



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**SISTEMA NANOESTRUTURADO LIPOSSOMAL
CONTENDO CHALCONA CH8 PARA O TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Beatriz Zanchetta

Autora

Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

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

Campinas – São Paulo

Agosto 2009

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

Z15s	<p>Zanchetta, Beatriz</p> <p>Sistema nanoestruturado lipossomal contendo chalcona CH8 para o tratamento da leishmaniose cutânea / Beatriz Zanchetta. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Maria Helena Andrade Santana. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Nanotecnologia. 2. Lipossomos. 3. Medicação transcutânea. 4. Leishmaniose. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
------	---

Título em Inglês: Liposomal nanoestruturated system containing chalcone CH8 for the cutaneous leishmaniasis treatment

Palavras-chave em Inglês: Nanotechnology, Liposomes, Endermic medication, Leishmaniasis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Bartira Rossi Bergmann, Marco Vinícius Chaud

Data da defesa: 28/09/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Beatriz Zanchetta e aprovada em
28 de agosto de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Bartira Rossi Bergmann



Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

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



A handwritten signature in blue ink, reading "M. H. Andrade Santana", is positioned above a horizontal line.

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

Dedico este trabalho

À *Deus*, que me deu a vida e onde busquei força e coragem para enfrentar todas as dificuldades, por iluminar sempre o meu caminho, fazendo sempre com que eu vencesse os obstáculos, pela saúde e família maravilhosa que me deu.

À *Santa Gema Galgani*, por ser a Padroeira e especial protetora dos farmacêuticos, profissão que tenho muito orgulho.

Aos meus pais (*Maria Amália e Pedro Antonio*) que foram o alicerce para a construção dos meus sonhos, por tanto amor e pela oportunidade de estudar, aprender e chegar até aqui. Por serem pessoas maravilhosas e sempre presentes, por toda a sabedoria, pelos conselhos, carinho, sempre me apoiando em todas minhas decisões com muito amor, me incentivando e me dando força, pela compreensão e paciência nos momentos mais difíceis, por me fazerem acreditar que todo esforço será sempre recompensado, por todo sacrifício e colaboração.

Às minhas irmãs *Flávia e Camila*, por me aturarem em todos os momentos de estresse, pela grande amizade, companheirismo, apoio em todas as minhas decisões, sempre torcendo e acreditando na minha caminhada.

Ao meu cunhado *Ricardo*, primeiramente por ter escolhido a minha família para ser sua segunda família e por estar presente em todos os momentos.

Às minhas sobrinhas *Maria Eduarda e Giovanna*, por serem a minha alegria de viver, me tornando criança novamente e pelo amor sincero e verdadeiro, minhas bonequinhas.

Ao *Edgar*, meu noivo, por ser a minha inspiração, que sempre me acompanhou em todos os momentos de alegrias e dificuldades, me ajudou e incentivou, me aturou nos momentos de mau humor, sempre tão compreensivo, com todo amor, dedicação e amizade. Mesmo com toda essa distância, nossos sentimentos se tornaram intensos e duradouros.

À todos os meu familiares, tios (*Beto, Alberto, Roberto, João, José Maria, Romilto*), tias (*Candinha, Cláudia, Sirley, Zezinha, Sandra, Lena, Mary*), primos (*Lucas, Nathanael, Henrique, Guzinho, Gustavo A., Leandro, Evandro – in memorian*), primas (*Juliana, Mariana, Isabela, Luana, Bárbara, Lara, Sâmia, Eveline, Emanuelle*), madrinhas e padrinhos, *Manoela*, sogra (*Maria de Fátima*), vizinha (*Lourdes*) e tia torta (*Bel*), pela torcida e por orarem sempre por mim, pessoas que considero muito importantes e fundamentais em minha vida.

Aos meus avós paternos (*Yolanda e Pedro*) e avós maternos (*Paschoala e Olívio*), e bisavó (*Josefina*), que apesar de não estarem mais entre nós, sempre serão lembrados com muito amor, pois foram pessoas muito especiais na minha vida, com as quais dividi minha infância e parte de minha adolescência.

Aos professores da *Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau “Governador Jânio Quadros”* que foram a base do meu conhecimento.

Aos amigos de longa data e aos novos amigos, *Cristina, Cláudia, Lucimara, Vera, Célia, Letícia, Paula e Ton, Débora, Daniela, Rodrigo, Lisana, Cassiano, Adriana Leonardo e Tamara, Gustavo B. e Katia., Cintia e Nando, Lilian e Marcelo, Ligia, Lucas, Paula, Mateus, André, Bruno, Mariô, Rafael (in memorian)*, pela amizade desde os tempos de infância até os mais recentes, por todos os momentos que compartilhamos, pelas risadas e lágrimas derramadas.

Aos amigos/irmãos de coração *Bárbara e Juliano*, que conquistei na época da graduação e formou-se um elo de amizade e amor verdadeiro entre AMIGOS, sempre foram grandes companheiros, amigos de todos os momentos, pela grande amizade e que me incentivaram e torceram por mim. Sempre presentes, independente da distância. Por me fazerem acreditar que sempre se pode dar a volta por cima. Vocês são mais que especiais, são parte fundamental da minha vida.

Aos amigos da graduação *Carol, Mariana, Renata, Bruno, Rodrigo, Leandro, Roberta, Alininha, Alyne, Milena, Hayla, Vanessa, Simone, Harisson, Indiara, Mônica, Raquel, Jó*, pelo companheirismo, grande carinho, momentos de risadas e

diversão, que sempre terei imenso carinho e guardarei boas lembranças na memória. Não importa o tempo ou a distância, a amizade prevalece.

Aos *professores, técnicos de laboratório e amigos* da *FACIS* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Metodista de Piracicaba) - UNIMEP, peças chave na minha formação durante o curso de graduação em Farmácia. Que me estenderam a mão e me mostraram um novo caminho, despertando a sabedoria em mim, abrindo portas para um novo amanhã, despertando para a realidade, questionando a vida e ensinando que as lições permanecem.

Às amigas *Fernanda e Tateane*, que conquistei durante o período do mestrado, amizades sinceras e verdadeiras, e que tenho certeza que vão durar para sempre. Pelas longas jornadas de trabalho, principalmente nos sábados e domingos, por agüentar meus desabaços, mas principalmente pelos momentos de alegria.

Aos amigos *André, Aline, Reinaldo, Pablo, Goran, Serenotti, Lang, Feller e Aline, Amanda, Vilmar, Gustavo (mineiro), Valmir, Bruna, Alessandra (Paulista), Luiza, Viviane*, que conquistei durante o mestrado e com os quais aprendi que confiança só merece ser dada a pessoas especiais.

Ao Prof^o. Dr. *Marco Vinícius Chaud*, orientador das iniciações científicas, meu Pai Científico e hoje um grande amigo, por me ensinar que cada pergunta, pode ter mais de uma resposta (“Explore todas as possibilidades !!!”), e que a resposta a escolher é aquela que mais nos faz bem. Você foi mais que um professor, foi um amigo e um guia, agradeço pelo incentivo e por acreditar que eu seria capaz.

Amigos, familiares e pessoas especiais peço desculpas por não ter dado toda a atenção que mereciam, mas tenho certeza que vocês souberam me entender e em incentivar sempre. Agradeço a oportunidade de conhecê-los e tenham certeza que há um registro especial de cada um em meu livro da vida.

Meus sinceros agradecimentos

À *Universidade Estadual de Campinas*, pelas oportunidades e experiências.

À *Faculdade de Engenharia Química (FEQ-UNICAMP)*, pela oportunidade do mestrado em engenharia química mesmo eu sendo farmacêutica.

Ao *CNPq* (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudo concedida.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. *Maria Helena Andrade Santana*, minha gratidão por todos esses anos de oportunidades, orientação, paciência, confiança, preocupação e ensinamentos.

Aos *funcionários da FEQ* e da *secretaria de pós-graduação*, principalmente à secretária Rosa M. F. S. Moretti (“Bonitinha”), pela amizade e auxílio em diversos momentos.

Ao técnico de laboratório *Gilson B. Maia Jr.* e ao estagiário *Silas*, sempre dispostos a ajudar e proporcionando momentos de descontração.

Ao Prof^º Dr. *Cesar C. Santana*, pela utilização dos equipamentos no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

Às técnicas *Andréa A. M. Shimojo* e *Kelly R. de Palma Sousa*, do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura. e DSC.

Ao Prof^º Dr. *Fernando Galembeck* e ao colaborador *Carlos Alberto Paula Leite*, pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão, no Laboratório de Físico-Química, Instituto de Química – UNICAMP.

À Prof^a Dr^a. *Maria Elisabete Zaniquelli* e ao doutorando *Douglas S. Monteiro*, pela oportunidade e auxílio na realização dos experimentos de tensão superficial e cinética de adsorção na interface líquido-ar, no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides, Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP Ribeirão Preto.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr *Marco Vinícius Chaud* e Dr^a *Lucimara de La Torre Gaziola*, pelas considerações e críticas, que me auxiliaram na realização e finalização desta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. *Bartira Rossi-Bergmann* e a doutoranda *Camila A. B. Falcão*, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por ter doado o fármaco chalcona CH8 para que este trabalho pudesse ser realizado e pelos testes “*in vivo*”.

À Prof^a Dr^a *Patrícia Santos Lopes* do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba – UNISO, pela realização dos ensaios de citotoxicidade dos lipossomas.

À todos os *amigos e colegas do LDPB* (laboratório de desenvolvimento de processos biotecnológicos), que contribuíram para minha aprendizagem e o bom andamento do trabalho, também pelo companheirismo, grande carinho, momentos descontraídos, almoços divertidos e auxílio na execução de alguns protocolos.

À *Luciana Lima de Oliveira* pela introdução com os lipossomas e a Dr^a. *Thaís Rigoletto* pelo auxílio na execução de alguns experimentos.

À *Isabel Marion* e *José Elier* pela amizade, oportunidade de trabalho e confiança como farmacêutica, no período que estive sem bolsa.

Aos *amigos e pessoas* que embora não citadas colaboraram e incentivaram para que este trabalho fosse realizado e fizeram parte da minha história.

Muito obrigada !!!

*“A maior recompensa do nosso trabalho,
não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos
transforma.”*

John Ruskin

RESUMO

Atualmente, os lipossomas elásticos têm se destacado em relação aos lipossomas convencionais (LC), pela capacidade de atingir as camadas mais profundas da pele. Neste trabalho, lipossomas elásticos foram preparados e caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, de permeação *in vitro* e *ex vivo*, e aplicados ao tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Estes lipossomas foram compostos de lecitina de ovo, e tiveram a sua superfície modificada pela incorporação do tensoativo PEG-8L, formando os lipossomas peguilados (LP). O fármaco encapsulado foi uma chalcona sintética nitrogenada (CH8), que vem se destacando como substância antiprotozoária e apresenta dificuldade de permeação através da pele. Os resultados obtidos mostram que o PEG-8L é incorporado na bicamada lipídica dos LC, produzindo maior fluidez e elasticidade. A incorporação do PEG-8L também modifica a tensão superficial e o potencial zeta dos LC. A encapsulação da CH8 foi verificada em ambos os casos (LC e LP), com modificações na morfologia, diâmetro médio, tensão superficial e temperatura de transição de fase em relação aos LC vazios. Os estudos de permeação em membranas sintéticas de nanoporos (*in vitro*) mostraram que os LP possuem maior capacidade de permeação que os LC, e que a CH8 produz elasticidade aos LC aumentando sua capacidade de permeação em relação aos LP contendo CH8. Os estudos de permeação em pele de orelha de porco (*ex vivo*) mostraram que a CH8, em ambos os tipos de lipossomas, foi capaz de permear as camadas da pele e atingir a derme. Os resultados *in vivo* no tratamento da leishmaniose em camundongos mostraram que as formulações lipossomais foram mais eficientes que a CH8 livre, destacando-se a eficácia da CH8 em LC, cuja ação foi semelhante à aplicação da CH8 livre intralesional. Os resultados obtidos mostram o desenvolvimento tecnológico da preparação de LC e LP contendo CH8, e contribuem para o tratamento mais eficaz da leishmaniose cutânea.

PALAVRAS-CHAVE: lipossomas, PEG-8L, CH8 e leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Nowadays, elastic liposome (EL), has gained attention when compared with conventional liposome (CL), by its capacity of reach the skin's deepest layers. In this work, elastic liposome were prepared and characterized by its physic-chemical properties, *in vivo* and *ex vivo* permeation, and its application for cutaneous leishmania topical treatment. The liposome was composed by egg lecithin, and had it surface modified by the incorporation of PEG-8L tensoactive, forming PEGylated liposome (PL). The encapsulated drug was a synthetic nitrogened chalcone (CH8), which has aroused as anti-protozoa substance and presents difficult permeation through the skin. Results obtained shows that PEG-8L was incorporated on LC's lipid bilayer, producing enhanced elasticity and fluidity. PEG-8L incorporation also modifies the superficial tension and zeta's potencial of the CL. CH8's encapsulation was observed in both cases, presenting modification at morphology, mean diameter, superficial tension and phase transition's temperature when related with empty CL. The permeation studies in synthetic nanopores' membranes (*in vitro*) showed that PL has higher permeation capacity than CL, and CH8 produced some elasticity to CL increasing its permeation capacity even when related to PL containing CH8. The pig's ear skin permeation studies (*ex vivo*) showed that CH8 in both liposome types was capable of permeate the skin layers, reaching the dermis. Mice leishmania treatment *in vivo* results showed that the liposomal formulation was more efficient that free CH8, underling CH8's efficiency in CL, in which the action was similar to free CH8 intra-wound application. Results showed the technological development of CL and PL containing CH8 that contribute to a more efficiency treatment of coetaneous leishmania.

KEYWORDS: lipossome, PEG-8L, CH8 e cutaneous leishmania

Sumário

DEDICATÓRIA	VII
AGRADECIMENTOS	XI
EPÍGRAFE	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
SUMÁRIO	XIX
LISTA DE FIGURAS	XXV
LISTA DE TABELAS	XXXIII
NOMENCLATURA	XXXVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Desenvolvimento de novos medicamentos	9
2.2. Lipossomas: definição e propriedades	9
2.2.1. Lipossomas para aplicações cutâneas	14
2.2.2. Transporte transdérmico	18
2.2.3. Mecanismo de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos através da pele	22
2.3. Leishmaniose	24
2.3.1. Epidemiologia e formas	25
2.3.2. Transmissão	30
2.3.3. Hospedeiro	34
2.4. Fármacos para tratamento da leishmaniose	34
2.3.3. Quimioterapia convencional	35

2.3.3.	Descoberta de novos medicamentos	38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1.	Materiais	45
3.2.	Equipamentos	46
3.3.	Metodologia para preparação dos lipossomas convencionais vazios	47
3.3.1.	Redução e homogeneização do tamanho das vesículas	48
3.4.	Encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas convencionais	48
3.4.1.	Adição de CH8 ao filme lipídico	49
3.4.2.	Adição da chalcona CH8 a lipossomas pré-formados	50
3.4.2.1.	Chalcona sólida	50
3.4.2.2.	Chalcona líquida	50
3.4.2.2.1.	Influência da concentração lipídica	51
3.4.2.2.2.	Influência das condições de mistura	51
3.5.	Preparação dos lipossomas peguilados	53
3.6.	Caracterização dos lipossomas	53
3.6.1.	Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos	54
3.6.2.	Quantificação do teor de fosfato	55
3.6.3.	Avaliação da estabilidade coloidal ao longo da estocagem	56
3.6.4.	Quantificação da chalcona CH8	56
3.6.5.	Morfologia	57
3.6.6.1.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	57
3.6.6.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
3.6.7.	Temperatura de Transição de Fase	58
3.6.8.	Tensão superficial	58

3.6.9.	Potencial zeta	59
3.7.	Toxicidade	59
3.7.1.	Cultura Celular	60
3.7.2.	Preparo dos Extratos de Lipossomas	60
3.7.3.	Teste de Citotoxicidade	60
3.8.	Ensaio <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	60
3.8.1.	Permeação <i>in vitro</i> através de membranas sintéticas de nanoporos	61
3.8.2.	Permeação <i>ex vivo</i> - modelo de célula de Franz, com pele de orelha de porco	62
3.8.3.	Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia das composições lipossomais no tratamento tópico da leishmaniose cutânea	63
3.9.	Análise estatística	64
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1.	Lipossomas convencionais	67
4.1.1.	Lipossomas vazios	67
4.1.1.1.	Diâmetro médio e distribuição de tamanhos	67
4.1.1.2.	Rendimento em relação ao teor de fosfato	69
4.1.1.3.	Estabilidade coloidal ao longo da estocagem	69
4.1.1.4.	Morfologia	72
4.1.2.	Encapsulação da chalcona CH8	73
4.1.2.1.	Adição de chalcona CH8 ao filme lipídico	73
4.1.2.1.1.	Homogeneização e redução de tamanhos	75
4.1.2.2.	Adição da chalcona CH8 a lipossomas pré-formados	77
4.1.2.2.1.	Chalcona sólida	77
4.1.2.2.2.	Chalcona líquida	77

