sabés, Int. J. Pharm., 213, 175–186 (2001)
10. O. R. Justo, *Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo*. Thesis. School of Chemical Engineering, University of Campinas, Brazil (2003)
11. A. K. Thompson and H. Singh, J. Dairy Sci., 89, 410-419 (2006)
12. B. Rossi-Bergmann, C. A. B. Falcão, B. Zanchetta, M. V. L. B. Bentley and M. H. A. Santana, in *Nanocosmetics and Nanomedicines*, R. Beck, S. Guterres and A. Pohlmann, Ed., Springer, Porto Alegre, (2011), p. 181-196.
13. P. Boeck, C. A. B. Falcão, P. C. Leal, R. A. Yunes, V. C. Filho, E. C. Torres-Santos and B. Rossi-Bergmann, Bioorg. Med. Chem., 14, 1538-1545 (2006)
14. E. C. Torres-Santos, M. I. Sampaio-Santos, F. S. Buckner, K. Yokoyama, M. Gelb, J. A. Urbina and B. Rossi-Bergmann, J. Antimicrob. Chemother., 63, 469–472 (2009)

15. A. C. D. Rodas, P. S. Lopes and O. Z. Higa, in *Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction*, A. Kocsis and H. Molnar, Ed., Nova Science, New York (2009), p. 111-126.
16. B. Zanchetta, *Sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona CH8 para tratamento da leishmaniose cutânea*. Dissertation. School of Chemical Engineering, University of Campinas, Brazil (2009)
17. A. D. Bangham, M. M Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252 (1965)
18. P. M. Doran, *Bioprocess engineering principles*. Academic Press, San Diego (1995)
19. S. Nagata, *Mixing principles and applications*, John Wiley & Sons, New York (1975)
20. J. F. Steffe, *Rheological methods in food process engineering*, Feeman Press, East Lansing (1992)
21. L. P. Cavalcanti, *Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron*. Thesis. Gleb Wataghin Physics Institute, University of Campinas, Brazil (2001)
22. O. Diat and D. Roux, *J. Phys. II*, 3, 9-14 (1993)
23. P. S. Chen, T. Y. Toribara and H. Warner, *Anal. Chem.*, 28, 1756-1758 (1956)
24. H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle and J. F. Nagle, *Chem. Phys. Lipids*, 95, 83-94 (1998)

5.2. MELHORIA DE PROCESSOS COM ALTAS TAXAS DE CISALHAMENTO PARA INCORPORAÇÃO DE NITROCHALCONA CH8 EM LIPOSSOMAS

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
“CHEMICAL ENGINEERING AND PROCESSING: PROCESS INTENSIFICATION”

IMPROVEMENT OF HIGH SHEAR PROCESSES FOR THE LOADING OF CH8 NITROCHALCONE IN LIPOSOMES

Mariana Beatriz Quinália^a and Maria Helena Andrade Santana^{a}.*

*^a Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering,
University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil*

**Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of
Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil*

Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 - Campinas - SP – Brasil.

+55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Highlights:

- Incorporation of hydrophobic drugs in egg phosphatidylcholine liposomes
- Ethanol injection scalable process under shear from a Cowles impeller, Ultra Turrax[®] and microchannel microfluidizer
- Physicochemical properties of egg phosphatidylcholine liposomes sized by a Cowles impeller, Ultra Turrax[®] and microchannel microfluidizer
- Loading of CH8 nitrochalcone in pre-formed or during formation of egg phosphatidylcholine liposomes produced by ethanol injection under high shearing

Abstract

This work aims to describe an improvement of a scalable process for the loading of CH8 nitrochalcone in egg phosphatidylcholine liposomes produced under high shearing. CH8 is a hydrophobic drug indicated to treat cutaneous leishmaniasis. The liposomes were produced by ethanol injection under shear from Cowles impellers, Ultra Turrax[®] stirrers and microchannel microfluidizer. Liposomes prepared by Bangham's method followed by extrusion in polycarbonate membranes, were used as a low shearing control. Initially, CH8 was incorporated in pre-formed liposomes. The results showed the expulsion and precipitation of loaded CH8 was proportional to the intensity of the applied shear rate. The best CH8 loading (37 ± 1 mg CH8/ g phospholipid) was provided by Bangham's method, indicating lower shear favours drug incorporation. The limitations of the high shearing processes were circumvented by incorporating a low concentration of CH8 (0.2 mol/m^3) during the formation of liposomes. This condition yielded a reasonable CH8-loading (9.0 ± 0.6 mg CH8/ g phospholipid) with no statistical difference between Cowles and Ultra Turrax[®] stirrers. CH8 precipitation occurred in the remaining cases. On the basis of these results, it can be anticipated that the use of Cowles stirrer is promising for the scalable process.

Keywords: liposomes, nanotechnology, chalcone, high shearing processes, leishmaniasis

1 Introduction

The nitrochalcone 3-nitro-2-hydroxy-4,6-dimethoxychalcone (CH8) is an antileishmanial agent derived from natural chalcone, which is used to treat cutaneous leishmaniasis [1]. Brazil is among the 6 countries (Iran, Afghanistan, Syria, Saudi Arabia, Brazil, and Peru) that, together, have 90% of the cases of cutaneous leishmaniasis [2]. Therefore, research that yields more effective pharmaceutical forms to topically administer antileishmanial drugs is urgently necessary [3]. Figure 1 shows the molecular structure of the CH8.

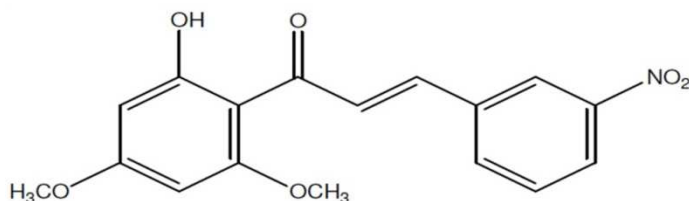


Figure 1. Molecular structure of the CH8 nitrochalcone

Previous studies have demonstrated the selectivity of CH8 against the parasite, as well as its efficacy *in vivo* with intralesional doses of only 0.3 mol/m³. CH8 has also been found to be 100 times more potent than the reference drug, Pentosan[®] [4]. However, the high hydrophobicity of CH8 limits its penetration into the skin. Incorporating CH8 in liposomes composed of low-phase transition temperature phospholipids, such as egg phosphatidylcholine, were used to produce elastic liposomes in an effort to enhance the efficacy of CH8 in topical treatments. Conventional liposomes composed of egg phosphatidylcholine surface modified by polyoxyethylene-glycol-8-lauril ester (PEG-8 L) were studied. The liposomes were prepared using Bangham's method followed by extrusion through polycarbonate membranes to obtain 100 nm liposomes. CH8 was incorporated into the pre-formed liposomes to prevent its precipitation on the membranes during extrusion. The results show a higher amount of CH8 in the tissues of infected rats when conventional liposomes were administered because the CH8 can penetrate the skin more deeply [5].

This successful formulation prompted the production of CH8-loaded liposomes with a scalable process to develop a new, nanotechnology-based product. Therefore, we extended the previous findings in this work by studying the loading of CH8 in high shear processes due to the ease of production and availability of large-scale equipment. Among the processes that use a high shear rate to reduce and homogenize the size of liposomes are mechanical stirring with impellers, Ultra Turrax[®] stirrers and the use of high-pressure microchannel microfluidizers [6-11].