4.1.2.2.2.1.	Influência da concentração lipídica	78
4.1.2.2.2.1.1.	Rendimento em relação ao teor de fosfato	81
4.1.2.2.2.2.	Influência das condições de mistura	82
4.1.2.2.2.3.	Identificação da saturação da bicamada lipídica ..	86
4.1.2.2.2.4.	Estabilidade Coloidal ao longo da estocagem	88
4.1.2.2.2.5.	Morfologia	90
4.2.	Lipossomas peguilados	91
4.2.1.	Lipossomas vazios	92
4.2.1.1.	Incorporação do PEG-8L	92
4.2.1.2.	Morfologia	96
4.2.1.3.	Tensão Superficial	98
4.2.1.4.	Potencial zeta	103
4.2.1.5.	Toxicidade	104
4.2.2.	Lipossomas contendo chalcona CH8	106
4.2.2.1.	Incorporação do PEG-8L	106
4.2.2.2.	Morfologia	108
4.2.2.3.	Tensão Superficial	109
4.2.2.4.	Temperatura de Transição de Fase	111
4.3.	Transporte dos Lipossomas Através de Membranas Sintéticas de Nanoporos	114
4.3.1.	Quantificação da CH8 permeada	114
4.3.2.	Teor de fosfato após permeação	116
4.3.3.	Diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas permeados	118
4.3.4.	Morfologia	119

4.3.5.	Tensão Superficial	123
4.3.6.	Potencial Zeta	126
4.3.7.	Reologia de Lipossomas em Membranas de Nanoporos	126
4.3.7.1.	Comportamento da e vazão versus pressão para os lipossomas	127
4.4.	Permeação <i>ex vivo</i> - modelo de célula de Franz, com pele de orelha de porco	129
4.5.	Avaliação das composições lipossomais	131
5.	CONCLUSÕES	135
6.	SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	139
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
	ANEXO	163

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1** Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossoma, que pode conter fármacos hidrofílicos na cavidade aquosa interna (a), enquanto fármacos hidrofóbicos ficam retidos na bicamada lipídica (b), adaptado de Torchilin (2005) **10**
- Figura 2** Molécula de fosfatidilcolina. Em destaque o grupo hidrofílico, colina e fosfato, ligado à porção hidrofóbica através de um esqueleto de glicerol, adaptado de Nelson & Cox (2004) **11**
- Figura 3** Forma de agregação das moléculas de fosfolipídios que formam as bicamadas **12**
- Figura 4** Representação esquemática dos lipossomas classificados de acordo com seu tamanho e número de bicamadas lipídicas: SUV - vesículas unilamelares pequenas, LUV - vesículas unilamelares grandes, OLV - vesículas oligolamelares grandes, MLV - vesículas multilamelares, e MVV - vesículas multivesiculares, adaptado de Rongen *et al.*(1997) **13**
- Figura 5** Lipossoma elástico, contendo tensoativo inserido na bicamada **16**
- Figura 6** Tensoativo PEG-8L (polioxietileno lauril éster) **17**
- Figura 7** Representação esquemática de uma secção transversal da pele humana, adaptado de Williams (2003) **21**
- Figura 8** Possíveis mecanismos de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos na pele. (A) mecanismo do fármaco livre, (B) mecanismo de penetração aumentada dos componentes dos lipossomas, (C) mecanismo de adsorção das vesículas e/ou fusão com o estrato córneo, (D) mecanismo de permeação das vesículas intactas e (E) mecanismo de permeação através do folículo piloso, adaptado

	de EL Maghraby <i>et al.</i> (2008)	22
Figur 9	Número de casos e coeficientes anuais de detecção de casos autóctones de LTA no Brasil – 1985 a 2003	27
Figura 10	Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, dividido em Grandes Regiões (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) e Unidades Federadas, no período de 1990 a 2008	28
Figura 11	Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes no Brasil, dividido em Grandes Regiões (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) e Unidades Federadas, no período de 1990 a 2008	29
Figura 12	Representação esquemática do ciclo de transmissão da leishmaniose, adaptado da OMS (2005)	33
Figura 13	Sequência de eventos desencadeados após a inoculação do parasito no organismo hospedeiro, adaptado de Brasil (2006) ..	32
Figura 14	Estrutura química da chalcona CH8 (3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona), adaptado de Boeck <i>et al.</i> (2006)	40
<u>Materiais e Métodos</u>		
Figura 15	Esquema das estratégias experimentais para a encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas	49
Figura 16	Chalcona CH8 na forma de pó (agulhas)	50
Figura 17	Esquema de veiculação da chalcona CH8 para várias condições de mistura: agitação mecânica de alto cisalhamento (impelidor pá dentada), agitação recíproca (shaker), agitação branda de baixo cisalhamento (balão rotatório e impelidor âncora)	52
Figura 18	Representação esquemática da metodologia de quantificação	

do teor de fosfato (B – branco, P – padrão fosfato, A – amostra)) 56

Resultados e Discussão

- Figura 19** Evolução do perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio e distribuição, para lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, mantidos sob refrigeração (8 °C) por um período de 30 dias. Imediatamente após a preparação (t=0) 71
- Figura 20** Morfologia dos lipossomas convencionais vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) à temperatura ambiente (laboratorial) 72
- Figura 21** Microscopias eletrônicas de varredura da chalcona CH8 adicionada à mistura clorofórmio-metanol (9:1) 75
- Figura 22** Concentração de chalcona CH8 (mg/mL) encapsulada em função da concentração de lipídio 78
- Figura 23** Razão molar fármaco/lipídio (CH8:EPC) para as diferentes concentrações lipídicas dos lipossomas 79
- Figura 24** Influência da encapsulação da chalcona CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios de $1,0 \cdot 10^{-2}$ a $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, determinação em termos de número de vesículas – distribuição (N)) 80
- Figura 25** Concentração de chalcona CH8 (mg/mL) encapsulada através da adição à lipossomas convencionais pré-formados, em função das condições de mistura, agitação mecânica I - alto cisalhamento com impelidor pá dentada; agitação mecânica II - baixo cisalhamento com impelidor âncora; agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo 82
- Figura 26** Razão molar fármaco/lipídio (CH8:EPC) para as diferentes condições de mistura: agitação mecânica I - alto cisalhamento com impelidor pá dentada; agitação mecânica II - baixo

	cisalhamento com impelidor âncora; agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo	84
Figura 27	Evolução gráfica da encapsulação da chalcona CH8 na variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em função das diferentes condições de mistura	85
Figura 28	Espectro de varredura UV/VIS da chalcona CH8 no solvente acetonitrila.	86
Figura 29	Espectro de varredura dos lipossomas em presença de CH8. Varredura para lipossomas vazios, lipossomas contendo: 0,078 mg/mL de CH8; 0,149 mg/mL de CH8; 0,215 mg/mL de CH8; 0,274 mg/mL de CH8; 0,329 mg/mL de CH8; 0,379 mg/mL de CH8; 0,548 mg/mL de CH8 e chalcona CH8 em presença de tampão HEPES	87
Figura 30	Morfologia dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada	90
Figura 31	Evolução da cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 1 hora. t=0 – imediatamente após a adição do PEG-8L.	95
Figura 32	Evolução da cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 24 horas. t=0 – imediatamente após a adição do PEG-8L.	96
Figura 33	Morfologia dos lipossomas peguilados vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) e PEG-8L (60:40)	97
Figura 34	Morfologia dos lipossomas convencionais vazios (A) e lipossomas peguilados vazios (B) após incubação com PEG-8L por 24 horas	98
Figura 35	Influência da concentração de PEG-8L na tensão superficial (A) e curva para determinação da CMC do PEG-8L livre (B)	99

Figura 36	Cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios, (A) tempo 0, imediatamente após adição do PEG-8L, (B) 3 horas, (C) 6 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas e (F) 48 horas após incubação	100
Figura 37	Tensão superficial em função da concentração do PEG-8L livre e adicionado a lipossomas convencionais vazios	101
Figura 38	Representação esquemática da distribuição das moléculas de lipídio e PEG-8L entre a superfície ar-água e o seio da solução nas várias concentrações de PEG-8L adicionadas aos lipossomas convencionais na incubação	102
Figura 39	Influência coloidal da adição de PEG-8L nas várias concentrações aos lipossomas convencionais vazios	104
Figura 40	Viabilidade das células a partir da concentração da formulação lipossomal. (■) – lipossomas convencionais; (●) – lipossomas peguilados (Rodas <i>et al.</i> , 2009)	105
Figura 41	Morfologia dos lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada, na proporção molar de 60:40 (EPC:PEG)	108
Figura 42	Cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada, (A) tempo 0, imediatamente após adição do PEG-8L, (B) 3 horas, (C) 6 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas e (F) 48 horas após incubação	110
Figura 43	Termograma de DSC para água; lipossomas convencionais vazios; chalcona CH8 em água; lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada; PEG-8L em água; lipossomas peguilados vazios; lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada. No topo as temperaturas de transição de fase (T _m) obtidas de cada curva com taxa de aquecimento de 1 °C/min	112
Figura 44	Diagrama esquemático dos efeitos da inserção do PEG-8L no	

	empacotamento da bicamada lipídica dos lipossomas, adaptado de Lasic & Martin (1995)	113
Figura 45	Quantificação da chalcona CH8 após permeação de lipossomas convencionais (LC) e peguilados (LP) em membrana sintética, nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	115
Figura 46	Efeito da pressão (2,5; 5; 12 e 20 atm) aplicada ao sistema, sob o diâmetro médio dos lipossomas convencionais e peguilados (60:40), vazios ou contendo chalcona CH8 encapsulada	118
Figura 47	Morfologia dos lipossomas convencionais vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) antes (A) e após permeação (B) através de membranas (P= 2,5 atm)	120
Figura 48	Morfologia dos lipossomas peguilados vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) e PEG-8L (60:40) antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm	121
Figura 49	Morfologia dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm	122
Figura 50	Morfologia dos lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada, incubados com PEG-8L (60:40) antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm	123
Figura 51	Tensão superficial dos lipossomas convencionais vazios (A) e peguilados vazios (B) e da solução de PEG-8L livre (C), utilizado como controle, medidas antes e após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de 30 nm de diâmetro, sob pressão de 2,5 atm e temperatura de 37 °C	124
Figura 52	Tensão superficial dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 (A) e peguilados contendo chalcona CH8 (B),	

	medidas antes e após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de 30 nm de diâmetro, sob pressão de 2,5 atm e temperatura de 37 °C, comparativamente com os lipossomas vazios	125
Figura 53	Efeito da permeação (P= 2,5 atm e 37 °C) sobre o potencial zeta dos lipossomas. LC – lipossomas convencionais e LP – lipossomas peguilados	126
Figura 54	Curvas de permeação de água deionizada, lipossomas convencionais e peguilados em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poros 30 nm	128
Figura 55	Permeação dos lipossomas na região de 10 a 18 atm, ajustadas a uma reta	128
Figura 56	Demonstração da penetração cutânea <i>ex vivo</i> das composições lipossomais utilizando o modelo de pele de porco. Em (A) é apresentado o percentual de chalcona retida no estrato córneo e em (B) o percentual de chalcona CH8 retido na epiderme e derme (Rossi-Bergmann <i>et al.</i> , 2009)	130
Figura 57	Eficácia da chalcona CH8 veiculada em lipossomas convencionais e peguilados no tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via tópica. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i> GFP na orelha. Tratamento administrado pela via tópica por 30 dias consecutivos, 2x ao dia, 12 dias após infecção; intralesional 2x por semana, durante 4 semanas, 12 dias após infecção. Crescimento de lesão com tratamento tópico com formulações lipossomais na dose de 6,58 µg chalcona CH8, e creme lanete de 200µg chalcona CH8. Tratamento do grupo controle intralesional com 3,29 µg chalcona CH8. Crescimento de lesão medido semanalmente com auxílio de paquímetro (Rossi-	

	Bergmann <i>et al.</i> , 2009)	132
Figura 58	Eficácia da chalcona CH8 encapsulada veiculada em lipossomas convencionais e peguilados no tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via tópica. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i> GFP na orelha. Tratamento administrado pela via tópica por 30 dias consecutivos, 2x ao dia, 12 dias após infecção; intralesional 2x por semana, durante 4 semanas, 12 dias após infecção. Carga parasitária medida por unidades de fluorescência específica, obtida 42 dias após infecção. Fluorescência basal = 7575 ± 1289 , (Média \pm SD, n=5), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Rossi-Bergmann <i>et al.</i> , 2009)	133
	<u>Anexo</u>	
Figura 59	Curva analítica de fosfato. $y = ax + b$; onde $a = 0,5797$; $b = -0,0043$ e $R = 0,997$; onde: $y =$ variável dependente (absorbância), $x =$ variável independente (concentração em mg/mL), $a =$ coeficiente angular da reta, $b =$ coeficiente linear da reta e $r =$ coeficiente de correlação	167
Figura 60	Curva analítica da chalcona CH8	168

LISTA DE TABELAS

Resultados e Discussão

Tabela 1	Diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanho dos lipossomas convencionais vazios de EPC nas concentrações $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$	68
Tabela 2	Perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanhos, para lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de 30 dias	70
Tabela 3	Influência do solvente – clorofórmio puro ou clorofórmio-metanol (9:1) – na formação do filme lipídico contendo chalcona CH8. Concentração de lipídios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$	74
Tabela 4	Diâmetro médio dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada durante a formação do filme lipídico, antes e após extrusão para redução e homogeneização de tamanhos	76
Tabela 5	Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em função das diferentes condições de mistura .	85
Tabela 6	Perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio e distribuição, para lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ contendo chalcona CH8, mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de 30 dias de armazenamento	89
Tabela 7	Diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanho do tensoativo PEG-8L livre em solução de tampão HEPES	92
Tabela 8	Cinética de incorporação do PEG-8L em lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do tempo de incubação acompanhadas por um período de 24 horas	93

Tabela 9	Índice de Proliferação das células e correspondente percentual de freqüência de micronúcleo de formulação de lipossomas (Rodas <i>et al.</i> , 2009)	106
Tabela 10	Cinética de incorporação do PEG-8L em lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L ⁻¹ contendo chalcona CH8 encapsulada, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 24 horas	107
Tabela 11	Quantificação da chalcona CH8 encapsulada em lipossomas convencionais e peguilados (40% de PEG), após permeação em membrana sintética, nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm, em porcentagem de chalcona CH8 permeada	115
Tabela 12	Quantificação do teor de fosfato dos lipossomas convencionais e peguilados (40% de PEG-8L), vazio e contendo chalcona CH8 encapsulada, após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de diâmetro de 30 nm, a uma temperatura de 37 °C e sob pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	117

Anexo

Tabela 13	Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC	169
Tabela 14	Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC	170
Tabela 15	Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $3,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC	170
Tabela 16	Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $4,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC	171
Tabela 17	Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC	171
Tabela 18	Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L ⁻¹ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação mecânica de alto cisalhamento (impelidor de pá dentada)	172
Tabela 19	Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a	

	1,0.10 ⁻² mol.L ⁻¹ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação recíproca (Shacker)	173
Tabela 20	Varição do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a 1,0.10 ⁻² mol.L ⁻¹ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação rotatória (balão rotativo)	173
Tabela 21	Permeação dos lipossomas convencionais vazios, através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	178
Tabela 22	Permeação dos lipossomas peguilados vazios (razão molar 60:40 de EPC:PEG), através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	179
Tabela 23	Permeação dos lipossomas convencionais contendo CH8 encapsulada, através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	179
Tabela 24	Permeação dos lipossomas peguilados contendo CH8 encapsulada (razão molar 60:40 de EPC:PEG), através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm	180

NOMENCLATURA

CH8	chalcona CH8 (3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona)
CL	creme lanete
CMC	concentração micelar crítica
Cp	capacidade calorífica
D	Derme
DMC	2',6'-diidroxi-4'-metoxichalcona
Dt	coeficiente de difusão translacional
D ⁶	diâmetro da partícula elevado à sexta potência
\bar{D}	diâmetro médio
EC	estrato córneo
EP	Epiderme
EPC	fosfatidilcolina de ovo (Lipoid E-80)
I	distribuição de tamanhos por intensidade de luz espalhada
IFN _γ	interferon-gama
K	constante de Boltzmann
LC	lipossomas convencionais
LP	lipossomas peguilados
LT	leishmaniose tegumentar
LTA	leishmaniose tegumentar americana
LUV	vesículas unilamelares grandes
LV	leishmaniose visceral
L _α	estado ordenado gel

L_{β}	estado líquido-cristalino
MLV	lipossomas multilamelares grandes
MS	ministério da saúde
MVV	vesículas multivesiculares
N	distribuição de tamanhos por número
NK	células <i>natural killer</i>
OLV	vesículas oligolamelares grandes
OMS	organização mundial de saúde
ON	óxido nítrico
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
PEG	polietilenoglicol
PEG-8L	polioxietilenoglicol-8-lauril éster
PZ	potencial zeta
QLS	espalhamento de luz quase elástico
R	raio das vesículas
Rh	raio hidrodinâmico médio
RM	resistência medicamentosa
Sb^{5+}	antimoniato pentavalente
SFM	sistema fagocítico mononuclear
SUV	vesículas unilamelares pequenas
t	Tempo
T	temperatura absoluta
TDR	training in tropical diseases
T_m	temperatura de transição de fase
TNF_{α}	fator de necrose tumoral alfa

TS	tensão superficial
η	viscosidade da solução dispersante
ζ	potencial zeta

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a administração de fármacos através de rotas não invasivas como as vias oral, pulmonar e transdérmica têm se destacado pela facilidade de aplicação e por proporcionar maior conforto ao usuário do medicamento.

A encapsulação de fármacos em nanopartículas e micropartículas biodegradáveis é uma estratégia terapêutica particularmente interessante no caso da leishmaniose devido à localização exclusiva da leishmania dentro de células fagocíticas, os macrófagos, o que favorece o direcionamento do fármaco para dentro das células infectadas (Lasic, 1993). Entre os sistemas transportadores de medicamentos atualmente disponíveis, os lipossomas ocupam uma posição de destaque para terapia das leishmanioses (Frézard *et al.*, 2005). Lipossomas são também reconhecidos por terem habilidade facilitadora na permeação de compostos através da pele (Kim *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação transdérmica de fármacos foi influenciado principalmente pelo estudo de novos tensoativos sintéticos, os quais incorporados aos lipossomas interferem no empacotamento da sua bicamada lipídica, reduzindo a sua temperatura de transição de fase, tornando-os mais flexíveis e com propriedades de deformação e elasticidade (Magdassi, 1997). Os lipossomas elásticos promovem aumento da passagem transcutânea de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, os quais podem atingir o sítio da infecção cutânea de forma mais eficaz.

Sendo a leishmaniose uma doença negligenciada pela maioria das empresas farmacêuticas, a demanda histórica do mercado nacional para leishmanicidas mais eficazes torna-se bastante atraente para empresas nacionais dispostas a investir no desenvolvimento de novos medicamentos.

O primeiro resultado na área biomédica com lipossomas para o tratamento da leishmaniose foi obtido, na década de 1970, com os antimoniais. Um aumento de até 700 vezes na atividade leishmanicida desses compostos foi relatado após administração na forma encapsulada de lipossomas por via parenteral (Frézard *et al.*, 2005).

A leishmaniose é doença infecciosa, endêmica e fatal que vem aumentando, consideravelmente, em todo o mundo. No Brasil são encontradas todas as formas da doença. Embora nas últimas três décadas, tenha havido um grande avanço no conhecimento da biologia celular e imunologia destas infecções, o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses continua sendo o antimônio. Este e outros fármacos disponíveis comercialmente (descritos no item 2.4) apresentam várias inconveniências, como nefrotoxicidade, alto custo, indução ao diabetes, teratogenicidade e indução de resistência a drogas. A indústria farmacêutica e os principais centros de pesquisa pouco têm contribuído no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos para o tratamento da leishmaniose.

Estudos com possibilidades de melhorar o quadro caótico desta doença no Brasil, em curto espaço de tempo, devem ser estimulados. A encapsulação e liberação controlada de fármacos aparecem como alternativas viáveis. A tecnologia de liberação controlada de fármacos, com vetores alvos-específicos, é capaz de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagens das substâncias ativas. Dentre os sistemas coloidais de liberação controlada aparecem os lipossomas, constituídos de fosfolipídios que mimetizam as membranas celulares (Lasic, 1993).

Este trabalho propõe-se a desenvolver uma formulação contendo lipossomas usando matérias-primas biocompatíveis na qual é veiculado o princípio ativo 3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona, uma chalcona sintética, mais conhecida como chalcona CH8 (Rossi-Bergmann *et al.*, 2002), um composto químico com propriedades antileishmaniais promissoras. As chalconas são compostos estruturais simples da família dos flavonóides, presentes em uma variedade de espécies de plantas com amplo espectro de atividade farmacológica, incluindo antibacteriana e antifúngica (Boeck *et al.*, 2006). Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que estuda a encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas.

O estudo desenvolvido neste trabalho visa contribuir na busca de alternativas para melhorar as aplicações terapêuticas dos leishmanicidas através de sistemas de liberação controlada de fármacos direcionados a alvos específicos.

O racional para nossa proposta é que com os sistemas lipossomais se possa alterar a via de administração, promover a liberação modificada de fármacos através da pele e atingir alvos específicos. A estratégia para avaliar esta hipótese é através da preparação de formulação tópica constituída de lipossomas convencionais e elásticos encapsulando a chalcona CH8.

A relevância desse estudo está nos seguintes aspectos: caracterização físico-química de lipossomas deformáveis; determinação da citotoxicidade dos lipossomas; desenvolvimento de processos de encapsulação de compostos altamente hidrofóbicos, que são de difícil veiculação em sistemas lipossomais; contribuição para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica com potenciais benefícios para o tratamento da leishmaniose, resultando em expressivo impacto social, com ampliação do acesso da população a medicamentos de melhor qualidade, tecnologicamente atualizados, e de custo acessível; do ponto de vista tecnológico.

No desenvolvimento do trabalho, inicialmente estudamos diferentes estratégias para encapsulação da chalcona CH8 em LC. Para o desenvolvimento destas estratégias para a incorporação eficiente da chalcona CH8, foram avaliadas variáveis do processo, tais como tipo de agitação (mecânica, recíproca e rotatória), bem como concentração lipídica, determinando a máxima capacidade de carregamento dos lipossomas com chalcona CH8 (razão molar CH8/EPC). Em uma segunda etapa, foi analisada a influência da presença da chalcona CH8 na incorporação do PEG-8L em LC, para a formação dos lipossomas peguados (LP). A avaliação da estabilidade de estocagem foi realizada para os LC e LP.

Os lipossomas foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas e elásticas. As metodologias usadas para a caracterização dos lipossomas foram: dosagem de EPC por colorimetria, por meio da quantificação do teor de fosfato, quantificação da chalcona CH8 por espectrofotometria UV/VIS, determinação do tamanho médio dos lipossomas por espectroscopia de espalhamento da luz laser (PCS), visualização da morfologia dos lipossomas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), temperatura de transição de fases por calorimetria diferencial de varredura (DSC), medidas de tensão superficial,

potencial zeta e ensaios de citotoxicidade, este último em colaboração com a Universidade de Sorocaba (UNISO).

Finalmente foi estudada a permeação *in vitro*, determinando a capacidade de deformação dos lipossomas, através do transporte em membranas sintéticas de nanoporos (30 nm) para avaliar os efeitos da chalcona CH8 encapsulada, na elasticidade dos lipossomas. O ensaio de permeação *ex vivo*, utilizando célula de Franz para testar a eficácia dos lipossomas e o tratamento tópico de camundongos infectados com leishmaniose, foram realizados em colaboração com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os resultados experimentais obtidos e a sua discussão serão apresentados nos itens subseqüentes.

Revisão

Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desenvolvimento de novos medicamentos

Essencialmente, duas estratégias diferentes estão atualmente disponíveis para o desenvolvimento de novos medicamentos. A primeira estratégia envolve o planejamento/síntese de novas substâncias ativas ou de fármacos já conhecidos com modificações químicas. A segunda estratégia envolve a associação reversível de fármacos já em uso a um sistema transportador, visando direcionar o fármaco para as células-alvo, reduzir a toxicidade dos fármacos, protegê-los contra a degradação e promover a sua liberação controlada (Frézard *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, a micro e nanotecnologia vêm contribuindo nos últimos 20 anos, através dos vários tipos de partículas para a veiculação de fármacos. A veiculação de fármacos constitui a forma mais moderna de administração por proporcionarem proteção, liberação controlada e/ou direcionamento específico. Os fármacos veiculados representam novos medicamentos, por alterarem a farmacocinética em relação aos mesmos fármacos na forma livre (D'aquino *et al.*, 2006; Rawat *et al.*, 2006).

Para circundar os problemas relacionados à citotoxicidade e degradação de fármacos, o desenvolvimento de formulações menos tóxicas e novos métodos para veiculação de fármacos devem ser estimulados. Entre os sistemas inovadores para transporte de medicamentos atualmente estudados e disponíveis comercialmente, tais como micro e nanopartículas poliméricas e hidrogéis, dentre outros, encontram-se os lipossomas que apresentam como principal característica a mimetização da membrana celular e ocupam uma posição de destaque para terapia das leishmanioses, principalmente com a utilização da anfotericina B (Lasic, 1993; Frézard *et al.*, 2005).

2.2. Lipossomas: definição e propriedades

Os lipossomas foram introduzidos na década de 1960 por Alec Bangham, que descreveu o comportamento dos fosfolípidios em solução aquosa formando lipossomas a partir da agregação espontânea das moléculas. Do ponto de vista

científico e comercial, os lipossomas passaram a ter papel de destaque a partir da década de 1970, com estudos de Gregoriadis, como sistemas carreadores de agentes terapêuticos, inclusive tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade dos compostos com os quais eles estão associados (Banghan *et al.*, 1965; Gregoriadis & Ryman, 1971). Nos anos seguintes até os dias atuais, os lipossomas vêm sendo extensivamente estudados e aplicados à indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, veterinária e de diagnóstico clínico (Scheerlinck & Greenwood, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Bawarski *et al.*, 2008; Giacomoni, 2008; Tanner & Marks, 2008; De Leeuw *et al.*, 2009; Sandhiya *et al.*, 2009).

Os lipossomas são vesículas esféricas e microscópicas constituídas de fosfolipídios que se agregam em bicamada, compostos de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso interno. Estes podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas (Figura 1), sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso interno e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana lipídica. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (New, 1990; Lasic, 1993; Puisieux *et al.*, 1995; Edwards & Baeumner, 2006).

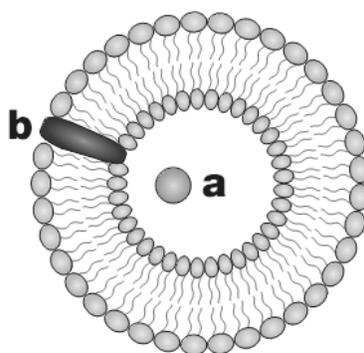


Figura 1 – Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossoma, que pode conter fármacos hidrofílicos na cavidade aquosa interna (a), enquanto fármacos hidrofóbicos ficam retidos na bicamada lipídica (b), adaptado de Torchilin (2005).

Classicamente, lipossomas, são preparados a partir de fosfolipídios, pois estes são os principais componentes das membranas biológicas. Os fosfolipídios mais comuns pertencem ao grupo dos glicerofosfolipídios naturais (gema de ovo, grãos de soja) ou sintéticas, se destacando as fosfatidilcolina – Figura 2 (Lasic, 1993; Frézard, 1999; Frézard *et al.*, 2005).

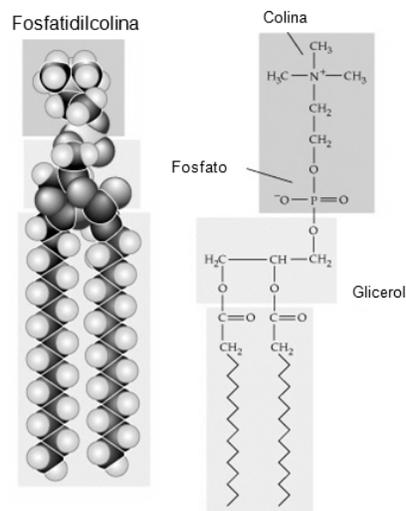


Figura 2 – Molécula de fosfatidilcolina. Em destaque o grupo hidrofílico, colina e fosfato, ligado à porção hidrofóbica através de um esqueleto de glicerol, adaptado de Nelson & Cox (2004).

As moléculas de fosfolipídios assumem um arranjo de bicamadas que, quando estão na temperatura de transição líquido-cristalino-gel, formam vesículas espontaneamente, aprisionando uma quantidade de água na sua parte interna oca. Dependendo da temperatura e do fosfolipídio usado, as bicamadas assumem ora um estado gel, em que as cadeias de hidrocarbonetos da molécula ficam em posição bem orientadas, ora um estado líquido cristalino, em que as cadeias se posicionam de forma desorientada (Jost & Griffith, 1982; Talsma *et al.*, 1992).

Os fosfolipídios possuem caráter anfifílico e em meio aquoso organizam-se na forma de bicamadas, expondo as suas cabeças hidrofílicas à água e interagindo as caudas hidrofóbicas de modo a excluir a água, formando assim estruturas lamelares que, para atingirem estabilidade termodinâmica, curvam-se e

fecham-se sobre si mesmas formando vesículas esféricas – Figura 3 (Israelachvili, 1991).

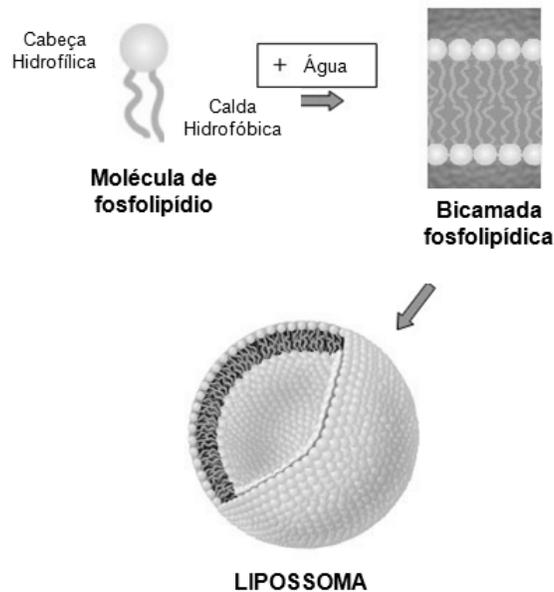


Figura 3 – Forma de agregação das moléculas de fosfolípídios que formam as bicamadas.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com seu tamanho e número de bicamadas lipídicas (lamelas) que apresentam em sua constituição (Figura 4). De acordo com suas dimensões, as vesículas lipídicas podem ser classificadas como: vesículas multilamelares (MLV) com diâmetro superior a 400 nm, que possuem a vantagem de serem facilmente preparados com o mínimo de equipamentos, mas sua principal desvantagem é a baixa capacidade de encapsulação; vesículas unilamelares grandes (LUV) – diâmetro superior a 100 nm, com a vantagem de alta capacidade de encapsulação de ativos hidrossolúveis; vesículas unilamelares pequenas (SUV) – diâmetro entre 20 e 50 nm, tem a vantagem de apresentarem população relativamente homogênea;

vesículas oligolamelares grandes (OLV); e as vesículas multivesiculares (MVV), dependendo de seu tamanho, do número de bicamadas e da existência das vesículas internas em uma vesícula. O tamanho dos lipossomas varia de 20 nanômetros a poucos micrômetros, com as membranas do lipídio de aproximadamente 5 nanômetros (Lasic, 1988).

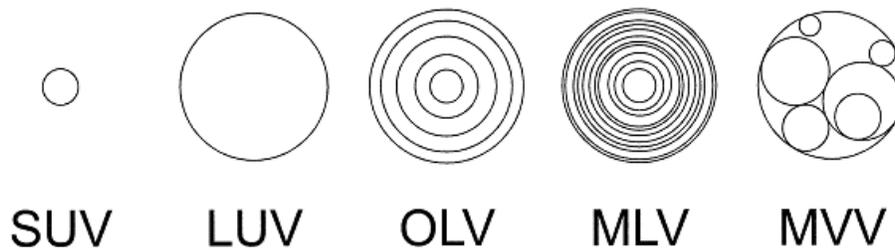


Figura 4 – Representação esquemática dos lipossomas classificados de acordo com seu tamanho e número de bicamadas lipídicas: SUV - vesículas unilamelares pequenas, LUV - vesículas unilamelares grandes, OLV - vesículas oligolamelares grandes, MLV - vesículas multilamelares, e MVV - vesículas multivesiculares, adaptado de Rongen *et al.*(1997).

A função dos lipossomas como veículo é liberar determinadas concentrações de fármaco em alvos específicos, evitando toxicidade sistêmica, uma vez que somente uma fração do fármaco está disponível para o local de ação (Grant & Bansinath, 2001).

Pela sua composição e configuração, os lipossomas mimetizam as células vivas e, portanto, possuem maior capacidade de interação com células quando comparados com outras partículas usadas na veiculação de compostos bioativos. Suas propriedades de liberação modificada ou controlada conduzem à redução de doses e frequência de administração, reduzindo assim os efeitos colaterais produzidos pelo fármaco livre em doses mais elevadas. A velocidade de liberação do princípio ativo pode ser controlada pela manipulação tanto da composição da membrana (influenciando a velocidade de degradação e/ou difusão dos lipossomas), quanto do tamanho dos lipossomas (influenciando a eficiência de captura pelos macrófagos) (Frézard *et al.*, 2005).

Os lipossomas atraíram a atenção dos pesquisadores como uma nova estratégia para liberação de fármacos, de uso interno ou de uso tópico, em sítios de ação específicos ou de liberação controlada. Eles têm sido empregados tanto para substâncias de alto como de baixo peso molecular (Schmid & Korting, 1996).

Estas vesículas artificiais são desenvolvidas para distribuir substâncias ativas em locais específicos e nos últimos anos passaram a assumir um papel importante nas áreas da dermatologia e da cosmetologia (Suzuki & Sakon, 1990). Mezei & Gulasekharan (1982) publicaram os resultados de suas pesquisas com animais referentes às alterações farmacocinéticas da triancinolona encapsulada em lipossomas comparando com preparações de uso tópico convencionais.

Embora alguns autores sugerissem que lipossomas convencionais fossem facilitadores do transporte transdérmico de fármacos (Yu & Liao, 1996; Deo *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004), tornou-se evidente que, na maioria dos casos, os lipossomas convencionais são de quase nenhum valor para esse fim, porque não promovem a sua penetração na pele (Kirjavainen *et al.*, 1996).