In this work, the liposomes were produced by injecting ethanol under shear rates induced by Cowles impellers (2074 s^{-1}) and Ultra Turrax[®] (21430 s^{-1}) stirrers. A higher shear rate resulting from microchannel microfluidizer (5434362 s^{-1}) was also used to further reduce and homogenize the size of liposomes. The loading of CH8 was initially studied in pre-formed liposomes produced under high shearing and later improved by incorporating CH8 at low concentrations during liposome formation. Liposomes were characterized by their mean diameter, polydispersity and zeta potential. The performances of the processes were compared and discussed in terms of the physicochemical and CH8-loading properties of the liposomes.

2 Material and methods

2.1 *Liposome production*

Liposomes were formed by using egg L- α -phosphatidylcholine (EPC) at 80 to 85 % purity (Lipoid E-80, Lipoid GmbH). The nitrochalcone 3-nitro-2-hydroxy-4,6-dimethoxychalcone (CH8) was synthesized in the Immunopharmacology Laboratory of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. A lipid concentration of 10 mol/m^3 was used according to previous studies [12, 13].

2.1.1 Bangham's method and extrusion in membranes

The liposomes were initially prepared by Bangham's method [16]. Briefly, the lipid was solubilized in a mixture of solvents, namely chloroform and methanol (9:1 v/v), which were evaporated under vacuum (Rotaevaporator 802, Fisatom, TE-058, Tecnal vacuum pump) to form a lipid film in the rounded bottom of a glass flask. The film was hydrated with 10 mol/m³ HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) at pH 7.4 for 30 minutes. The dispersion of liposomes was allowed to stabilize for 2 hours under refrigeration (8 °C). The liposomes were then extruded through two stacked polycarbonate membranes with a 100 nm pore diameter (Osmonics, Inc., USA) using an extruder (T.001, Lipex Biomembranes, Inc.). Extrusion was performed under 12 kgf/cm² pressure over 15 cycles.

2.1.2 Ethanol injection process

The injection of ethanol under mechanical stirring is a scalable process to produce liposomes [17]. The original process was modified by using high lipid concentrations (10 mol/m³) according Trevisan *et al.* [11].

The experiments were carried out by continuously feeding a lipid suspension (200 mol/m³) in ethanol (5 mL) through a peristaltic pump at a flow rate 0.3 mL/s into a 150 mL glass tank with four baffles that contain water (95 mL) under mechanical stirring. The liposome dispersion was then stirred at the selected speed for 15 min and stored for at least 12 h. The Ultra Turrax[®] T25 (IKA, impeller 10 G) stirrer was used at 24000 rpm and the Cowles impeller (TE-039/l, Tecnal, 27 mm diameter) was used at 1800 rpm.

2.1.3 Microfluidization process

The dispersion of the liposomes that were pre-formed by ethanol injection was submitted to high-pressure homogenization in a microchannel microfluidizer (M-110P, Microfluidics) for 2 cycles at 85 MPa.

2.1.4 Incorporation of CH8

Initially, a CH8 suspension (10 mol/m³ CH8 in ethanol) was gradually added to the dispersions of the pre-formed liposomes (10 mol/m³ phospholipid) under low shear stirring using an anchor impeller at 120 rpm until precipitation. Figure 2 shows the flowchart of the incorporation of CH8 in liposomes pre-formed by high shear processes.

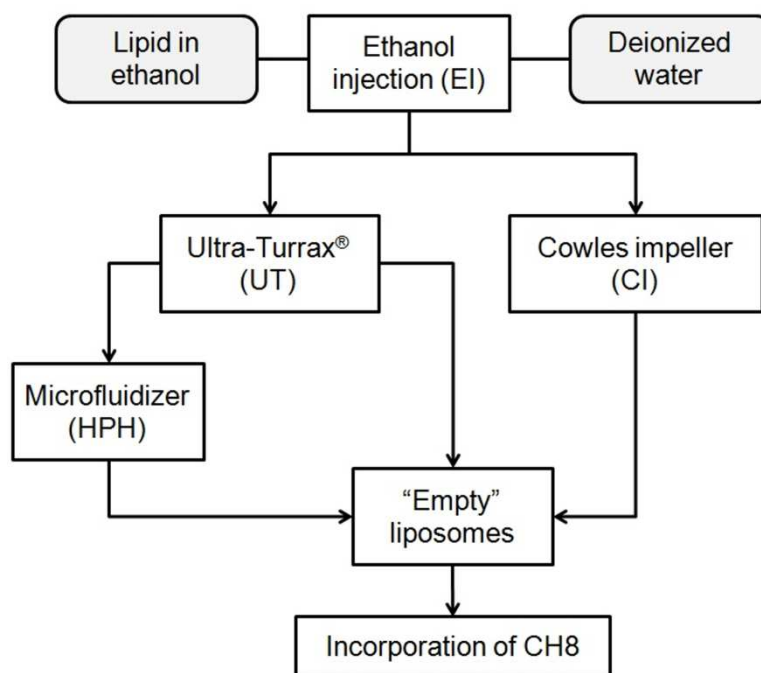


Figure 2. Flowchart of a scalable process that incorporates CH8 in pre-formed liposomes produced by the injection of ethanol. The size was controlled with the shear rates provided by Cowles impeller, Ultra Turrax® stirrer and microchannel microfluidizer.

Alternatively, the CH8 was incorporated during liposome formation by adding the CH8 with the lipid dispersed in ethanol. Figure 3 shows the flowchart of the alternative process. Two CH8 concentrations in the dispersion were studied: 0.9 mol/m³, chosen based on the maximum capacity that can be incorporated into pre-formed liposomes obtained by Bangham's method [13], and 0.2 mol/m³, chosen to prevent drug precipitation during liposome preparation or drug expulsion from liposomes during storage, according to the preliminary results in pre-formed liposomes prepared using high-shear processes.

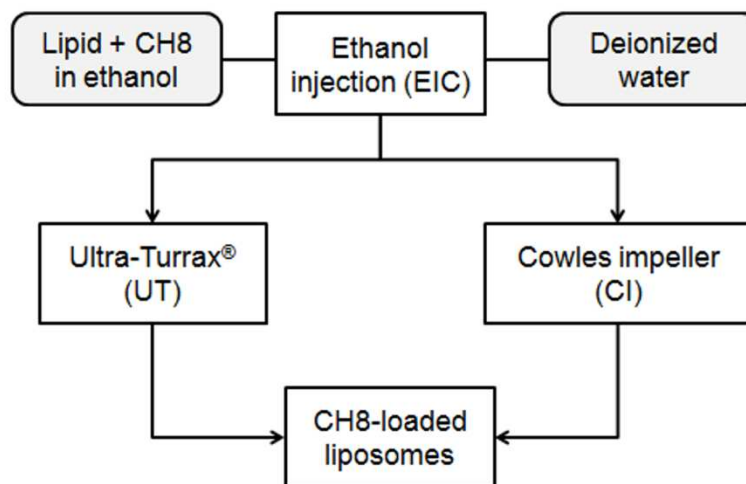


Figure 5. Flowchart for incorporation of CH8 during the formation of liposomes in ethanol injection processes under shearing from Cowles and Ultra Turrax[®] stirrers.