Os lipossomas convencionais, compostos somente por fosfolipídios, atuam como reservatórios de fármacos que se localizam nas camadas mais superficiais da pele. Os poros da pele são normalmente estreitos, 30 nm, assim, é difícil considerar como os lipossomas convencionais poderiam atravessar a pele e participar em seu transporte transdérmico por não serem capazes de deformarem-se mantendo a sua integridade. Conseqüentemente, esses lipossomas não conseguem penetrar na pele de forma eficaz (Cevc *et al.*, 2002).

Nas aplicações tópicas, os lipossomas são capazes de interagir com os lipídios da pele humana, liberando os compostos veiculados na sua estrutura. Em formulações cosméticas, os próprios lipossomas também propiciam o suprimento dos lipídios perdidos da pele e reduzem a perda transepidermal de água (Cevc & Blume, 2001; Kim *et al.*, 2002).

A busca de lipossomas mais estáveis capazes de permear as camadas da pele levou ao desenvolvimento de lipossomas deformáveis ou elásticos, através da incorporação de tensoativos na bicamada lipídica ou modificando a sua superfície com polímeros hidrofílicos (Cevc *et al.*, 2002).

2.2.1. Lipossomas para aplicações cutâneas

O interesse da indústria farmacêutica e cosmética pelo transporte através da pele levou ao desenvolvimento e à investigação de uma grande variedade de

sistemas vesiculares com diferentes características físico-químicas. Nos últimos anos, tornou-se claro que, não somente o estado do líquido das bicamadas vesiculares é importante, mas também a elasticidade da bicamada pode ter um efeito significativo sobre o comportamento das vesículas no estrato córneo (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2006).

Nas aplicações cutâneas, os lipossomas são classificados como promotores físico-químicos de absorção, facilitando a permeação de compostos através da pele. No entanto, os lipossomas convencionais, cuja superfície contém somente lipídios, atuam como reservatórios de fármacos que vão sendo difundidos a uma taxa controlada, ou localizam-se nas camadas mais superficiais da pele (Cevc *et al.*, 2002).

Para o desenvolvimento de formulações de fármacos mais eficazes e estáveis, é preciso que o carreador atravesse a barreira epitelial e seja permeado desde a camada mais superficial até as camadas mais profundas da pele. Para contornar essa dificuldade, tem-se empregado várias estratégias físicas e químicas, dentre elas, a utilização de agentes específicos chamados promotores de absorção, que provocam alteração na estrutura do estrato córneo, diminuindo sua resistência natural à permeação de compostos (Idson, 1975). Dentre esses promotores estão os tensoativos, que interagindo com os lipídios da pele facilitam o transporte intercelular dos compostos através dos poros da pele (Cevc *et al.*, 1996).

Dentre os vários tipos de lipossomas, os do tipo elástico, compostos de fosfolipídios e tensoativos (Figura 5), constituem o mais novo conceito de vesículas lipídicas e são considerados os melhores sistemas de permeação cutânea. Diferem dos lipossomas convencionais, por apresentam alta fluidez e elasticidade, sendo capazes de atravessar barreiras semipermeáveis, mantendo a sua integridade. Portanto, esses lipossomas são mais eficientes que os convencionais para administração de fármacos através da pele e aplicação em cosméticos (Cevc *et al.*, 2002).

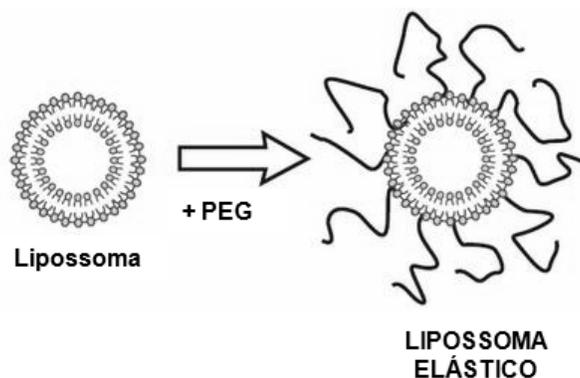


Figura 5 – Lipossoma elástico, contendo tensoativo inserido na bicamada.

Vesículas elásticas são um dos mais promissores desenvolvimentos no desenho de sistemas vesiculares. Eles foram sugeridos por ser mais efetivos que as vesículas rígidas convencionais como um veículo para transporte de fármaco transdérmico. Vesículas elásticas foram introduzidas por Cevc (1991), que combinou fosfatidilcolina com colato de sódio (ativador de borda) para formar membranas flexíveis (Cevc *et al.*, 1995; Cevc *et al.*, 1997; Cevc & Blume, 2001; Cevc *et al.*, 2002; Cevc, 2003). Estas vesículas, também chamadas de “Transfersomes[®]”, foram posteriormente caracterizadas pela sua alta elasticidade, foram patenteados como lipossomas ultra-deformáveis, capazes de passarem intactos e carrear bioativos através da pele. Foi sugerido que estes “Transfersomes[®]” eram mais efetivos que lipossomas comuns no transporte de insulina e lidocaína através da pele de ratos e humanos (Planas *et al.*, 1992; Cevc *et al.*, 1998).

Usando os mesmos componentes vesiculares, El Maghraby *et al* (2000) encontraram que vesículas elásticas aumentaram o transporte de estradiol através de pele humana cadavérica comparada a uma solução aquosa saturada. Eles também introduziram o Span 80 e Tween 80 como ativadores de borda alternativos tão efetivos como o colato de sódio. Em outros dois estudos relativamente recentes, lecitina foi combinada com o colato de sódio para formar vesículas elásticas. Isto provou ser melhor que vesículas rígidas convencionais no aumento do transporte de ciclosporina A e insulina através de pele de ratos (Guo *et al.*, 2000a; Guo *et al.*, 2000b).

Mais tarde, por volta de 1998, Van den Bergh *et al* (1999) introduziram uma nova série de vesículas rígidas e elásticas, consistindo apenas de tensoativos. Vesículas elásticas foram obtidas utilizando o mesmo princípio de Cevc *et al.*, baseado na combinação de moléculas estabilizantes e desestabilizantes no interior da bicamada da vesícula, apresentando um tensão interfacial muito baixa. As vesículas elásticas constituídas do surfactante formador de bicamada L-595 (sacarose lauril ester) e o surfactante formador de micelas PEG-8L (polioxietileno lauril éster) – Figura 6. O PEG-8L consiste essencialmente de oito moléculas polietileno glicol monoéster de ácido láurico, este é um emulsificante não iônico o/a para sistemas neutros, levemente ácidos e alcalinos, não é considerada uma substância tóxica, sendo um produto biodegradável. A incorporação de um componente formador de micela resulta na desestabilização da bicamada lipídica, aumentando assim a elasticidade da vesícula. Assim, a elasticidade e estabilidade das vesículas são fortemente dependentes da relação bicamada e surfactante formador de micela no interior da membrana vesicular. Estas vesículas elásticas foram apresentadas para serem mais eficazes do que as vesículas rígidas realçando a penetração várias ativos na pele (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2002; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003a; Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2003; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003b)

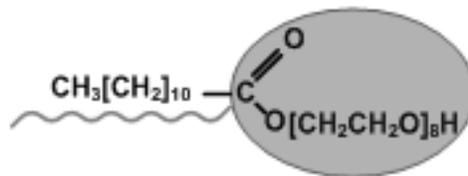


Figura 6 – Tensoativo PEG-8L (polioxietileno lauril éster).

A introdução de tensoativos derivatizados com polímeros hidrofílicos tais como o polietilenoglicol (PEG) permite que os lipossomas adquiram flexibilidade de deformação preservando a sua integridade, através da proteção hidrofílica conferida pelo polímero na superfície dos lipossomas, além da redução da temperatura de transição de fases da estrutura lipossomal. Essas características permitem a sua penetração transdérmica, mesmo possuindo tamanhos da ordem

de 100nm, melhorando assim a permeação cutânea de vários fármacos (El Maghraby *et al.*, 1999; Van Den Bergh *et al.*, 1999; Bouwstra *et al.*, 2003).

Os efeitos da incorporação de tensoativos nas propriedades físico-químicas (que incluem o tamanho da vesícula, eficiência de encapsulação, o potencial do zeta, entre outros) de lipossomas deformáveis foram investigados extensivamente em diferentes estudos (Jain *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006; Elsayed *et al.*, 2007).

Diversos estudos relataram que os lipossoma deformáveis podiam melhorar *in vitro* a administração transdérmica de vários fármacos (El Maghraby *et al.*, 1999; 2001a; Trotta *et al.*, 2002; Boinpally *et al.*, 2003) e para penetrar a pele intacta, *in vivo*, transferindo terapêuticamente as quantidades de fármaco (Cevc & Blume, 2001; 2003; 2004), com a eficiência comparável com a administração subcutânea (Cevc *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1995; Cevc *et al.*, 1998; Cevc, 2003).

2.2.2. Transporte transdérmico

O transporte transdérmico de fármacos tem muitas vantagens comparadas a outras vias de administração. Entretanto, o maior problema ainda permanece sendo a baixa penetração da maioria de compostos através da pele humana. Os sistemas vesiculares foram introduzidos nos anos 1980 e desde então têm sido estudados como veículos para o transporte cutâneo e transdérmico de fármacos (Du Plessis *et al.*, 1994; Fresta & Puglisi, 1997). Muitos relatórios têm demonstrado a permeação melhorada na pele quando os fármacos foram incorporados nas vesículas. Contudo, o mecanismo exato para o transporte de fármaco ser promovido, não é ainda, inteiramente compreendido. Sugeriu-se que este mecanismo e assim também o efeito aumentado fossem fortemente dependentes das características físico-químicas dos sistemas vesicular (Kirjavainen *et al.*, 1996; Van Kuijk-Meuwissen *et al.*, 1998). As vesículas no estado líquido-cristalino foram descobertas por ter características superiores às vesículas no estado-gel para o aumento da permeabilidade na pele (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2002).

O tratamento de várias doenças de dermatológicas por aplicação tópica de fármacos é esperado que seja mais eficiente se concentrações significantes do fármaco possam ser retidas na epiderme. A habilidade do estrato córneo de agir como um reservatório para transporte de fármacos através da pele já foi demonstrado. Um estudo descrito por Egbaria & Weiner (1991) mostrou que a aplicação tópica de formulações lipossomais podem ser sistemas de transporte efetivos para o tratamento de doenças da pele. Tais transportes devem reduzir a incidência de efeitos colaterais indesejáveis de uma administração sistêmica e uma absorção sistêmica aumentada do fármaco após aplicação tópica com facilitadores da permeação o qual irreversivelmente rompem a camada das estruturas do estrato córneo (Du Plessis *et al.*, 1994).

Nas últimas décadas, houve um amplo interesse em explorar novas técnicas que aumentem a absorção de fármacos através da pele (Barry, 1991; Williams, 2003; Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005). A via transdérmica tem sido considerada a mais inovadora e promissora para a administração e liberação sustentada de fármacos (Cevc & Blume, 2001).

Em um sentido amplo, a liberação transdérmica ou transcutânea de fármacos, inclui todas as formulações de fármacos administrados por via tópica, projetadas para transportar os ingredientes ativos para a circulação geral, uma vez que os lipídios dérmicos somente auxiliam na introdução dos ativos na pele (Cevc *et al.*, 1996).

Embora a pele como uma via de administração de fármacos, comparada com as demais vias, possa oferecer muitas vantagens incluindo evitar o metabolismo hepático de primeira passagem, impedir a exposição às condições químicas e biológicas do trato gastrointestinal, menores níveis de fármaco no plasma, habilidade promotora de liberação controlada de fármacos de meia vida curta e/ou estreitar janelas terapêuticas, e o conforto do paciente na aplicação (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2002; Bouwstra *et al.*, 2003; Williams, 2003; Barichello *et al.*, 2006), a natureza da barreira da pele torna difícil a penetração e permeação da maioria dos fármacos (El Maghraby *et al.*, 2001b).

A principal dificuldade de utilização da via transdérmica para administração de fármacos é a baixa permeabilidade destes na pele humana, sendo o fator limitante de liberação cutânea. Substâncias com massa molar acima de 600 Da possuem menor capacidade de penetrar pela pele. Os fatores que limitam o sucesso da tecnologia transdermal incluem também a irritação local da pele, relacionado a determinados fármacos e formulações, limitando a dose de fármaco que pode ser liberada transdermicamente (Barichello *et al.*, 2006).

Os sistemas vesiculares de liberação transdérmica de fármacos foram primeiramente introduzidos nos anos 1980. A melhoria em tecnologias físicas e químicas para aumentar a permeação conduziu a um interesse renovado na via transdermal de liberação de fármacos. Os métodos para melhorar a liberação cutânea confiam no uso de melhoradores químicos da penetração, novos sistemas de veiculação, por exemplo, microemulsão, sistemas de liberação baseados em lipossomas e formulações supersaturadas (Moser *et al.*, 2001), ou estratégias físicas mais complexas, por exemplo, iontoforese (Essa *et al.*, 2002), sonoforese (Merino *et al.*, 2003) e eletroporação (Tokudome & Sugibayashi, 2003). A veiculação de bioativos em suportes particulados de natureza coloidal tem sido estudada também como mecanismo facilitador do transporte transdérmico (Barichello *et al.*, 2006).

A estrutura da pele e suas funções da barreira, apresentada na Figura 7, foram extensivamente descritas na literatura por pesquisadores como Scheuplein & Blank (1971); Elias (1981); Barry (1983); Williams (2003). A barreira de pele no estado saudável e doente tem sido igualmente revistos recentemente (Bouwstra & Ponec, 2006). A pele humana compreende uma série de camadas penetradas por pêlos e ductos de glândula. As principais camadas da pele, do interior para fora, compreende a camada subcutânea (hipoderme), a derme com tecido conectivo e avascular estratificado, e epiderme celular.

A derme é composta de fibras protéicas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água. Sangue e glândulas linfáticas, terminações nervosa e unidades pilossebáceas (folículo piloso e glândulas sebáceas) estão dentro da derme. Os folículos pilosos e os ductos sebáceos estão diretamente em contato com o ambiente na superfície da pele. A epiderme

consiste em cinco camadas, que do interior à parte externa são o estrato germinativo (camada basal), estrato espinoso (camada espinosa), estrato granuloso (camada granulosa) e estrato córneo (EC). Devido às células do EC estarem mortas, a epiderme sem o EC é denominado geralmente a epiderme viável (Barry, 1983; Kydonieus & Berner, 1987).

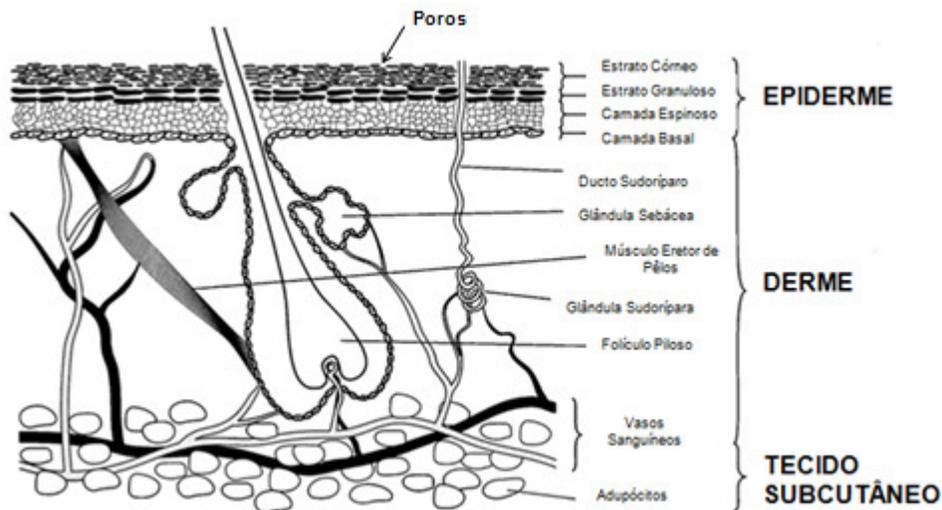


Figura 7 – Representação esquemática de uma seção transversal da pele humana, adaptado de Williams (2003).

O EC é considerado como a barreira limitante na permeação transdermal da maioria das moléculas (Barry, 1983). A estrutura do EC é descrito frequentemente como um arranjo de tijolos e cimento, onde os corneócitos ricos em queratina (tijolos) são encaixados na matriz intracelular rica em lipídio (cimento) organizados em camadas lamelares. Dessa organização, resultam poros muito pequenos entre as células, da ordem de 30 nm, as quais dificultam a difusão dos ativos (Michaels *et al.*, 1975). Este tem a propriedade de reter na sua estrutura substâncias ativas, exercendo um “efeito reservatório” e a liberação progressiva desta reserva conduz à efeitos prolongados, o que é favorável às ações locais. Numerosas substâncias podem assim se acumular na pele em diferentes níveis (Zatz, 1993).

2.2.2.1. Mecanismo de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos através da pele

El Maghraby *et al.* (2006) constataram aspectos positivos ou negativos dos possíveis mecanismos de ação sugeridos para os lipossomas atuarem como sistemas de transporte de fármacos através da pele. Foram sugeridos cinco mecanismos apresentados na Figura 8.