2.2 Shear rate calculations

For stirrers, the shear rate is a linear function of the angular velocity of the impeller rotation given by Equation 1:

$$\dot{\gamma} = k \cdot \omega \quad (\text{Eq. 1})$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate, ω is the angular velocity (rad/s) and k is a constant that depends on the design of the impeller used [18]. The k values for Cowles impeller are not reported in the literature. However, because the geometry of Cowles impellers is similar to that of the Rushton

turbine and shovel impellers (k from 10 to 13 [19]), we adopted an intermediate value of 11 for value of the Cowles impeller's constant, k.

The shear rate of the Ultra Turrax[®] stirrer was determined using an approach between the geometry of this impeller and the rotational viscometer, whose shear rate is given by Equation 2 [20]:

$$\dot{\gamma} = (2 \cdot \omega \cdot \alpha^2) / (\alpha^2 - 1) \quad (\text{Eq. 2})$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear rate, ω the angular velocity (rad/s) and α is given by Equation 3 [20], in which R_S and R_R are the stator radius and rotor radius of the Ultra Turrax[®], respectively.

$$\alpha = R_S / R_R \quad (\text{Eq. 3})$$

2.3 *Interlamellar distance of liposomes*

The structural information of the formed liposomes, such as the number of bilayers and distance between the lamellae, were provided by small angle X-ray scattering (SAXS) analysis.

Assuming that the system was composed of two phases, a fraction of unilamellar and other of multilamellar vesicles, the scattering intensity, $I(q)$, can be expressed by Equation 4 [11]:

$$I(q) = P(q) \cdot S(q) \quad (\text{Eq. 4})$$

where $P(q)$ is the bilayer form factor, which carries information about the shape of the bilayer and its electronic contrast, and $S(q)$ is the structural factor, which is related to the periodicity of the lipid bilayer and described by a model based on the modified Caillé Theory (MCT) for lamellar systems.

Moreover, the scattering intensity is a function of the scattering angle, which can be determined according to the definition of the scattering vector (q) given by Equation 5:

$$q = 4\pi \sin\theta/\lambda \quad (\text{Eq. 5})$$

where 2θ is the scattering angle and λ is the incident wavelength of the radiation.

The periodicity of the liposomes can be defined from the vector scattering, which indicates the repeat distance of the bilayers [21]. Thus, the interlamellar distance is given by Equation 6:

$$d = 2\pi/q \quad (\text{Eq. 6})$$

The SAXS experiments were performed on the beamline SAXS1 at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using a beam energy of 8 keV ($\lambda = 1.55 \text{ \AA}$) and a sample to detector distance of 561 mm.

2.4 Liposome characterization

2.4.1 Physicochemical properties of liposomes

The liposomes were characterized by their mean hydrodynamic diameter and polydispersity with dynamic light scattering using a (He-Ne) laser at a fixed angle of 173° in a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments). The diameters were analyzed in terms of their intensity Z-average and polydispersity. The zeta potential was determined using the same equipment. The measurements were performed in triplicate.

2.4.2 Quantification of CH8 in liposomes

The samples were initially diluted in ethanol (1:10 v/v) and sonicated (Cole-Parmer, 8890, Illinois, USA) for 5 minutes to extract CH8 from the lipid matrix. The CH8 concentration was determined in triplicate by spectrophotometry at 337 nm (U2001, Hitachi), using a standard curve ranging from 0.01 to 0.05 mol/m³ CH8.

2.4.3 Quantification of phospholipids

The concentration of phospholipids was determined by phosphate quantification using a colorimetric method described by Chen *et al.* [22]. Briefly, the samples were diluted to 1 mol/m³ and digested in acid to produce the inorganic phosphate. Ammonium molybdate was then added to the samples to produce a complex, which was reduced by ascorbic acid acquiring a blue color. The concentration of phospholipids was determined in triplicate by absorbance measurements at 830 nm using a standard curve.

2.4.4 Efficiency of CH8 incorporation and loading in liposomes

The efficiency (E) of CH8 incorporation in liposomes was determined by the final and initial molar ratio between CH8 and phospholipids (Equation 7).

$$E = \frac{(\text{CH8/phospholipid})_{\text{final}}}{(\text{CH8/phospholipid})_{\text{initial}}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

The CH8 loading (L) in liposomes was calculated using Equation 8:

$$L = \frac{\text{mass of incorporated CH8}}{\text{mass of phospholipids}} \quad (\text{Eq. 8})$$

2.5 Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA for variance and the averages were compared using a t-test at 5% significance ($p < 0.05$).

3 Results and Discussion

First, the incorporation of CH8 in liposomes pre-formed by high shear processes was studied. Liposomes were produced via injection of ethanol under shear stress from an Ultra

Turrax[®] or Cowles impeller. The sizes of the liposomes formed with the Ultra Turrax[®] were then reduced and high-pressure homogenized with a microchannel microfluidizer.

3.1 Physicochemical characterization of pre-formed liposomes

The pre-formed liposomes were characterized by their mean hydrodynamic diameter, polydispersity and zeta potential. They were produced using Bangham's method followed by extrusion in membranes to be used as control of the low shear process. Table 1 shows the results for the unloaded and CH8-loaded liposomes.

Table 1. Cumulative mean hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity (PI) and zeta potential (ZP) of unloaded and CH8-loaded liposomes produced by the various processes: Bangham's method followed by extrusion in membranes (B + M), ethanol injection under stirring by Cowles impeller (EI under CI)), ethanol injection under stirring by Ultra Turrax[®] (EI under UT) and ethanol injection under stirring by Ultra Turrax[®] followed by high pressure homogenization in a microchannel microfluidizer (EI under UT + HPH).

Process	Z-average (nm)	PI**	ZP (mV)
B + M	100 ± 5	0.12 ± 0.02	-26 ± 2
B + M + CH8	103 ± 3	0.19 ± 0.01 *	-37 ± 3 *
EI under CI	216 ± 19	0.35 ± 0.05	-39 ± 2
EI under CI + CH8	211 ± 17	0.36 ± 0.03	-40 ± 1 *
EI under UT	180 ± 8	0.22 ± 0.03	-43 ± 7
EI under UT + CH8	180 ± 8	0.24 ± 0.03	-38.4 ± 0.5 *
EI under UT + HPH	148 ± 7	0.19 ± 0.04	-37 ± 4
EI under UT + HPH + CH8	147 ± 3	0.19 ± 0.01	-33.4 ± 0.7 *

* Statistically significant difference (p < 0.05) related to unloaded liposomes

** Statistically significant difference (p < 0.05) between each of the processes

Unloaded liposomes that were produced using a high shear had a higher mean diameter than those produced by Bangham's method followed by membrane extrusion (B + M). Among the high shear processes, the mean diameter and polydispersity decreased as follows: CI > UT > HPH. The polydispersities were lower than 0.5, which is adequate for the intended application. For unloaded liposomes, the zeta potential was higher for the high shear processes than those produced by B + M, indicating that more of the lipid phosphate-groups in the external layer of the liposomes was exposed.

3.2 Loading of CH8 in pre-formed liposomes

The processes did not yield significant differences in the mean diameter after CH8 incorporation. Except for B + M, no significant differences were observed for the PI resulting from the various processes. The loaded and unloaded liposomes showed significant differences in the zeta potential, indicating the incorporation of drug.