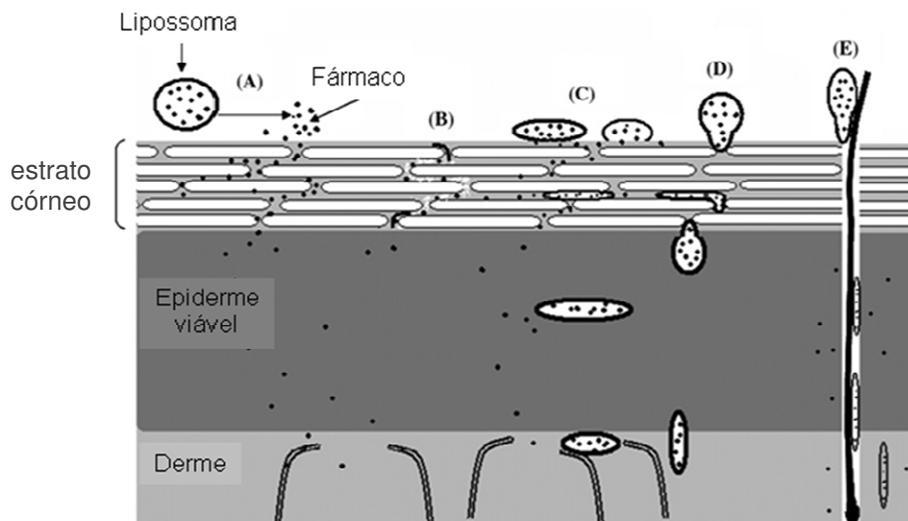


Figura 8 – Possíveis mecanismos de ação dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos na pele. (A) mecanismo do fármaco livre, (B) mecanismo de penetração aumentada dos componentes dos lipossomas, (C) mecanismo de adsorção das vesículas e/ou fusão com o estrato córneo, (D) mecanismo de permeação das vesículas intactas e (E) mecanismo de permeação através do folículo piloso, adaptado de EL Maghraby *et al.* (2008).

No primeiro mecanismo, o fármaco permeia a pele mesmo após a ruptura da vesícula (Ganesan *et al.*, 1984), o papel deste processo no transporte transdermal do estradiol foi considerado como insignificante. O segundo mecanismo foi definido como penetração melhorada, Kato *et al.* (1987) concluíram primeiramente que a lecitina aumenta o transporte transdérmico abaixando a barreira da permeabilidade da pele. Kirjavainen *et al.* (1996) revelaram que, dependendo da composição, as vesículas podem produzir um efeito aumentado, pois os componentes lipídicos podem penetrar profundamente no SC ou podem

fundir e misturar-se com os lipídios da pele, afrouxando sua estrutura. Isto indicou claramente que fosfolipídios têm ação direta na barreira da permeabilidade do SC (Yokomizo & Sagitani, 1996).

No terceiro mecanismo é apresentada a adsorção da vesícula e/ou fusão com o estrato córneo, de acordo com este mecanismo as vesículas podem se fixar na superfície do estrato córneo com transferência subsequente do fármaco diretamente das vesículas à pele, ou as vesículas podem fundir e misturar-se com a matriz lipídica do estrato córneo, com crescente divisão do fármaco pela pele. A interação dos lipossomas com a pele humana foi revista e concluiu-se que podem ser administrados através da pele, mas não podem penetrar no estrato córneo intacto, em vez disso, dissolvem e dão forma a uma unidade de estrutura membranar (Schaller & Korting, 1996). Igualmente sugeriu-se que o componente principal dos lipossomas, o fosfolipídio, aumenta a continuidade da matriz lipídica da pele e facilita assim o movimento de moléculas lipofílicas (Frost & Horwitz, 1982).

No quarto mecanismo é apresentada a permeação na pele de vesículas intactas, a hidrofobicidade do fosfolipídio conduz à xerofobia (tendência a evitar arredores secos). Para que as vesículas permaneçam inchadas ao máximo, seguem a inclinação local da hidratação, movendo-se para os estratos mais profundos da pele (Cevc & Blume, 1992; Cevc *et al.*, 1995). O processo de penetração de vesículas na pele foi atribuído a deformabilidade elevada destas vesículas especializadas, que resulta da acumulação das moléculas do tensoativo no local do esforço elevado devido a sua propensão elevada para as estruturas extremamente curvadas.

No quinto mecanismo, a permeação ocorre através do folículo piloso, a aplicação oclusiva ou a hidratação intensiva da pele são supostamente prejudiciais para o transporte transdérmico de fármacos através de vesículas ultradeformáveis. Este efeito foi atribuído à inibição da inclinação transdermal da hidratação, que é acreditado para ser a força motriz para a penetração de vesículas na pele (Cevc *et al.*, 1995). Outra explanação possível foi observada em um estudo com cobaias calvas e peludas, o depósito no SC foi mais elevado em cobaias peludas,

concluindo-se que a permeação se dá principalmente ao longo da bainha do cabelo (Schramlová *et al.*, 1997).

Os lipossomas oferecem um valor potencial cutâneo em transporte transdérmico de fármacos e os avanços e as modificações recentes aparecem para aumentar o potencial terapêutico.

Alguns parâmetros devem ser levados em consideração quando se formula uma aplicação tópica com lipossomas: composição química, propriedades físicas, estabilidade química e física, local de aprisionamento da substância ativa, capacidade de armazenamento, homogeneidade, compatibilidade com outros excipientes, efeito cosmético, tolerância, comparação com formulações clássicas e demonstração da eficácia.

2.3. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença não contagiosa causada por parasitas que invadem e se reproduzem dentro das células que fazem parte do sistema imunológico (macrófago) da pessoa infectada. Pode acometer pele, vísceras ou áreas mucocutâneas, variando de acordo com área geográfica, diferentes espécies de *Leishmania* e resposta do hospedeiro (Amin & Manisali, 2000). Essa doença é prevalente nos cinco continentes, sendo endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento, ameaçando 350 milhões de homens, mulheres e crianças com uma prevalência mundial de 12 milhões de casos. Segundo dados da Organização Mundial da saúde – OMS (2002), o número estimado de mortes anuais chega a 59.000 casos. Como a notificação compulsória é obrigatória em somente 32 dos 88 países afetados, um número considerável de casos não é notificado. Dos 1,5 – 2,0 milhões de novos casos estimados que ocorrerem anualmente, somente 600.000 são oficialmente declarados. Segundo Rath *et al.* (2003), em 1993, a OMS considerou a leishmaniose como a segunda doença de importância pública, causada por protozoário. Conforme citado por Frézard *et al.* (2005), estimava-se em 2005, a ocorrência de cerca de 30.000 novos casos anuais da doença.

2.3.1. Epidemiologia e formas

A associação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo protozoário *Leishmania* caracteriza a co-infecção *Leishmania-HIV*. Essa co-infecção é considerada doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Um aumento expressivo do número de casos de co-infecção tem sido observado desde o início da década de 1990, e há projeções de seu crescimento contínuo devido à superposição geográfica das duas infecções, como consequência da urbanização das leishmanioses e da interiorização da infecção pelo HIV. A situação é particularmente preocupante no sudoeste da Europa, no sul da Ásia, na África subsariana e na América do Sul, onde o Brasil surge como o país que mais requer atenção devido ao grande número de casos das duas infecções. Mais de 2.000 casos de co-infecção em 34 países foram notificados à OMS até 2001, a maioria na Espanha, na Itália, na França e em Portugal (Brasil, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, dois aspectos chamam a atenção, principalmente nos países da região do Mediterrâneo: a maior frequência de infecção por *Leishmania spp.* entre os pacientes infectados pelo HIV, comparada à ocorrência na população geral, e a predominância da infecção entre usuários de drogas injetáveis, e o compartilhamento de agulhas é o fator de risco responsável pela transmissão das duas infecções. Esta nova modalidade de transmissão da leishmaniose foi denominada ciclo antroponótico artificial epidêmico (Brasil, 2004).

No Brasil existem duas formas de leishmaniose, denominadas leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania chagasi* e leishmaniose tegumentar americana (LTA), causada pela *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Costa *et al.*, 2003).

A LV apresenta maior índice de letalidade, chegando a 100% dos casos não tratados clinicamente (Frézard *et al.*, 2005). A LTA é uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença e dificuldade terapêutica, assim como pela capacidade de desenvolver lesões que conduzem a quadros clínicos desfigurantes no homem, bem como pelo

envolvimento psicossocial do paciente, com reflexos no campo social e econômico (Brasil, 2000b; Gontijo & Carvalho, 2003).

Por leishmaniose tegumentar (LT), entende-se um conjunto de enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, que acometem a pele e/ou mucosas do homem, e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais. A LT é uma infecção intracelular causada mais frequentemente pela *Leishmania (Vianna) brazilienses*. A transmissão é realizada entre animais e o homem pela picada de insetos fêmea (vetor), classificados como flebótomos, de diversas espécies (*Diptera*, *Psychodidae*, *Phlebotominae*), dos gêneros *Lutzomia* e *Psychodopygus*. A infecção caracteriza-se pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme e das mucosas do hospedeiro vertebrado (monócitos, histiócitos e macrófagos) (Costa *et al.*, 2003; Brasil, 2006).

As manifestações clínicas da LTA incluem as formas: cutânea e mucocutânea. A forma cutânea da doença, embora não mate, causa lesões na pele e nas mucosas, às vezes deformantes, e que também requer atenção e cuidados (Brasil, 2000b). A leishmaniose cutânea é uma doença infecto-parasitária que acomete o homem, causada por várias espécies de *leishmania*. É uma doença definida por lesões exclusivamente na pele, no ponto de inoculação de parasitas pró-mastigotas (Gontijo & Carvalho, 2003).

A LTA é fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem quando ele entra em contato com os focos zoonóticos. Neste caso o maior número de acometidos é de adultos jovens, do sexo masculino, que desempenham atividades de risco (garimpo, desmatamento, atividades extrativistas). Tem sido assinalada em praticamente todos os estados do Brasil, constituindo assim uma das afecções dermatológicas que merece grande atenção (Brasil, 2000a; b; 2003; Basano & Camargo, 2004; Opas, 2005).

Transformações no meio ambiente, desmatamentos e a migração do homem da área rural para as periferias da cidade, em condições precárias de habitação e saneamento, são alguns dos fatores que devem ter contribuído para a

expansão da ocorrência da doença, inclusive com mudança do perfil etário da população atingida (Brasil, 2000a; 2003; Opas, 2005; Sucen, 2005).

No Brasil, a leishmaniose apresenta ampla distribuição por todas as regiões geográficas (Furtado & Vieira, 1982). Ao analisar-se a evolução da LTA, observa-se uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 estados e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia (Brasil, 2006).

A partir da década de 90, o Ministério da Saúde (MS) notificou uma média anual de 32 mil novos casos de LTA. Analisando-se os dados pertinentes em 2003, verificou-se a seguinte situação: a Região Norte notificou aproximadamente 45% dos casos, predominando os estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a Região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; a Região Centro-Oeste, 15% dos casos, com maior frequência em Mato Grosso; a Região Sudeste, 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais; e a Região Sul, 3,0%, destacando-se o Paraná (Figura 9) (Brasil, 2006).

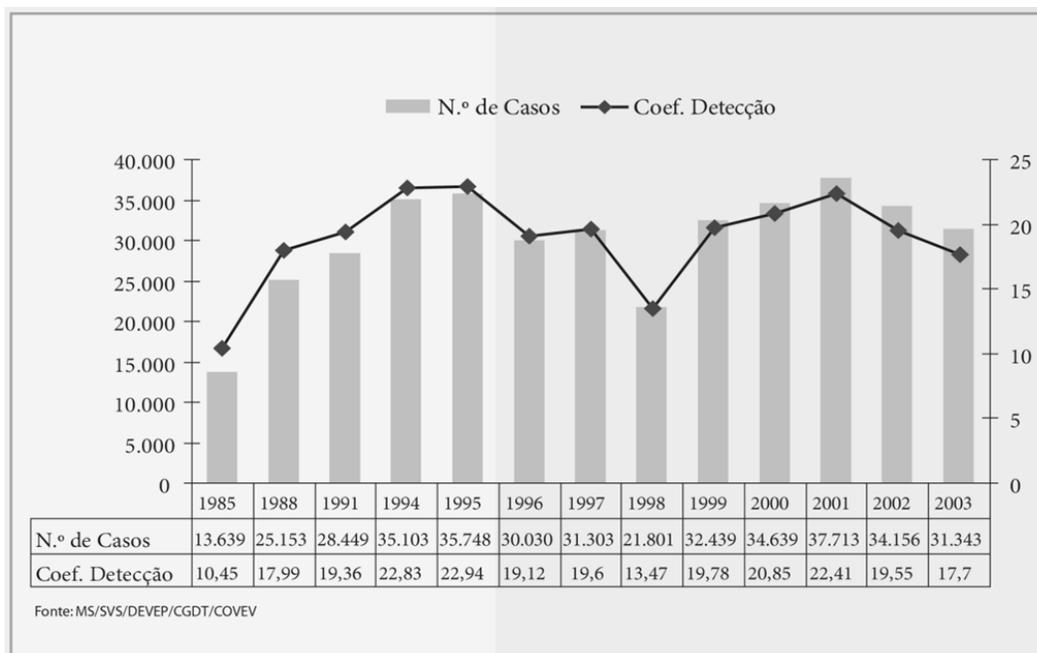


Figura 9 – Número de casos e coeficientes anuais de detecção de casos autóctones de LTA no Brasil – 1985 a 2003.

Dados recentes de casos de LTA são apresentados na Figura 10 para as grandes regiões e unidades federadas e na Figura 11, temos o coeficiente de detecção de casos de LTA por 100.000 habitantes.

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Região Norte	7.318	9.359	9.720	9.739	11.306	13.117	9.987	11.058	6.078	9.129	11.140	8.107	10.207	13.508	13.125	10.679	8.833	9.890	8.777
Roraima	1.346	2.113	2.220	2.622	2.249	2.695	1.738	1.485	1.317	1.737	1.421	1.563	1.812	1.960	2.181	1.663	1.204	971	950
Acre	59	252	403	563	372	365	490	413	280	490	903	717	1.076	1.385	1.532	1.356	1.124	913	966
Amapá	1733	2590	3424	1982	741	1557	988	2.290	715	1.744	2.153	2.130	3.816	2.212	1.957	1.554	2.219	1.823	1.823
Roraima	170	507	492	605	470	251	303	308	244	148	382	454	451	303	160	286	265	340	360
Pará	3269	3196	2226	2543	5748	7094	5042	5.038	2.177	5.051	5.565	2.521	3.741	4.862	5.324	4.345	3.554	4.305	3.616
Amapá	185	394	475	643	865	645	563	902	862	884	562	52	377	665	1162	580	566	667	640
Tocantins	556	302	470	581	831	735	863	642	453	821	563	647	620	607	554	493	517	475	393
Região Nordeste	12.428	12.020	7.140	8.218	14.426	13.887	11.303	11.868	8.455	9.112	13.078	11.149	9.373	7.985	7.863	8.112	6.169	5.925	5.795
Maranhão	3109	3626	2027	2688	6262	4725	3794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.658	4.364	3.777	3.072	3.395	2.174	2.335	1.666
Piauí	249	304	161	72	56	40	96	102	96	106	95	164	151	126	117	257	152	108	77
Ceará	3848	2862	1358	1463	1928	4262	2793	2787	1490	1372	3043	2543	2123	1329	2064	1977	1006	935	667
Rio Grande do Norte	20	6	13	4	15	42	49	26	13	11	8	5	8	13	10	7	6	7	7
Paraíba	85	165	342	273	264	196	173	233	113	128	177	50	68	56	74	68	46	60	45
Pernambuco	680	474	378	436	806	891	714	667	643	979	1.149	518	556	668	719	337	413	446	365
Alagoas	28	54	53	71	224	114	81	144	72	156	258	88	80	97	65	57	33	111	96
Sergipe	54	50	24	46	46	52	19	47	34	30	58	93	61	7	11	6	4	12	12
Bahia	4355	4159	2797	2976	4836	3592	3591	3.205	3.626	3.323	3.799	2.027	1.965	2.018	1.732	2.000	2.332	1.920	2.860
Região Sudeste	2.347	3.396	3.854	4.771	3.763	2.605	2.369	2.294	2.945	3.983	2.938	2.112	2.894	3.262	2.540	2.809	2.868	1.898	1.615
Minas Gerais	1338	2134	2504	2547	2040	1574	1504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.176	1.610	1.767	1.507	1.802	1.855	1.322	1.149
Espírito Santo	670	728	722	883	490	307	244	404	646	884	548	351	209	294	146	193	241	109	70
Rio de Janeiro	227	319	269	496	396	241	282	302	186	269	250	169	289	226	209	317	283	119	59
São Paulo	112	205	369	835	837	483	339	143	140	129	266	476	786	1.025	678	497	489	348	337
Região Sul	192	139	650	819	1.361	798	617	430	455	468	683	568	943	932	607	541	573	514	625
Pernambuco	192	139	650	819	1.361	794	616	428	453	457	650	553	909	888	579	444	409	438	540
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	10	14	28	17	84	158	67	79
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	5	20	15	11	13	6	9	6
Região Centro-Oeste	2.468	3.546	3.264	3.907	4.247	5.343	4.721	4.640	2.961	6.384	4.605	4.629	4.839	4.980	4.480	4.388	3.852	3.095	2.730
Mato Grosso do Sul	221	163	304	215	243	568	178	433	256	338	158	372	301	235	192	139	116	99	122
Mato Grosso	2021	3000	2682	3046	3734	4492	4195	3.779	2.283	5.504	3.921	3.816	4.067	4.189	3.752	3.639	3.181	2.715	2.264
Goiás	226	181	277	345	270	281	348	414	440	532	525	411	441	500	458	578	505	246	317
Distrito Federal	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	30	30	56	58	32	50	35	27
UF ignorada	1.033	1.013	887	1.299	1.106	71	105	157	142	156	102	85	0
Brasil	24.753	28.450	24.668	27.454	35.103	35.748	30.030	31.303	21.801	30.367	33.720	26.636	28.361	30.814	28.737	26.695	22.397	21.407	19.542

Fonte: DEVEP/SVS/SMS
*Dados parciais. Base atualizada em 26/03/08.