When CH8 was gradually added to the pre-formed liposomes, a homogeneous yellow color was observed in the liposome dispersion, indicating the incorporation of CH8 in the bilayer of pre-formed liposomes. However, large crystals of CH8 were observed in the dispersion under an optical microscope with 400x magnification several hours after incorporation. The amount of crystals increased with time with a precipitation velocity following the order: B + M < EI + CI < EI + UT < EI + UT + HPH. However, the precipitated CH8 could be quickly re-suspended in all samples, which benefits *in vivo* application.

Liposomes prepared via B + M were loaded with 0.9 mol/m³ CH8, while those prepared using high-shear processes were loaded with approximately 0.2 mol/m³ CH8. The low loading of CH8 in the pre-formed liposomes produced under high shearing was confirmed by SAXS

analysis. Figure 4 shows the SAXS spectra for the Ultra Turrax[®] stirring process and the high-pressure homogenization in the microchannel microfluidic device.

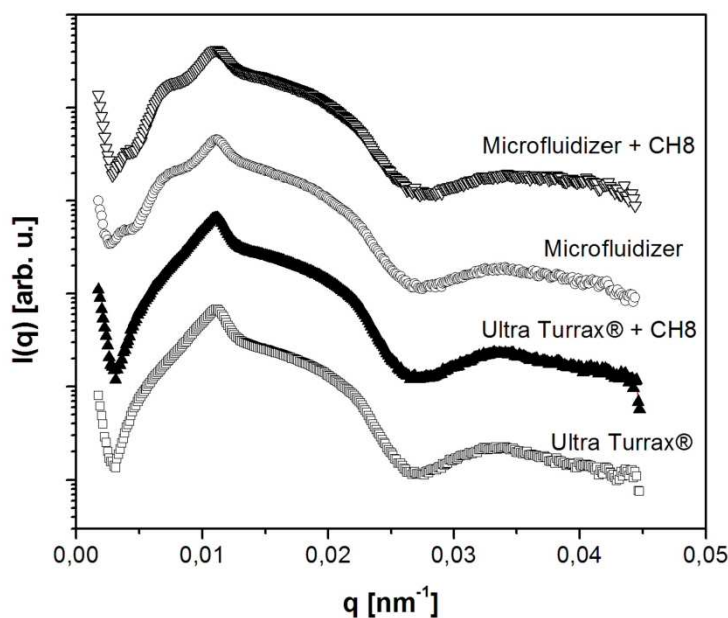


Figure 4. Small angle X-ray scattering (SAXS) profiles determined for loaded and unloaded liposomes produced under high shear by Ultra Turrax[®] and microchannel microfluidic device

The SAXS profiles showed a single scattering peak with an enlargement at the base, indicating that both processes produce unilamellar liposomes as well as a significant fraction of multilamellar liposomes. Both types of liposomes have the same periodicity, with the highest intensity of scattering at $0.11 \text{ \AA}^{-1}$. Thus, the interlamellar distance, calculated by equation 6, was $57.1 \text{ \AA}$.

Generally, variation in the width of the intensity peak of the SAXS spectra indicates inclusion of molecules in the liposomal bilayer. In both the Ultra Turrax[®] and microchannel microfluidic processes, the insertion of CH8 did not significantly alter the peak width, indicating that the applied shear reduced the interlamellar distance and instability for loading CH8, which was initially incorporated and gradually expelled from the lipid bilayer.

These results also reflect the previous SAXS analysis by Trevisan *et al.* [11], who showed the influence of shearing from a Cowles impeller, Ultra Turrax[®] stirrer and microchannel microfluidizer on the packing of lipids and dehydration of liposomes. The reduction of the interlamellar distance due to dehydration increases the stiffness of the bilayer proportionally to the applied shearing. Consequently, the incorporation of CH8 induced additional strains in the bilayer and caused the expulsion of the drug from the liposomes over time.

3.3 Yield of liposome production

The yield of liposome production by the studied processes was quantified by phosphate content (Figure 5), which was close to 100%. This number was slightly lower for Bangham's method, in which liposomes were retained in the polycarbonate membranes during the extrusion step, as well as the process with the added microfluidization step, whose lipid loss may be associated with the retention of lipids inside the microchannels.

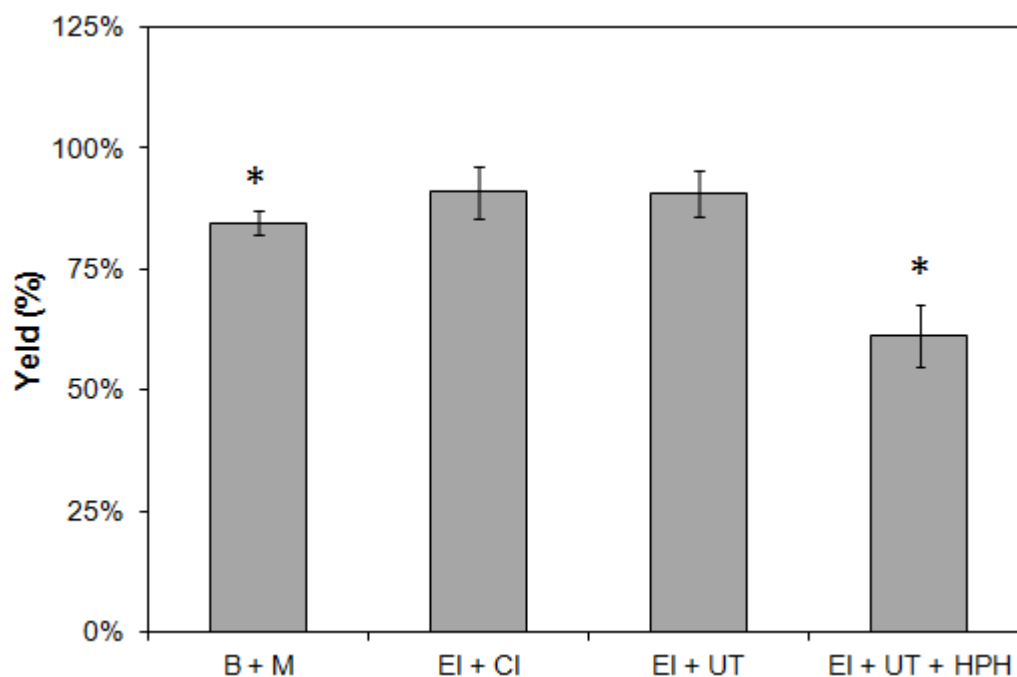


Figure 5. Analysis of phosphate content for the processes studied. * Statistically significant difference ($p < 0.05$) related to other processes

3.4 Improvement of CH8 incorporation

The alternative process incorporates CH8 during a one-step high shear processes, i.e., during the formation of the liposomes via injection of ethanol under shear stress from an Ultra Turrax[®] or Cowles impeller.

3.4.1 Physicochemical characterization of liposomes

Table 2 presents the results obtained from the analysis of the cumulative average hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity (PI) and zeta potential (ZP) of loaded and unloaded liposomes. CH8 was incorporated during ethanol injection under stirring by a Cowles impeller and Ultra Turrax[®] stirrer.

Table 2. Cumulative mean hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity (PI) and zeta potential (ZP) of unloaded and CH8-loaded liposomes produced by: ethanol injection under stirring by a Cowles impeller (EI under CI, unloaded), ethanol injection with CH8 under stirring by Cowles impeller (EIC under CI), ethanol injection under stirring by an Ultra Turrax[®] stirrer (EI under UT, unloaded) and ethanol injection with CH8 under stirring by an Ultra Turrax[®] stirrer (EIC under UT).

Process	Z-average (nm)			PI	ZP (mV)
EI under CI	216	± 19		0.35 ± 0.05	-39 ± 2
EIC under CI – 0,9 mol/m ³ CH8	132	± 3 *		0.29 ± 0.02 *	-41 ± 8
EIC under CI – 0,2 mol/m ³ CH8	174	± 10 *		0.35 ± 0.04	-35 ± 1*
EI under UT	180	± 8		0.22 ± 0.03	-43 ± 7
EIC under UT – 0,9 mol/m ³ CH8	139	± 1 *		0.23 ± 0.03	-48 ± 5
EIC under UT – 0,2 mol/m ³ CH8	176	± 8		0.25 ± 0.04	-39 ± 1

* Statistically significant difference ($p < 0.05$) related to unloaded liposomes;

In contrast to the CH8 that was incorporated into pre-formed liposomes, the incorporation of CH8 during the formation of liposomes showed a statistically significant reduction ($p < 0.05$)

in the Z-average value compared to the unloaded liposomes, except for Ultra Turrax[®] process that used 0.2 mol/m³ CH8. These results suggest that the incorporation of CH8 increased the lamellar packing of liposomes, thereby contributing to their increase in elasticity, as previously reported [5]. Therefore, the incorporation of CH8 counterbalanced the bilayer stiffness caused by the high shearing and contributed to its stability inside the liposomes.

As expected, the polydispersity was higher for Cowles impellers than Ultra Turrax[®] stirrers due to the lower shearing intensity.

The zeta potentials of loaded and unloaded liposomes did not significantly differ, nor did it differ among the different processes, except for a small decrease for 0.2 mol/m³ CH8 under Cowles stirring. These results indicate the internalization of the lipid in the CH8 bilayer, in which did not substantially change the charge density of the adjacent layer to the surface of liposomes.

3.4.2 Efficiency of CH8 incorporation and loading in liposomes

Incorporating low concentrations (0.2 mol/m³) of CH8 avoided precipitation of drug crystals after the formation of liposomes. The CH8 incorporated when using a 0.9 mol/m³ concentration in solution was unstable in liposomes produced under high shearing, but was retained in those liposomes produced by Bangham's method with membrane extrusion.

The incorporation efficiency and drug loading were calculated only for the liposomes that showed no precipitation of CH8. Thus, only liposomes pre-formed by Bangham's method with 0.9 mol/m³ CH8 and liposomes obtained using the improved process with 0.2 mol/m³ CH8 were considered (Table 3).

Table 3. Incorporation efficiency and drug loading calculated for the liposomes that showed no precipitation of CH8

Process	Incorporation efficiency (%)	CH8 Loading (mg CH8/ g phospholipid)
B + M (0.9 mol/m ³ CH8)	96 ± 4	37 ± 1
EIC under CI (0.2 mol/m ³ CH8)	95 ± 8	9.0 ± 0.6
EIC under UT (0.2 mol/m ³ CH8)	80 ± 16	7.5 ± 0.9

The incorporation efficiencies of the proposed processes did not significantly differ (p-value < 0.05), but the variance of the results from the Ultra Turrax[®] process was very high (> 100), indicating a lower reproducibility. Considering the trend of lower shear favoring the incorporation of the drug from Bangham's method, the ethanol injection under Cowles stirring is the most promising between the scalable processes. Moreover the shear, the mixing conditions imposed by the Cowles impeller can also positively affect the incorporation of hydrophobic molecules in liposomes. The Cowles geometry favors the pumping of the mixture, which benefits homogenization [23], while the Ultra Turrax[®] stirrer has a geometry similar to that of a rotational viscometer (internal rotor), which favors shear but reduces the pumping capacity. Additional advantages for Cowles stirrer includes robustness and simplicity.

4 Conclusions

A scalable production process based on the ethanol injection method under high shearing was improved to incorporate CH8 into EPC liposomes. This improvement was achieved by three changes: the addition of CH8 during the formation of liposomes, a low initial concentration of CH8 and the lowest shear rates of the stirrers. Among the scalable processes, the ethanol injection under shearing from Cowles stirrer was the most promising for CH8 incorporation. These

findings contribute to the scale-up of processes for the development of CH8-liposomes, as a new product to treat cutaneous leishmaniasis. These results can also be extended to the loading of other hydrophobic drugs in liposomes.

5 Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq / Brazil), Dr. Leide P. Cavalcanti from Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS/Brazil) for the SAXS analysis and Dr. Bartira Rossi-Bergmann for the donation of CH8 and previous work together.

6 References

- [1] P. Boeck, C.A.B. Falcão, P.C. Leal, R.A. Yunes, V.C. Filho, E.C. Torres-Santos, B. Rossi-Bergmann, Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (2006), 1538-1545.
- [2] P. Mitropoulos, P. Konidas, M.D. Konidas, New world cutaneous leishmaniasis: update review of current and future diagnosis and treatment, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 63 (2010), 309-322.
- [3] R.J.S. Bezerra, L. Leon, M. Genestra, Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 40 (2004), 139-149.
- [4] E.C. Torres-Santos, M.I. Sampaio-Santos, F.S. Buckner, K. Yokoyama, M. Gelb, J. A. Urbina, B. Rossi-Bergmann, Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone, *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 (2009), 469-472.
- [5] B. Rossi-Bergmann, C.A.B. Falcão, B. Zanchetta, M.V.L.B. Bentley, M.H.A. Santana, Performance of elastic liposomes for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. in: R. Beck, S. Guterres, A. Pohlmann (Ed.), *Nanocosmetics and Nanomedicine*, Springer, Porto Alegre, 2011, pp. 181-196.
- [6] F.L. Sorgi, L. Huang, Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. *Int. J. Pharm.*, 144 (1996) 131-139.
- [7] J.C.O. Villanova, V. Consiglieri, Aspectos farmacotécnicos dos lipossomas: produção, caracterização e estabilidade. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 36 (2000) 179-200.
- [8] R. Barnadas-Rodríguez, M. Sabés, Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *Int. J. Pharm.*, 213 (2001) 175-186.
- [9] O.R. Justo, Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo. Thesis. School of Chemical Engineering, University of Campinas, Brazil (2003).
- [10] A.K. Thompson, H. Singh, Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *J. Dairy Sci.*, 89 (2006) 410-419.