Figura 10 – Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, dividido em Grandes Regiões (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) e Unidades Federadas, no período de 1990 a 2008.

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Região Norte	75,0	93,0	93,9	91,6	103,7	117,6	88,5	97,9	51,2	92,3	86,8	61,2	75,6	90,0	93,3	72,7	58,8	64,5	59,0
Roraima	124,1	166,0	186,4	227,3	174,2	196,6	141,2	119,0	103,2	134,4	107,8	111,0	126,6	136,0	147,4	108,7	77,1	61,1	63,6
Acre	14,4	60,2	94,1	128,7	83,3	86,2	101,3	85,4	54,5	93,1	166,6	124,8	183,3	200,6	249,4	202,5	163,7	129,8	146,3
Amazonas	84,4	122,6	158,2	69,4	32,7	67,1	41,4	95,6	28,4	80,8	66,0	74,2	71,9	125,9	71,4	60,5	48,9	65,5	54,6
Roraima	82,1	231,7	213,8	250,9	186,7	95,7	122,6	124,6	93,6	55,1	128,9	134,6	130,0	84,8	43,5	71,6	79,7	81,9	87,2
Pará	67,6	64,4	43,9	48,8	107,8	129,7	91,5	91,4	37,7	86,2	92,7	39,8	58,0	73,9	79,5	62,3	50,0	59,4	49,4
Amapá	65,9	135,7	158,5	208,2	281,8	197,7	148,4	237,7	212,0	201,8	129,0	10,4	73,0	103,8	210,1	97,5	96,6	104,8	104,4
Tocantins	62,0	32,9	49,7	59,9	83,9	73,1	82,3	61,2	40,9	72,3	48,4	54,6	51,4	49,3	44,2	37,8	38,8	35,0	30,7
Região Nordeste	29,7	28,2	16,5	18,3	32,5	30,9	25,3	28,2	18,5	19,0	28,0	23,1	19,2	16,2	15,8	16,9	12,0	11,4	10,9
Maranhão	64,0	79,5	40,4	56,4	121,3	96,3	72,7	88,7	44,0	55,7	81,9	98,7	75,2	64,3	51,7	55,6	35,2	37,3	26,4
Piauí	9,8	12,5	6,1	2,7	2,1	1,5	3,6	3,8	3,5	3,8	3,5	5,7	5,2	4,3	4,0	8,5	5,0	3,5	2,5
Ceará	61,2	44,9	21,0	22,3	29,1	63,5	41,0	40,9	21,2	17,8	42,3	33,7	27,7	17,1	26,3	24,4	12,2	11,2	7,9
Rio Grande do Norte	0,8	0,3	0,0	0,5	0,2	0,6	1,6	1,9	1,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
Paraíba	2,7	5,2	10,6	8,3	8,0	5,9	5,2	7,0	3,4	1,2	5,2	1,4	1,9	1,6	2,1	1,9	1,3	1,6	1,2
Pernambuco	9,6	6,6	5,2	6,0	10,9	12,0	9,7	9,0	8,5	11,6	15,0	6,5	6,9	6,6	8,7	4,6	4,9	5,2	4,2
Alagoas	1,1	2,1	2,1	2,7	8,5	4,2	3,1	5,5	2,7	5,8	9,4	3,1	2,8	3,3	2,2	1,9	1,1	3,6	3,1
Sergipe	3,7	3,3	1,6	3,0	2,9	3,2	1,2	2,9	2,0	1,8	3,3	5,1	3,3	0,9	0,4	0,6	0,3	0,2	0,6
Bahia	37,3	35,0	23,1	24,2	38,8	28,4	28,6	25,2	28,2	25,7	28,9	45,3	14,7	15,0	12,8	14,5	16,7	13,6	19,7
Região Sudeste	3,8	5,4	6,1	7,4	5,8	3,9	3,5	3,4	4,3	4,8	4,2	2,9	3,9	4,3	3,3	3,6	3,6	2,4	2,0
Minas Gerais	8,6	13,5	15,7	15,8	12,5	9,5	9,0	8,5	11,5	12,1	10,7	6,2	8,8	9,5	8,0	9,4	9,5	6,7	5,8
Espírito Santo	26,2	27,9	27,2	33,1	17,9	11,0	8,7	14,2	22,3	30,1	18,4	11,1	6,5	7,2	4,4	5,7	7,0	3,1	2,0
Rio de Janeiro	1,8	2,5	2,1	3,8	3,0	1,8	2,1	2,3	1,4	2,0	1,8	1,2	2,0	1,5	1,4	2,1	1,8	0,8	0,4
São Paulo	0,4	0,7	1,1	2,6	2,5	1,4	1,0	0,4	0,4	0,4	0,7	1,3	2,1	2,6	1,7	1,2	1,2	0,8	0,8
Região Sul	0,9	0,6	3,1	3,6	5,9	3,4	2,6	1,8	1,9	1,9	3,4	2,2	3,7	3,6	2,3	2,0	2,1	1,9	2,3
Paraná	2,3	1,6	8,1	9,5	15,7	9,1	6,8	4,6	5,0	4,9	9,0	5,7	9,3	8,9	5,8	4,3	3,9	4,2	5,1
Santa Catarina	*	*	*	*	*	*	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,3	0,5	0,3	1,4	2,7	1,1	1,3
Rio Grande do Sul	*	*	*	*	*	*	0,0	*	*	*	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Região Centro-Oeste	26,7	37,7	33,6	39,6	42,3	52,0	45,1	44,2	27,1	50,5	49,2	38,9	40,0	40,4	35,6	33,7	29,0	22,9	19,9
Mato Grosso do Sul	12,6	9,3	16,7	11,6	12,9	26,7	9,2	22,5	12,8	11,1	7,7	17,6	14,1	10,8	8,7	6,1	5,0	4,2	5,2
Mato Grosso	103,1	158,2	127,2	153,6	166,2	194,2	187,6	169,0	97,9	206,1	162,1	149,0	156,1	158,0	139,1	129,8	111,3	93,3	76,5
Goiás	5,7	4,5	6,8	8,3	6,4	6,5	7,7	9,2	9,3	11,0	19,6	8,0	8,5	9,4	8,5	10,3	8,8	4,2	5,4
Distrito Federal	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,8	0,1	0,1	0,5	0,0	1,4	1,4	2,6	2,6	1,4	2,1	1,4	1,1
Brasil	17,4	19,4	16,5	18,1	22,8	22,9	19,0	19,6	13,5	19,8	20,3	15,5	16,2	17,4	16,0	14,5	12,0	11,3	10,3

Fonte: CENEPI/SVS/MS
*Dados sujeitos a revisão.

Figura 11 – Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes no Brasil, dividido em Grandes Regiões (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste) e Unidades Federadas, no período de 1990 a 2008.

2.3.2. Transmissão

No ciclo epidemiológico da LTA, o inseto (flebotomíneo) representa o elo entre os reservatórios e o homem, que se comporta apenas como hospedeiro acidental de *Leishmania*, não parecendo assumir papel relevante na transmissão da doença. Os hospedeiros vertebrados (reservatórios) são os responsáveis pela transmissão do parasito durante o repasto sanguíneo da fêmea (Ruppert & Barnes, 1994).

A Figura 12 representa esquematicamente a forma como as leishmanioses são transmitidas aos hospedeiros vertebrados. O vetor é proveniente de dípteros da família *Psychodidae*, que são hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e espécie *Lutzomyia longipalpis*, comumente chamados de flebotomíneos e popularmente conhecidos por mosquito palha, birigui ou cangalhinha (Oms, 2005).

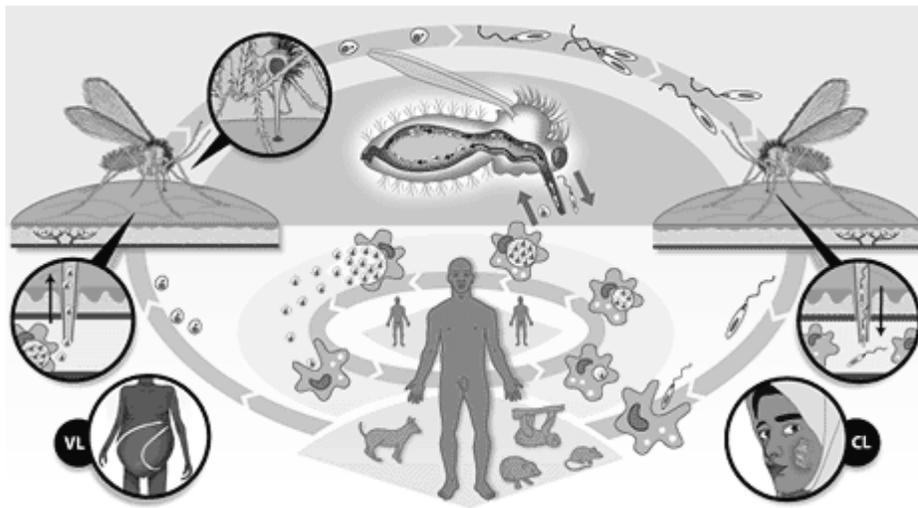


Figura 12 – Representação esquemática do ciclo de transmissão da leishmaniose, adaptado da OMS (2005).

O ciclo de infecção envolve a fase amastigota, que ocorre na forma de parasitas presentes em hospedeiros, como humanos, cães e roedores. Os parasitas invadem macrófagos e outras células reticuloendoteliais, multiplicam-se e causam ruptura da membrana celular, liberando-se na corrente sanguínea (Amin & Manisali, 2000).

Os insetos vetores (somente fêmeas são hematófagas) infectam-se ao picar o animal portador da doença (reservatório infectado), aspirando macrófagos parasitados contendo amastigotas (formas aflageladas) do protozoário, livres no sangue ou tecidos, que rapidamente se transformam em formas promastigotas (formas flageladas) no intestino dos vetores. Essas formas dividem-se ativamente e no novo repasto (ao picar o homem) o inseto regurgita o parasita na pele do hospedeiro. As promastigotas são as formas infectantes do parasito que interagem com as células do SFM (fagocitados por macrófagos), perdem o flagelo, no interior dos quais se transformam em amastigotas. Estes se multiplicam livremente no compartimento ácido dos fagolisossomas e escapam dos sistemas de defesa do hospedeiro (Frézard *et al.*, 2005). A multiplicação dos amastigotas ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófagos de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea e visceral (Brasil, 2000a; 2003; Rath *et al.*, 2003).

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Vários setores do sistema imunológico são ativados, mas a resposta imune celular, específica para a *Leishmania*, tem papel crucial no controle final da infecção (Brasil, 2006).

Inicialmente, a presença das formas promastigotas inoculadas desencadeia, no local da inoculação, uma resposta inflamatória aguda inespecífica da qual participam células e fatores séricos – células *natural killer* (NK), polimorfonucleares (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e sistema complemento. Assim, a maioria dos promastigotas inoculados, que ainda estão no ambiente extracelular, é rapidamente destruída. A importância das células NK no controle da infecção deve-se tanto a sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de interferon-gama (IFN- γ), o que determina um potencial para desenvolver resposta imune celular adequada, induzindo a resistência já na primeira semana de infecção (Brasil, 2006).

Considerando-se que a *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, a ativação do sistema complemento pode beneficiá-lo, pois ao serem gerados fragmentos da cascata (C3 e C3bi) que se ligam aos receptores dos macrófagos

(CR1 e CR3) e também se depositam na parede do parasito, tem-se facilitada sua fagocitose. Além disso, sua entrada, utilizando esses receptores, promove baixo metabolismo oxidativo no macrófago, o que favorece a continuidade do seu ciclo biológico (Descoteaux & Turco, 2002).

A adesão de *Leishmania* à membrana do macrófago é pré-requisito para sua fagocitose. Diferentes moléculas integram a membrana de superfície das *leishmanias*, tais como glicoproteínas e glicolipídios, fundamentais para sua interação com os macrófagos. A pequena fração do inóculo infectante que consegue internalizar-se em macrófagos, a partir da ligação direta dessas moléculas com receptores de membrana das células, determina uma série de reações bioquímicas que podem levar a ativação ou a inibição das funções da célula hospedeira. Essa ativação caracteriza-se pela deflagração de processos oxidativos (sistema microbocida dependente de oxigênio) e produção de óxido nítrico (Descoteaux & Turco, 2002).

À medida que ocorre o processo de fagocitose, os lisossomas das células fundem-se aos vacúolos parasitóforos formados, resultando em uma modificação do seu microambiente, que induz à transformação da forma promastigota para amastigota, facilitando sua sobrevivência, pois, sob essa nova forma, o parasito apresenta-se mais resistente e desencadeia menor resposta oxidativa da célula hospedeira (Brasil, 2006).

Para dar início à resposta imune específica, células de Langerhans transportam os parasitos e seus antígenos aos linfônodos regionais, visando a apresentar o antígeno às células T CD4+ que, ao liberarem citocinas, regulam o potencial microbocida dos macrófagos - ressalte-se que a produção de IFN- γ parece ser o principal fator de ativação macrofágica (Brasil, 2006).

O IFN- γ tem papel importante na defesa contra microrganismos intracelulares como a *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). O TNF- α , citocina produzida principalmente por macrófagos ativados, também é responsável pela ativação policlonal de células B. Em decorrência dessa ativação, há considerável indução da resposta humoral com produção de anticorpos anti-

Leishmania que participam, na interação inicial do parasito, com elementos inespecíficos da resposta inflamatória (Brasil, 2006).

A seqüência de eventos que ocorrem a partir da inoculação do parasito no organismo do hospedeiro pode ser observada na Figura 13.

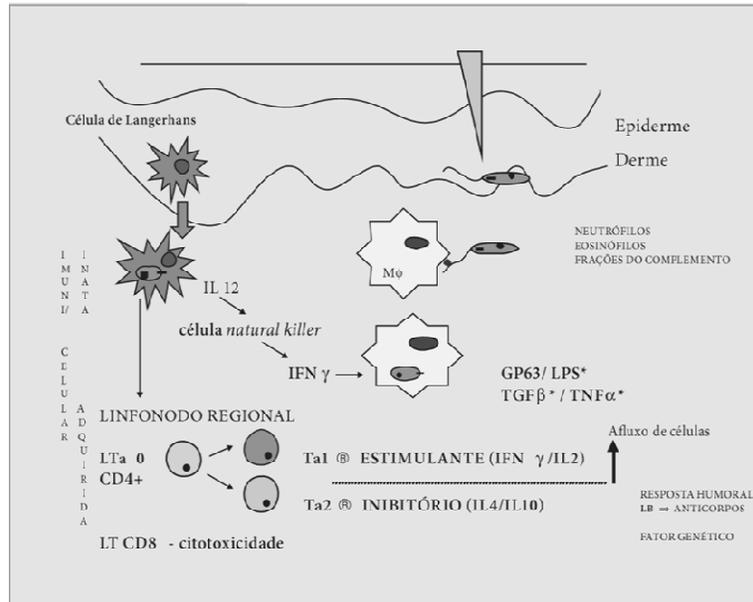


Figura 13 – Sequência de eventos desencadeados após a inoculação do parasito no organismo hospedeiro, adaptado de Brasil (2006).

Deve-se destacar que o parasito apresenta características próprias que permitem sua evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ainda no tubo digestivo do inseto-vetor, durante seu ciclo de crescimento, as formas promastigotas evoluem de um estágio não-infectivo (fase logarítmica de crescimento) para outro altamente infectivo (fase estacionária, metacíclica). Durante a fase de metaciclogênese, ocorre a expressão de moléculas de superfície com características modificadas, que, quando da interação com a célula do hospedeiro, impedem a deposição de complexos do sistema complemento promotores da lise celular, além de interferirem na ativação de componentes terminais do complemento, protegendo o parasito (Brasil, 2006).

As moléculas que compõem a superfície do parasito também interferem na atividade do macrófago - a gp63 degrada enzimas lisossômicas e o LPG inibe a geração de metabólitos oxidativos e a ação de enzimas lisossomais, eliminando os

radicais de oxigênio. A fosfatase ácida, diretamente relacionada com a virulência do parasito, tem a capacidade de bloquear a produção de radicais de oxigênio pelos macrófagos. Os parasitos ainda têm a seu favor a menor ação oxidativa dos macrófagos presentes no local de penetração, provavelmente decorrente da menor temperatura da pele (30° a 35°C) (Brasil, 2006).

O período de incubação da doença no homem é de 10 dias a três meses e, em média de dois meses, podendo apresentar períodos mais curtos de duas semanas e mais longos de até dois anos (Brasil, 2000b; Gontijo & Carvalho, 2003).

2.3.3. Hospedeiro

No Brasil, o mais importante reservatório animal é o cão e a raposa. Estes animais agem como mantenedores do ciclo da doença. O cão tem sido o grande responsável pela (re) urbanização da doença e aparece como hospedeiro vertebrado tanto das formas cutânea como visceral. Apresentam intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do inseto, e, por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia de transmissão (Brasil, 2000a; 2003; Frézard *et al.*, 2005).

2.4. Fármacos para tratamento da leishmaniose

A leishmaniose tegumentar e visceral são doenças crônicas desfigurantes ou fatais que estão em franca expansão em várias partes do mundo. O controle da doença depende primariamente da utilização de quimioterápicos, os quais estão disponíveis em número limitado e apresentam várias restrições.

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peri-domiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial. Entretanto, tais fármacos apresentam série de problemas, como resistência do parasita (Grogil *et al.*, 1992) e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia deles. Além disso, todos os fármacos disponíveis

atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente. Infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Amato, 1998).

2.4.1. Quimioterapia convencional

Desde a década de 40, os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) permanecem como drogas de primeira escolha no tratamento da LTA, estando disponibilizadas comercialmente duas formulações: o antimoniato-N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina - Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]). No Brasil, o MS distribui gratuitamente o antimoniato Glucantime[®] na rede pública de saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial da Saúde – OMS (Brasil, 2006).

O tratamento de primeira escolha na maioria dos países afetados, inclusive o Brasil, ainda se baseia em sais de antimônio injetáveis como o Glucantime[®] e Pentostan[®]. Além da ineficácia em indivíduos imunossuprimidos, estes compostos devem ser administrados em séries de injeções intramusculares ou endovenosas diárias, levando muitas vezes à descontinuidade do tratamento por parte dos pacientes, principalmente crianças (Rath *et al.*, 2003).

Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da *leishmania*, através de glicólise e beta-oxidação que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários (Berman *et al.*, 1985). Estes apresentam potencial de toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, devendo ser utilizados com cautela e sob monitoração clínica e laboratorial, em pacientes com cardiopatia e hepatopatia. De acordo com a forma clínica e a resposta terapêutica esperada, o esquema de tratamento pode ser modificado no tocante à dose e à duração. O principal efeito adverso do antimoniato N-metil-glucamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Esse efeito tem dose e tempo dependentes e se traduz por distúrbios de repolarização. Outros efeitos indesejados incluem mialgias, artralgias, adinamia, anorexia, cefaléia, dor no local da aplicação (intramuscular) e

aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária (Brasil, 2006).

A resposta terapêutica aos esquemas propostos pela OMS e MS, utilizando antimoniais pentavalentes, pode ser inicialmente satisfatória. Entretanto, as recidivas costumam ser frequentes, evoluindo com caráter refratário a novas séries de tratamento com antimoniais: esquemas terapêuticos alternativos, utilizando anfotericina B convencional ou lipossomal (de custo elevado), como fármaco de segunda escolha, e principalmente para nefropatas e gestantes; e pentamidinas (isotonato e mesilato), ambos para uso injetável; associação de intérferon γ + antimoniais pentavalentes; sulfato de aminosidina; associação de alopurinol + antimoniais pentavalentes; miltefosina para uso oral, e a paramomicina para uso tópico, dentre outros, tem sido utilizados com resultados variáveis (Brasil, 2006). Estes também apresentam várias inconveniências, como nefrotoxicidade, altos custos, indução de diabetes, teratogenicidade e indução de resistência a drogas (Croft & Yardley, 2002). O desenvolvimento de novos medicamentos torna-se, portanto, uma prioridade para o tratamento das leishmanioses, principalmente aqueles ativos por via tópica ou oral.

Os primeiros relatos da eficiência da anfotericina B no tratamento da LTA foram demonstrados no início da década de 60. A anfotericina B, um antibiótico poliênico, interage especificamente com o ergosterol, esteróide da membrana celular das *leishmanias*, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (Berman, 1997). Formulações lipídicas da anfotericina B têm sido utilizadas esporadicamente no tratamento da LTA, seja em pacientes imunocompetentes ou com alguma forma de imunossupressão, incluindo indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (Amato *et al.*, 2000; Amato *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005).

A pentamidina provavelmente age interferindo na síntese do DNA, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (Croft & Brazil, 1982). A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídico, usado no tratamento da leishmaniose, apresenta nefro e ototoxicidade. Na leishmania, afeta a atividade mitocondrial. Administrado por via

parenteral tem mostrado eficácia tanto isolado quanto combinado ao Sb^{5+} , também é utilizado por via tópica, na forma de pomada (Soto *et al.*, 1994).

Tratamentos alternativos aos parenterais têm sido propostos nos últimos anos para a LTA utilizando a via oral, tópica e intralesional. A miltefosina, um alquil-lisofosfolípido, antiproliferativo, foi o primeiro fármaco de uso oral usado no tratamento da leishmaniose. Os mecanismos de ação da miltefosina contra a leishmânia ainda não são bem entendidos. Possivelmente inibem o mecanismo éster-remodelação, na síntese de fosfatidilcolina, na transdução de sinal e homeostase do cálcio (Croft *et al.*, 2003). Sabe-se que este fármaco é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita (Soto *et al.*, 2004).

O alopurinol, também administrado por via oral, é um substrato para várias enzimas da via purina e incorpora-se no ácido nucléico do parasito. Inibe a xantina oxidase e a produção de reativos do oxigênio úteis na eliminação dos parasitos, o que explica a pouca eficácia quando usado isolado, vem sendo explorado desde 1982. Tem ação sinérgica quando associado aos Sb^{5+} (Sampaio & Marsden, 1997).

A quercetina, um flavonóide, administrado por via oral, tem demonstrado atividade antileishmanial em estudos a partir do extrato aquoso da planta *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) (Da Silva *et al.*, 1995; Torres-Santos *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2008). Seu modo de ação envolve a ativação de mecanismos oxidativos do nitrogênio pela célula hospedeira (Da Silva *et al.*, 1999).

Os antifúngicos representados pelos imidazóis, que incluem o cetoconazol, itraconazol e fluconazol e as alilaminas (terbinafina). Exercem sua ação bloqueando a síntese de ergosterol. A *leishmania* lembra um fungo quanto à síntese de ergosterol na membrana celular, enquanto os mamíferos têm colesterol. Os azóis inibem a 14- α -demetilase, enzima-chave na síntese de esterol (Lima *et al.*, 2007).

A imidazoquinolina, aprovada para tratamento de verrugas genitais, estimula os linfócitos T helper 1 com aumento da produção de TNF_α , IFN_β e IL-12 (resposta Th1). *In vitro* estimula a produção de NO pelo macrófago com

diminuição do número de parasitos, apresentando atividade antileishmania via ativação macrofágica em modelos experimentais. Administrada por via tópica, na forma de creme (Lima *et al.*, 2007).

Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos foram evidenciadas falhas terapêuticas e, conseqüente, aumento das formas resistentes dos parasitas (Rath *et al.*, 2003). O aparecimento de resistência representa outro problema sério no tratamento e um risco potencial na terapêutica das leishmanioses. Em face dessas limitações, a OMS recomenda, com incentivo inclusive a outras entidades afins como a TDR ("Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases"), a pesquisa de novos fármacos e/ou outras formas de administração dos antimoniais (Frézard *et al.*, 2005).

A resistência medicamentosa (RM) pode estar vinculada ao hospedeiro como baixa adesão ao tratamento pela toxicidade do fármaco, via parenteral, pobreza, local de residência, imunodepressão (HIV), e vinculada ao parasito como carga parasitária e variação da sensibilidade espécie-específica da *leishmania* à droga. Medidas preventivas devem ser estimuladas, contra a RM, como a aderência ao tratamento, o uso de fármacos potentes em doses e tempo adequados e a combinação de fármacos com diferentes perfis farmacocinéticos e de toxicidade. A associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação foi adotada para evitar RM em infecções, a terapia combinada deve ser especialmente considerada nos pacientes co-infectados pelo HIV (Ouellette, 2001). Fármacos com efeitos sinérgicos são representados pelo Sb^{5+} associado à paramomicina ou ao alopurinol. A primeira associação (Sb^{5+} e paramomicina) é menos atrativa pelo uso injetável, já a associação alopurinol e azol, pacientes imunodeprimidos tiveram cura prolongada (Torrus *et al.*, 1996).

2.4.2. Descoberta de novos medicamentos

Devido à resistência do parasita ao tratamento usual, e aos efeitos colaterais severos, a procura por drogas seguras e eficazes para o tratamento de leishmaniose tem sido considerada prioridade (Hermoso *et al.*, 2003).

Fármacos recém-descobertos para tratamento da leishmaniose foram promissores em modelos animais *in vivo*, os bifosfonatos (pamidronato e risedronato), licochalcona A e derivados, propilquinolinas e o posoconazol. Os bifosfonatos interferem com o metabolismo pirofosfato, parecendo que o alvo é a farnesil pirofosfato sintase, enzima-chave na biossíntese isoprenóide (Rodríguez *et al.*, 2002). São usados nas doenças ósseas como osteoporose e tem atividade contra leishmania em modelos experimentais (Olliaro *et al.*, 2002; Yardley *et al.*, 2002).

Na busca de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, as chalconas (flavonóides) despontam como uma classe de produtos naturais bastante promissores (Yunes *et al.*, 2006). Um fármaco sintético mais ativo que o antimonial de referência, com características promissoras para desenvolvimento como novo antileishmanial, a Chalcona CH8, foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Rosendo Yunes da Universidade Federal de Santa Catarina (Boeck *et al.*, 2006). O laboratório de imunofarmacologia da UFRJ vem trabalhando com o isolamento de produtos naturais e síntese de análogos químicos a fim de identificar novos fármacos antileishmaniais biologicamente ativos. Em meados dos anos 1990, este grupo pesquisou diferentes órgãos vegetais e solventes extrativos sobre 130 espécies de plantas que foram selecionadas químico-sistematicamente para a presença de substâncias antileishmaniais seletivas. Primeiramente os extratos foram testados em macrófagos contaminados com *leishmania*. O extrato de diclorometano isolado das inflorescências da planta *Piper aduncum* *against* foi selecionado o mais ativo e menos tóxico para as células. O fracionamento guiado 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (DMC) foi isolado e identificado como componente ativo (Torres-Santos *et al.*, 1999). A atividade biológica da chalcona natural DMC 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).

A chalcona nitrogenada CH8 (Figura 14), foi sintetizada com a introdução um grupamento nitro no anel B da molécula de DMC uma molécula bastante lipofílica, é um pouco menos ativa que a DMC e o antimonial Pentostam[®] em amastigotas intracelulares, mas bem menos citotóxica que os fármacos de referência (Boeck *et*

al., 2006). Na sua forma livre a chalcona CH8, mostrou-se promissora para o modelo murino de leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*) (Rossi-Bergmann *et al.*, 2002). O uso da chalcona CH8 para tratamento oral mostrou-se promissor também na leishmaniose visceral, reduzindo parcialmente a carga parasitária no baço dos camundongos infectados com *Leishmania chagasi*. Apesar da inibição, ter sido parcial isso indica um grande avanço, tendo em vista que os antimoniais e a anfotericina B, que são os fármacos de primeira e segunda escolha na clínica, são inócuos por esta via (Boeck *et al.*, 2006). Neste estudo, a CH8 foi encapsulada em lipossomas para aplicação tópica. A chalcona CH8 foi sintetizada em maior escala para prover um lote único de alta pureza para utilização no projeto e doada pela Prof^a Bartira Rossi Bergmann do Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

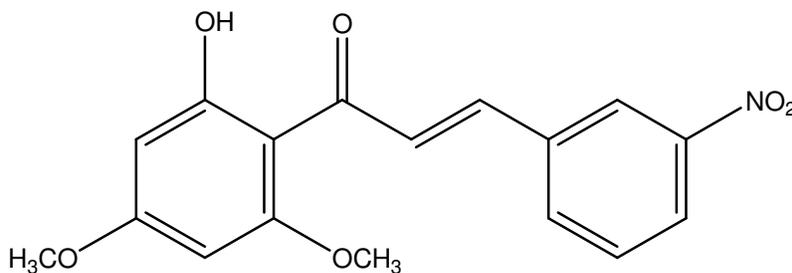


Figura 14 – Estrutura química da chalcona CH8 (3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona), adaptado de Boeck *et al.* (2006).

Com relação à terapêutica convencional da leishmaniose, muito embora o medicamento esteja geralmente disponível nas unidades de saúde, seu potencial hepato, cardio e nefrotóxico do antimonial, aliado ao seu uso parenteral exclusivo, representa um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos. A terapêutica da LTA, alicerçada nos fármacos disponíveis atualmente, representa, *per si*, um obstáculo à condução clínica adequada dos casos de LTA. Esforços devem ser efetivados no sentido de ampliar os testes clínicos com os novos fármacos promissores por via oral e fármacos de uso tópico, além de pesquisar fármacos alternativos que facilitem o tratamento da leishmaniose.

Assim, esse trabalho visa avaliar a encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas convencionais e peguillados, bem como o transporte destes

lipossomas em membranas sintéticas de nanoporos, para determinar sua elasticidade.

Faz-se necessário ressaltar que o presente trabalho faz parte de um projeto mais amplo (multidisciplinar), realizado por pesquisadores de diferentes instituições, como UFRJ e UNISO. Esse projeto além de avaliar os parâmetros acima mencionados, também teve por objetivo avaliar o transporte *ex vivo* dos lipossomas, através de pele de orelha de porco, em célula de Franz e o efeito *in vivo* da aplicação dos lipossomas em pata de camundongos infectados com *Leishmania*.

Materiais e

Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão listados os principais materiais e equipamentos utilizados, bem como a metodologia empregada para o desenvolvimento experimental.

Os métodos foram divididos em três grandes grupos:

✓ Metodologia para preparação dos lipossomas – neste primeiro grupo são descritos os métodos de preparação dos LC vazios e a sua homogeneização de tamanhos, as várias estratégias de encapsulação da CH8, que diferiram na etapa de adição da chalcona CH8, condições de mistura e a concentração molar do lipossoma, a incorporação do PEG-8L para a preparação dos LP vazios e também contendo chalcona CH8.

✓ Metodologias de caracterização dos lipossomas – neste grupo são descritos os métodos experimentais de determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos, quantificação do teor de fosfato, estabilidade coloidal, quantificação da CH8, morfologia, tensão superficial, potencial zeta e temperatura de transição de fase e toxicidade dos lipossomas.

✓ Ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* – permeação através de membranas sintéticas de nanoporos – descreve-se o planejamento e condições experimentais usadas no estudo da permeação de LC e LP contendo chalcona CH8. Penetração cutânea das composições lipossomais, utilizando o modelo de pele de porco e a avaliação da eficácia das composições lipossomais realizada por meio de tratamento tópico da leishmaniose cutânea em camundongos.

3.1. Materiais

Os principais materiais utilizados para preparação de lipossomas foram:

- ✓ Chalcona CH8 (3-nitro-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxiychalcona), sintetizada no Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
- ✓ O fosfolípido estrutural usado foi a fosfatidilcolina de ovo (EPC), com 80 – 85 % de fosfatidilcolina (Lipoid E-80), doado pela Lipoid GMBH (Alemanha) – vide ficha técnica no Anexo I.

- ✓ PEG-8L – polioxietileno lauril éster, Lipopeg[®] 4-L – LIPO Chemicals.

Outros materiais e reagentes utilizados foram:

Clorofórmio - Merck; metanol - Merck; acetonitrila - Merck; ácido sulfúrico - Synth; peróxido de hidrogênio - Merck; ácido ascórbico - Aldrich; molibdato de amônia - Sigma; tampão HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico]) - Sigma; água deionizada em sistema Milli-Q – Milipore; e membranas de policarbonato com diâmetro de poro 30 nm e 100 nm - Osmonics Inc.

3.2. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados para preparação e caracterização de lipossomas foram:

- ✓ Rotaevaporador, Fisatom – modelo 802.
- ✓ Extrusora aço inox - modelo T.001, Lipex Biomembranes Inc.
- ✓ QLS Malvern Autosizer acoplado a um sistema de aquisição de dados PCS 4700.
- ✓ Microscópio Eletrônico de Transmissão, Carl Zeiss – modelo CEM902, equipado com filtro de energia tipo Castaing-Henry-Ottensmeyer, aquisição de imagem com câmera CCD-Proscan, software de aquisição de dados Analysys.
- ✓ Calorímetro Diferencial de Varredura Central Processor, Mettler-Toledo AG – modelo FP90.
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura, LEO – modelo 440i.
- ✓ Tensiômetro automático, Dataphysics – modelo OCA-20
- ✓ ZetaSizer[®], Malvern Instruments – Nano - ZS

Outros equipamentos e acessórios: Balança analítica; refrigerador (Tecnal – TE-184); bomba de vácuo (Tecnal – TE-0058); placa aquecedora (Fisatom); banho maria (Fisatom); agitador mecânico digital (Tenal – TE-039/I); shaker - G24 Enviromental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific CO, INC, Edson NJ,

USA); espectro Genesys 6 (Thermo Electron Corporation, acoplado a computador, utilizando o software Vision Lite™).

3.3. Metodologia para preparação dos lipossomas convencionais vazios

Os lipossomas convencionais compostos de fosfatidilcolina de ovo (Lipoid E-80) foram preparados pelo método de Bangham, por meio da hidratação do filme seco de lipídios (New, 1990).