- [11] J.E. Trevisan, L.P. Cavalcanti, C.L.P. Oliveira, L.G. de La Torre, M.H.A. Santana, Technological aspects and scalable enhanced processes for production of functional cationic liposomes as delivery system in gene therapy, in: X. Yuan (Ed.), *Non-Viral Gene Therapy*, Intech, New York, 2011, pp. 267-292.
- [12] A.C.D. Rodas, P.S. Lopes, O.Z. Higa, Genotoxicity by micronucleus assay for medical devices development, in: A. Kocsis, H. Molnar (Eds.), *Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction*, Nova Science, New York, 2009, pp. 111-126.
- [13] B. Zanchetta, Sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona CH8 para o tratamento da leishmaniose cutânea. Dissertation. School of Chemical Engineering, University of Campinas, Brazil (2009).
- [16] A.D. Bangham, M.M Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965), 238-252.
- [17] D.D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier Science, Amsterdam (1993).
- [18] P.M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, San Diego, 1995.
- [19] S. Nagata, *Mixing Principles and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1975.
- [20] J.F. Steffe, *Rheological methods in food process engineering*, Feeman Press, East Lansing, 1992.
- [21] L.P. Cavalcanti, Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron. Thesis. Gleb Wataghin Physics Institute, University of Campinas, Brazil (2001).
- [22] P.S. Chen, T.Y. Toribara, H. Warner, Microdetermination of phosphorus, *Anal. Chem.*, 28 (1956), 1756-1758.
- [23] E. Cekinski, F.C. Joaquim Júnior, J.R. Nunhez, L.C. Urenha, *Agitação e Mistura na Indústria*, LTC Editora, Rio de Janeiro, 2007.

6. CONCLUSÕES

O processo de injeção de etanol com redução e homogeneização de tamanhos a partir da aplicação de alto cisalhamento por agitador mecânico com impelidor Cowles e Ultra Turrax[®] foi eficiente para produção de lipossomas e incorporação da CH8. A caracterização dos lipossomas e estudo de suas propriedades físico-químicas permitiu concluir que:

- A adição do fármaco durante a formação dos lipossomas favorece a incorporação do fármaco, evitando a necessidade de penetração na bicamada que ocorre quando a CH8 é adicionada a lipossomas pré-formados;
- A elasticidade da bicamada, dependente da distância interlamelar, foi determinante para a eficiência de incorporação da CH8 em lipossomas;
- A baixa concentração de CH8 adicionada (0,2 mol/m³) evitou a precipitação de cristais do fármaco após formação dos lipossomas;
- A menor taxa de cisalhamento produzida pelo impelidor Cowles favoreceu a incorporação da CH8;
- Entre os processos escaláveis, a injeção de etanol sob cisalhamento com o impelidor Cowles foi o mais promissor para a incorporação de CH8;
- A incorporação de CH8 nos lipossomas tende a aumentar o empacotamento lamelar dos lipossomas e contrabalança a rigidez da bicamada causada pelo alto cisalhamento, contribuindo para sua estabilidade no interior dos lipossomas.

Essas descobertas contribuem para o desenvolvimento de formas farmacêuticas mais eficazes para o tratamento de leishmaniose cutânea, bem como para futuros estudos envolvendo outros fármacos hidrofóbicos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuação dos estudos, sugere-se:

- Estudar outras variáveis do processo, como temperatura, pH, concentração de fosfolípidios e outros tipos de impelidores;
- Realizar ensaios *in vivo* para verificar a eficiência da CH8 incorporada em lipossomas no tratamento da leishmaniose cutânea;
- Estudar a aplicação do processo proposto para incorporação de outros fármacos hidrofóbicos visando verificar a influência da elasticidade na capacidade de carregamento do fármaco.

8. REFERÊNCIAS

- ANVISA. Resolução RDC n. 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2012.
- ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. F. A; MONACHE F. D. & SMÂNIA JÚNIOR, A. Structure activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 9790-9794, 2008.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M. & WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.
- BARNADAS-RODRIGUÉZ, R. & SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 175-186, 2001.
- BASANO, S. A. & CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328-337. 2004.
- BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; LAWRENCE, F. & ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant Leishmania. *Experimental Parasitology*, v. 85, p. 274-282, 1997.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. & MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BATZRI, S. & KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 298, p. 1015- 1019, 1973.
- BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D. J. & MOUSA, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 4, p. 273-282. 2008.
- BELLO, M. L. *Derivados sintéticos da chalcona inibidores do crescimento de leishmania braziliensis: modelagem molecular para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (in silico)*. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Recent Developments in leishmaniasis*, v. 24, p. 684-703. 1997.

- BERMAN, J. D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 11, p. 707-710. 1998.
- BEZERRA, R. J. S.; LEON, L. & GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 139-149, 2004.
- BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C. & ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BRANDL, M. M.; BACHMANN, D.; DRECHSLER, M. & BAUER, K. H. *Liposome preparation using high-pressure homogenizers*. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). *Liposome Technology*. 2. ed. p. 49-65. Boca Raton: CRC press, 1993.
- BRASIL. *Guia de vigilância epidemiológica*. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 f.
- BRASIL. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 444 f.
- BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A. & DE KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 232-239, 2003.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S. & PARKER, K. L. (editors). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.
- CAFISO, D. S.; PETTY, H. R. & MC CONNELL, H. M. Preparation of unilamellar lipid vesicles at 37 °C by vaporization methods. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 649, p. 129-132, 1981.
- CARNEIRO, A. L. *Projeto, Montagem e Operação de Instalação para a Produção Escalonável de Lipossomas Visando Aplicações Farmacêuticas*. 2003. 156 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CAVALCANTI, L. P. *Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron*. 2001. 181 f. Tese (Doutorado em Física da Matéria Condensada) – Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CEKINSKI, E.; JOAQUIM JÚNIOR, C. F.; NUNHEZ, J. R. & URENHA, L. C. *Agitação e Mistura na Indústria*, Rio de Janeiro: LTC editora, 2007.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Parasites – Leishmaniasis*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 21 abr. 2012.
- CEVC, G. & BLUME, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, v. 1514, 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 – Biomembranes*, v. 1564, p. 21-30, 2002.
- CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y & WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 1756-1758, 1956.
- CHEN, M.; ZHAI, L. & CHRISTENSEN, S. B. Inhibition of fumarate reductase in leishmania major and L. donovani by chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 2023-2029, 2001.
- CROFT, S. L. & COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 502-508, 2003.
- CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F. & CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 19-30, 2000.
- D'AQUINO, R.; HARPER, T. & VAS, C. R. Nanobiotechnology: fulfilling the promise of nanomedicine. *Chemical Engineering Progress*, v. 102, p. 35-37, 2006.
- DIAT, O. & ROUX, D. Preparation of monodisperse multilayer vesicles of controlled size and high encapsulation ratio. *Journal de Physique II*, v. 3, p. 9-14, 1993.
- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*, San Diego: Academic Press, 1995.
- ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F. & KHALAFALLAH, N. M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 332, p. 1-16, 2007.
- FALCÃO, C. A. B. *Avaliação de chalconas sintéticas e nanoformulações para tratamento de leishmaniose cutânea murina usando parasitos geneticamente modificados*. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FISCHER, C.; VOSS, A. & ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 190, p. 85-87, 2001.

- FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 181-189, 1999.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F. & DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, p. 511-518, 2005.
- GONTIJO, B. & CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GOODWIN, L. G. & PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochemistry Journal*, v. 22, p. 236-240, 1943.
- GREGORIADIS, G. *Liposome Technology*. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- IKA EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO, *Produtos – Dispersadores*. Disponível em: <<http://www.ika.net>>. Acesso em: 05 fev. 2013.
- ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. 2. ed. Oxford: Academic Press, 1992.
- JAHN, A.; VREEELAND, W. N.; GAITAN, M. & LOCASCIO, L.E. Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 2674-2675, 2004.
- JAHN, A.; VREEELAND, W. N.; DEVOE, D. L.; LOCASCIO, L. E. & GAITAN, M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*, v. 23, p. 6289-6293, 2007.
- JANOFF, A. S. *Liposomes: rational design*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.
- JOGUPARTHI, V. & ANDERSON, B. D. Liposomal formulations of hydrofobic lactone drugs in the presence of metal ions. US 2009/0196918 A1. Aug. 6, 2009.
- JUSTO O. R. *Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo*. 2003. 225 f. Tese. Doutorado em Engenharia Química – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- KAKUMANU, S. & SCHROEDER, A. Focused Ultrasound - A novel tool for liposome formulation. *Drug Development & Delivery*, v. 12, p. 47-52, 2012.
- KAN, P.; TSAO, C. W.; WANG, A. J.; SU, W. C. & LIANG, H. F. A liposomal formulation able to incorporate a high content of paclitaxel and exert promising anticancer effect. *Journal of Drug Delivery*, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- KIKUCHI, H.; YAMAUCHI, H. & HIROTA, S. A spray-drying method for mass production of liposomes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, p. 1522-1527, 1991.

- LASIC, D. D. *Liposomes: From Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier, 1993.
- LINK INDUSTRIAL - MIXING TECHNOLOGY. *Agitadores para la industria química*. Disponível em: <<http://www.linkindustrial.es>>. Acesso em: 05 fev. 2013.
- LIU, J.; LEE, H.; HUESCA, M.; YOUNG, A. & ALLEN, C. Liposome formulation of a novel hydrophobic aryl-imidazole compound for anti-cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 58, p. 306-318, 2006.
- MAAROUF, M.; DE KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P. X. & ROBERT-GERO, M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of Leishmania. *Experimental Cell Research*, v. 232, p. 339–348, 1997.
- MAYHEW, E.; CONROY, S.; KING, J.; LAZO, R.; NIKOLOPOULUS, G.; SICILIANO, A. & VAIL, W. J. High-pressure continuous-flow system for drug entrapment in liposomes. *Methods in Enzymology*, v. 149, p. 64-77, 1987.
- MICROFLUIDIZER – HIGH SHEAR FLUID PROCESSORS. *How it works*. Disponível em: <<http://www.microfluidicscorp.com>>. Acesso em: 07 jul. 2013.
- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P. & KONIDAS, M. D. New world cutaneous leishmaniasis: update review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 63, p. 309-322, 2010.
- MOISEEVA, E. V.; KUZNETSOVA, N. R.; SVIRSHCHEVSKAYA, E. V.; BOVIN, N. V.; SITNIKOV, N. S.; SHAVYRIN, A. S.; BELETSKAYA, I. P.; COMBES, S.; FEDOROV, A. Yu. & VODOVOZOVA, E. L. liposome formulations of combretastatin A4 and its 4-arylcoumarin analogue prodrugs: the antitumor effect in the mouse model of breast cancer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, v. 5, p. 276-283, 2011.
- NAGATA, S. *Mixing Principles and Applications*. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- NEW, R. R. C. *Liposomes: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1990.
- OLIVEIRA, L. L. *Reologia e Transição de Formas de Lipossomas Elásticos em Membranas de Nanoporos*. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- OTAKE, K.; IMURA, T.; SAKAI, H. & ABE, M. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir*, v. 17, p. 3898-3901, 2001.
- PAPAHADJOPOULOS, D. & WATKINS, J. C. Phospholipid model membrane-2: permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 135, p. 639-652, 1967.

- PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C. & BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 852-859, 2004.
- PETRACHE, H. I.; TRISTRAM-NAGLE, S. & NAGLE J. F., Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 95, p. 83-94, 1998.
- PISCOPO, T. V. & AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, v. 83, p. 649-657, 2007.
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. & SARAF, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 1790-1798, 2006.
- ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D. & RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonials preparations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1234-1239. 1995.
- RODAS, A. C. D.; LOPES, P. S. & HIGA, O. Z. *Genotoxicity by micronucleus assay for medical devices development*. In: KOCSIS, A & MOLNAR, H. (Eds.), *Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction*. p. 111-126. New York: Nova Science, 2009.
- ROSSI-BERGMANN, B.; TORRES-SANTOS, E. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. & BOECK, P. Síntese e uso de chalconas para tratamento de doenças parasitárias. BR nº PI 0204079-4. 2002.
- ROSSI-BERGMANN, B.; FALCÃO, C. A. B.; ZANCHETTA, B.; BENTLEY, M. V. L. B. & SANTANA, M. H. A. *Performance of elastic liposomes for topical treatment of cutaneous leishmaniasis*. In: BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. (Comp.). *Nanocosmetics and Nanomedicine*. p. 181-196. Porto Alegre: Springer, 2011.
- SALLUM, L. O. *Estudo da estrutura cristalina de chalconas metoxiladas com polimorfismo molecular*. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Faculdade de Química, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.
- SAUER, T.; ROBINSON, C. W. & GLICK, B. R. Disruption of native and recombinant *escherichia coli* in a high-pressure homogenizer. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, p. 1330-1342, 1988.
- SHARMA, A.; MAYHEW, E.; BOLCSAK, L.; CAVANAUGH, C.; HARMON, P.; JANOFF, A. & BERNACKI, R. J. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. *International Journal of Cancer*, v. 71, p. 103-107, 1997.
- SHARMA, V. K. Preparation of micron-size pharmaceutical particles by microfluidization. US 6555139 B2. Apr. 29, 2003.
- SHENK, R.; HESSEL, V.; HOFMANN, C.; KISS, J.; LÖWE, H & ZIOGAS, A. Numbering up of micro devices: a first liquid-flow splitting unit. *Chemical Engineering Journal*, v. 101, p. 421-429, 2004.

- SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. & BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 254 p., 2001.
- SINDERMAN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C. & ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 193, p. 173-180, 2003.
- SORGI, F. L. & HUANG, L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 144, p. 131-139, 1996.
- STEFFE, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing: Feeman Press, 1992.
- SZOKA, F.; OLSON, F.; HEATH, T.; VAIL, W.; MAYHEW, E. & PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μ mol) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 601, p. 559-571, 1980.
- TALSMA, H.; ÖZER, A. Y.; VAN BLOOIS, L & CROMMELIN, D. J. The size reduction of liposomes with a high pressure homogenizer (Microfluidizer®). Characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 15, p. 197-207, 1989.
- THOMPSON, A. K. & SINGH, H. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 410-419, 2006.
- TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M.; JR. MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C. & ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 7, p. 1776-1778, 1999.
- TORRES-SANTOS, E. C.; SAMPAIO-SANTOS, M. I.; BUCKNER, F. S.; YOKOYAMA, K.; GELB, M.; URBINA, J. A. & ROSSI-BERGMANN, B. Altered sterol profile induced in *leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 469-472, 2009.
- TREVISAN, J. E. *Comparação entre processamentos "top-down" e "bottom-up" para a produção de lipossomas funcionais aplicados à vacinação gênica contra a tuberculose*. 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- TREVISAN, J. E. ; CAVALCANTI, L. P. ; OLIVEIRA, C. L. P. ; DE LA TORRE, L. G. & SANTANA, M. H. A. Technological aspects and scalable enhanced processes for production of functional cationic liposomes as delivery system in gene therapy. In: Yuan, X. (Org.). *Non-viral gene therapy*. Intech, v. 1, p. 267-292, 2011.
- VAN DE HULST, H.C. *Light Scattering by Small Particles*. New York: Wiley, 1957.

- VAN DEN BERGH, B. A. I.; 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, p. 367-379, 1999.
- VEMURI, S.; YU, C-D.; WANGSATORNTANAKUN, V. & ROOSDORP, N. Large-Scale Production of Liposomes by a Microfluidizer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 16, p. 2243-2256, 1990.
- VILLANOVA, J. C. O. & CONSIGLIERE, V. Aspectos farmacotécnicos dos lipossomas: produção, caracterização e estabilidade. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 36, p. 179-200, 2000.
- VUILLEMARD, J. C. Recent advances in the large-scale production of lipid vesicles for use in food products: microfluidization. *Journal of Microencapsulation*, v. 8, p. 547-562, 1991.
- WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K.; GÜNTHER, K. & KATINGER, H. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. *Journal of Liposome Research*, v. 12, p. 259-270, 2002.
- WIGGENHORN, M. *Scale-Up of Liposome Manufacturing: Combining High Pressure Liposome Extrusion with Drying Technologies*. 2007. 238 f. Thesis – Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- YUNES, R. A.; CHIARADIA, L. D.; LEAL, P. C.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; FALCÃO, C. A. B. & ROSSI-BERGMANN, B. *Chalcones as new drugs leads against Leishmaniasis*. In: RICHARDS, R. (Ed.). *Current Trends in Medicinal Chemistry: Trivandrum Research Trends*, v. 4, p. 47-56, 2006.
- ZANCHETTA, B. *Sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona CH8 para o tratamento da leishmaniose cutânea*. 2009. 220 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ZHANG, J. A.; ANYARAMBHATLA, G.; MA, L.; UGWU, S.; XUAN, T.; SARDONE, T. & AHMAD, I. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEPETU) formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 177–187, 2005.
- ZUO, Z.; LI, C. & QIAN, S. Pharmacokinetics and Disposition of Various Drug Loaded Liposomes. *Current Drug Metabolism*, v. 13, p. 372–395, 2012.

APÊNDICE I: Curva analítica para quantificação de fosfato

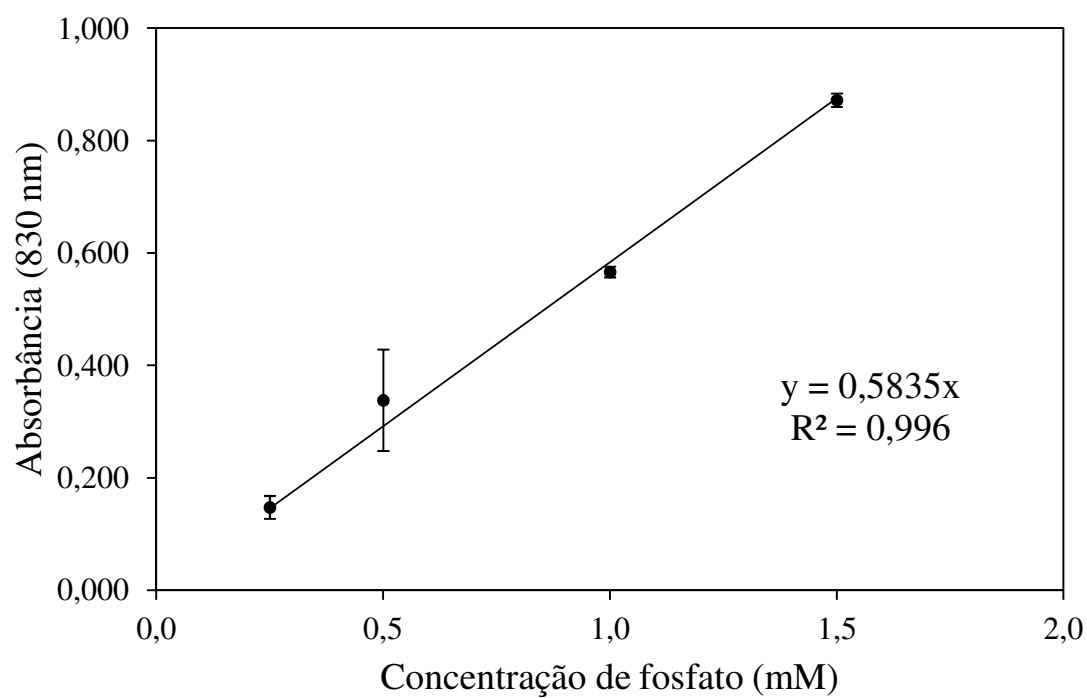


Figura 1 Curva analítica para quantificação de fosfato nos lipossomas a 830 nm. O coeficiente linear foi considerado desprezível.

APÊNDICE II: Curva analítica para quantificação de CH8

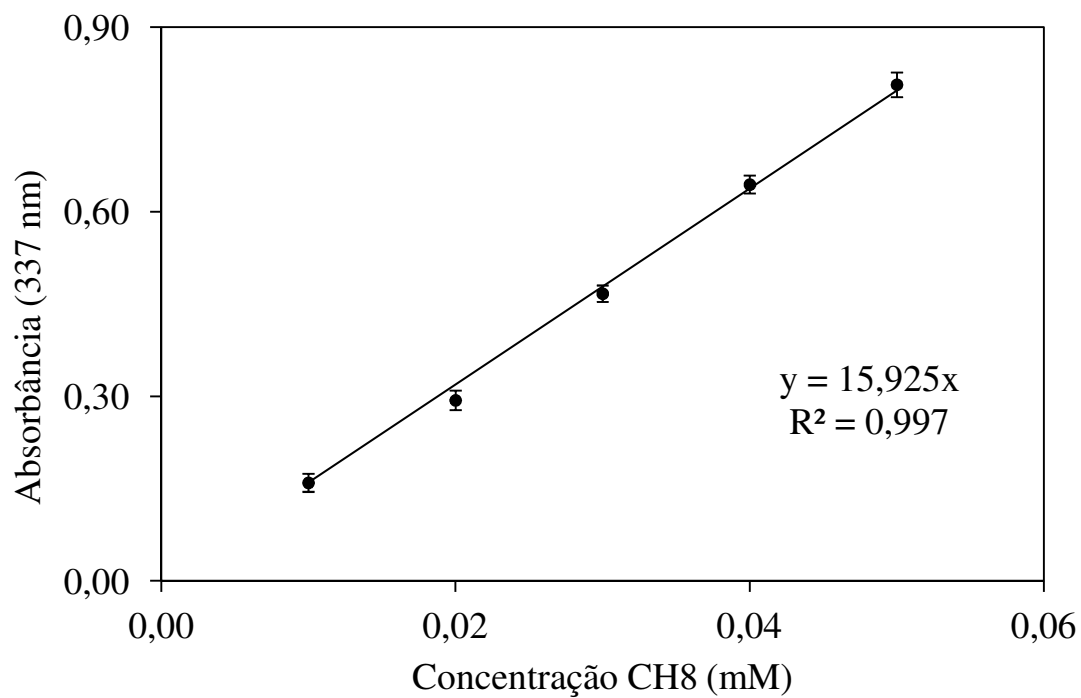


Figura 2 Curva analítica para quantificação de CH8 incorporada nos lipossomas a 337 nm. O coeficiente linear foi considerado desprezível.

Precisão: CV% = 5 %

Exatidão: E = 100 ± 4 %