Para preparar o filme lipídico, o fosfolipídio foi pesado para a concentração pretendida, em balão de fundo redondo, solubilizado em solução de clorofórmio-metanol na razão de 9:1 (v/v). O balão foi acoplado a um evaporador rotativo e o sistema de refrigeração da coluna de condensação foi ajustado à temperatura de 4 °C para impedir a entrada de solventes na bomba de vácuo do sistema. O solvente foi evaporado sob vácuo (650 mmHg) a 90 rpm, por 30 minutos e com temperatura ambiente, acima da temperatura de transição de fases do lipídio ($T_m = -8$ °C) até a visualização da formação do filme seco. Seguida por mais 2 horas em sistema de vácuo em rotação máxima para remoção dos resíduos do solvente. Após formação do filme delgado e total evaporação dos solventes orgânicos, foi adicionado ao balão, solução tampão HEPES 10^{-2} mol.L⁻¹, na faixa de pH 7,4 para hidratação do filme, o balão foi acoplado ao rotaevaporador, deixado durante 30 minutos a 80 rpm e sem vácuo.

As dispersões lipossomais foram preparadas variando a concentração de fosfolipídio ($1,0 \cdot 10^{-3}$, $1,0 \cdot 10^{-2}$, $2,0 \cdot 10^{-2}$, $3,0 \cdot 10^{-2}$, $4,0 \cdot 10^{-2}$, $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹), em triplicata. Ensaio foram realizados imediatamente após o preparo das dispersões e estas foram posteriormente armazenadas sob refrigeração à temperatura de 8 °C.

Após a preparação os lipossomas permaneceram por duas horas em repouso, para acomodação das vesículas e foram submetidos à extrusão para redução e homogeneização de tamanhos das vesículas (item 3.3.1), com auxílio de membranas com diâmetro de poro de 100 nm. Com estes lipossomas, foram realizadas medidas do diâmetro médio e distribuição de tamanhos (nm),

determinados por PCS (item 3.6.1), quantificação do teor de fosfolipídios – ensaio fosfato (item 3.6.2) e estabilidade coloidal das vesículas por um período de 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 8 °C (item 3.6.3), permeação através de membranas de nanoporos (item 3.8.1), análise morfológica (item 3.6.5), ensaios de toxicidade (item 3.7), medidas de tensão superficial (item 3.6.7), transição de fase (item 3.6.6) e potencial zeta (item 3.6.8). As leituras de diâmetro médio e distribuição de tamanhos, e os ensaios foram realizadas em triplicata.

3.3.1. Redução e homogeneização do tamanho das vesículas

Após a preparação, a dispersão lipossomal permaneceu por 2 horas em repouso para agregação e acomodação dos fosfolipídios em bicamada. A redução e homogeneização dos tamanhos dos lipossomas foram feitas por extrusão à pressão de aproximadamente 12 Kgf/cm² com ciclos de 20 passagens consecutivas através de duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poros de 100 nm, utilizando extrusora e nitrogênio para pressurização.

3.4. Encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas convencionais

O diagrama da Figura 15 resume as estratégias experimentais utilizadas para a encapsulação da chalcona CH8. Duas estratégias foram adotadas para a encapsulação da CH8, que diferiram na etapa de adição da CH8, anterior ao filme lipídico ou a lipossomas pré-formados.

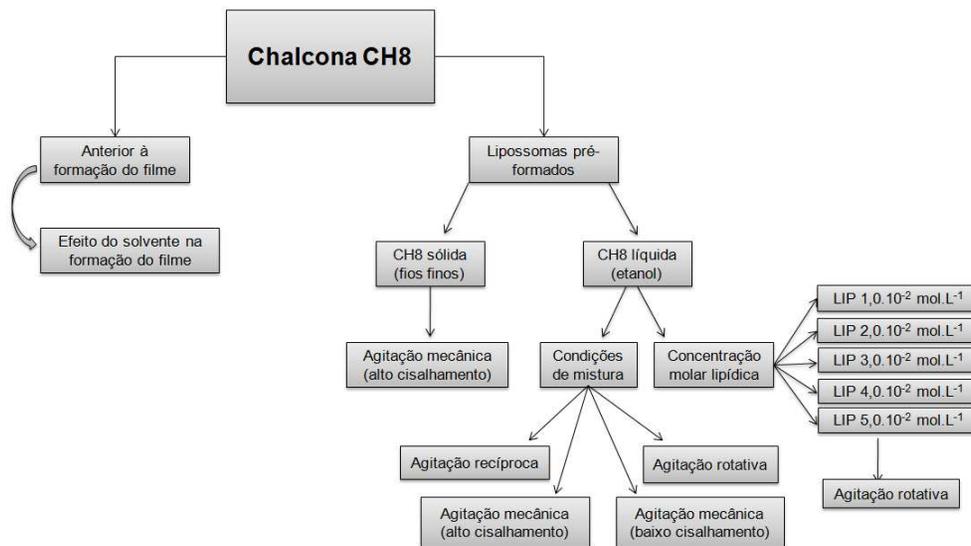


Figura 15 – Esquema das estratégias experimentais para a encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas.

3.4.1. Adição de CH8 ao filme lipídico

Na primeira estratégia a chalcona CH8 foi pesada para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (dose usual e recomendada) e solubilizada em solvente adequado, juntamente com o lipídio para a formação do filme conforme metodologia de Bangham (item 3.3). Após hidratação do filme lipídico, os lipossomas foram extrudados para redução e homogeneização de tamanhos.

Para avaliar o efeito do solvente na formação do filme lipídico contendo chalcona CH8, foram testados o solvente clorofórmio puro e uma partição de clorofórmio-metanol na proporção de 9:1 (v/v).

A caracterização foi feita por análise da distribuição de tamanhos e de diâmetro médio (nm), determinadas por PCS, seguindo metodologia descrita no item 3.6.2. O rendimento da preparação foi avaliado em relação ao teor de fosfato recuperado, conforme metodologia descrita no item 3.6.3 e acompanhamento da estabilidade coloidal das vesículas por um período de 30 dias de armazenamento sob refrigeração (8 °C). Para poderem ser utilizados para a aplicação pretendida, os lipossomas passaram por um processo de extrusão para homogeneização e redução de tamanho das vesículas, descrito no item 3.6.1. As leituras do diâmetro médio e distribuição de tamanhos, e os ensaios com os LC contendo CH8

encapsulada durante o processo de formação do filme lipídico, foram realizadas em triplicata.

3.4.2. Adição da chalcona CH8 a lipossomas pré-formados

A encapsulação da CH8 a lipossomas pré-formados foi realizada com a chalcona no estado sólido ou líquido. A adição da CH8 na forma líquida consistiu na variação da concentração molar lipídica ou das diferentes condições de mistura.

3.4.2.1. Chalcona sólida

A chalcona CH8 possui coloração amarelada e apresenta aspecto de fios finos (Figura 16), na ordem de 1 mm de comprimento.



Figura 16 – Chalcona CH8 na forma de pó (agulhas).

Na fase inicial de encapsulação, em béquer contendo lipossomas a 10^{-3} mol.L⁻¹ de EPC, os fios de chalcona CH8 foram adicionados um a um, mantidos sob agitação com rotação de 300 rpm com impelidor de pá dentada, por um período de 30 minutos.

3.4.2.2. Chalcona líquida

A chalcona CH8 foi triturada em grau com auxílio de pistilo, para obtenção de partículas menores e, dissolvida em etanol, para facilitar sua encapsulação e acomodação entre as bicamadas.

3.4.2.2.1. Influência da concentração lipídica

A metodologia descrita a seguir, foi estabelecida como padrão para a encapsulação da chalcona CH8, após análise das primeiras encapsulações (itens 3.4.1, 3.4.2.1). Uma vez que a encapsulação da chalcona CH8 se mostrou mais eficaz, quando a chalcona CH8 foi adicionada em LC pré-formados utilizando agitação em balão rotativo.

Inicialmente foram preparados LC vazios, variando a concentração molar lipídica dos lipossomas de $1,0 \cdot 10^{-2}$ a $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC, pelo método do filme seco, utilizando como solução de hidratação tampão HEPES (item 3.3), seguida de extrusão em membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 100 nm (item 3.6.1). Após extrusão, foram determinados o diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas, quantificado o teor de fosfato e encapsulação da chalcona CH8.

Em balão de fundo redondo contendo LC vazios pré-formados, a chalcona CH8 em solução de etanol na concentração de $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, foi adicionada gradativamente, com agitação de 140 rpm, em rotaevaporador, na temperatura ambiente e sem vácuo, com intervalos de 15 minutos de agitação à cada adição da solução de chalcona CH8. A reposição do etanol evaporado foi feita ao longo do processo com tampão HEPES. Este procedimento foi repetido até a saturação da bicamada dos lipossomas, quando era visível a precipitação da chalcona CH8 não encapsulada.

3.4.2.2.2. Influência das condições de mistura

Neste processo, a chalcona CH8 foi dissolvida em etanol obtendo-se a concentração de $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, e adicionada gradativamente aos lipossomas pré-formados, com agitação de 140 rpm. Nesse último processo foram estudados a diferentes condições de mistura (Figura 17), através de agitação mecânica de alto cisalhamento (impelidor pá dentada), agitação recíproca (shaker) e agitação branda de baixo cisalhamento (impelidor âncora ou balão rotatório). Em recipiente

apropriado para cada tipo de agitação foram adicionados 4 mL da dispersão dos lipossomas pré-formados, na concentração de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de EPC.

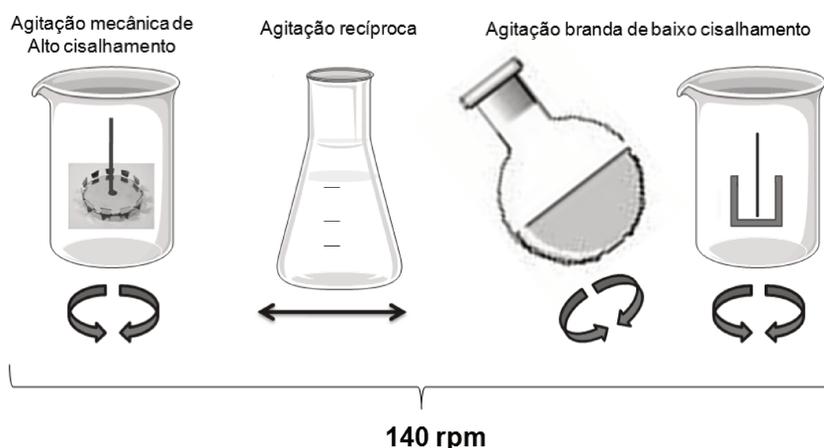


Figura 17 – Esquema de veiculação da chalcona CH8 para várias condições de mistura: agitação mecânica de alto cisalhamento (impelidor pá dentada), agitação recíproca (shaker), agitação branda de baixo cisalhamento (balão rotatório e impelidor âncora).

A chalcona CH8 foi adicionada em volumes de 0,1 mL permanecendo com agitação por um período de 15 minutos após cada adição. A reposição do etanol evaporado foi feita ao longo do processo com tampão HEPES. Este procedimento foi repetido até a saturação da bicamada dos lipossomas, quando era visível a precipitação da chalcona CH8 não encapsulada. Devido à chalcona CH8 ser um fármaco estritamente hidrofóbico, este ficará encapsulado na bicamada lipídica.

Para verificar a influência da chalcona CH8 no diâmetro das vesículas após encapsulação, foram realizadas medidas do diâmetro médio e distribuição de tamanhos (nm), determinadas por PCS, seguindo metodologia descrita no item 3.6.2. O rendimento da preparação foi avaliado em relação ao teor de fosfato recuperado, conforme metodologia descrita no item 3.6.3. O desempenho do processo de encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas, foi caracterizado a partir da influência da razão molar CH8:EPC e concentração CH8/mL da dispersão lipossomal. A concentração da CH8 encapsulada foi determinada por espectroscopia UV. As leituras do diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos

lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada em LC pré-formados e a quantificação da chalcona CH8 encapsulada foram realizadas em triplicata.

3.5. Preparação dos Lipossomas peguilados

Os lipossomas peguilados foram preparados incubando os LC com PEG-8L. Para a preparação dos lipossomas peguilados, LC pré-formados vazios e encapsulando a chalcona CH8 foram incubados com 40 % do tensoativo PEG-8L, durante 24 horas.

A cinética de incorporação do PEG-8L na bicamada dos lipossomas pré-formados foi acompanhada por medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos, pela técnica de PCS, até estabilização do diâmetro médio, como descrito no item (3.6.2). A distribuição de tamanhos das populações das vesículas em termos de intensidade de luz espalhada e número de vesículas. A incorporação do PEG-8L foi também avaliada por medidas de tensão superficial, item (3.6.8.), e potencial zeta, item (3.6.9.). A capacidade de deformação (comportamento elástico) dos lipossomas foi avaliada por ensaios de permeação através de membranas sintéticas, item (3.7.1). A estabilidade da preparação foi avaliada pela variação no diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas em função do tempo de armazenamento. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (8 °C). As leituras para caracterização dos lipossomas peguilados foram realizadas em triplicata.

3.6. Caracterização dos lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados quanto à redução de tamanhos com homogeneização da dispersão lipossomal, determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos, quantificação do teor de fosfato para determinar o rendimento da preparação, estabilidade coloidal ao longo da estocagem, quantificação da chalcona CH8, morfologia da chalcona CH8 e das estruturas lipossomais, temperatura de transição de fases, medidas de tensão superficial e carga superficial dos lipossomas.

3.6.1. Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos

A distribuição de tamanhos e estabilidade das vesículas lipossomais foram determinadas pela técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS).

Esta técnica (PCS), também é denominada espalhamento de luz dinâmico ou espalhamento de luz quase elástico (dynamic light scattering ou quasi elastic light scattering - QLS), determina o diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos das estruturas coloidais por espalhamento da luz, utilizando laser de alta potência (Allen, 1997). Essa técnica usa o espalhamento de luz em função do tempo para determinar o coeficiente de difusão médio translacional (Pecora, 1964; New, 1990). As partículas em suspensão estão em movimento constante devido às colisões entre as moléculas do meio. Quanto menor a partícula, mais rapidamente ela se movimenta, fenômeno esse denominado movimento Browniano (Allen, 1997).

O movimento Browniano de partículas pequenas em um líquido causa flutuações na intensidade da luz espalhada, gerada em um laser, que pode ser de He-Ne, que incide sobre as partículas e que é detectada em um ângulo de 90° em relação à radiação incidente (Pecora, 1964; New, 1990). Partículas pequenas se movimentam mais rapidamente que partículas grandes, causando diferentes flutuações da radiação espalhada que chegam ao detector. Estas flutuações estão relacionadas ao coeficiente de difusão translacional (D_t), que, por sua vez, permite determinar o raio hidrodinâmico médio (R_h) das partículas, através da relação de Stokes-Einstein:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad \text{Equação 1}$$

onde: k = constante de Boltzmann; T = temperatura absoluta; R = raio das vesículas;
 η = viscosidade da solução dispersante

A taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão (Allen, 1997).

O equipamento utilizado foi um PCS Malvern Autosizer acoplado a um sistema de aquisição de dados PCS 4700. Em cubeta de policarbonato, foi adicionada a dispersão lipossomal e o diâmetro médio determinado. Os resultados foram analisados em termos da distribuição ponderada de número de partículas e por intensidade de luz espalhada. As medidas foram feitas a temperatura ambiente, em soluções diluídas das amostras (cerca de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e realizadas em triplicata.

3.6.2. Quantificação do teor de fosfato

O ensaio de quantificação do teor de fosfato, foi realizado para determinar quantitativamente a concentração de fosfolipídios, avaliando-se o conteúdo de fosfato na amostra, baseado no método desenvolvido por (Chen *et al.*, 1956). Iniciamos com a construção de uma curva analítica de fosfato utilizando um método colorimétrico de dosagem na qual se estabelece uma relação entre a quantidade de fosfato e a quantidade de fosfolipídio existente na matéria-prima.

A concentração molar de fosfolipídios nos lipossomas foi quantificada através do teor de fosfato (PO_4^{3-}) em solução (Figura 18). Soluções padrões com concentração conhecida de fosfato e solução isenta de fosfato (branco) foram adicionadas a tubos de ensaio contendo esferas de vidro. O mesmo procedimento foi usado para determinação do teor de fosfatidilcolina nos lipossomas. Em seguida, foi adicionada solução de ácido sulfúrico 10 N e os tubos foram colocados em placa de aquecimento de tubos na temperatura de 200 °C, deixados sob digestão durante um período de 30 minutos. Após este tempo os tubos foram resfriados à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, foi adicionado peróxido de hidrogênio e os tubos foram reaquecidos por 30 minutos a 200 °C. Decorrido este tempo os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, em seguida, foi adicionada água deionizada Milli-Q, solução de molibdato de amônio a 2,5% e solução de ácido ascórbico a 8%. A seguir os tubos foram aquecidos em banho de água ($T \cong 97 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 7 minutos e as amostras adquiriram coloração azul. A

intensidade da cor azul encontrada foi determinada por espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda de 830 nm. O ensaio fosfato foi realizado em triplicata para cada amostra e as concentrações de fosfolipídio presentes na amostra foram determinadas através da equação da reta construída (Anexo II).

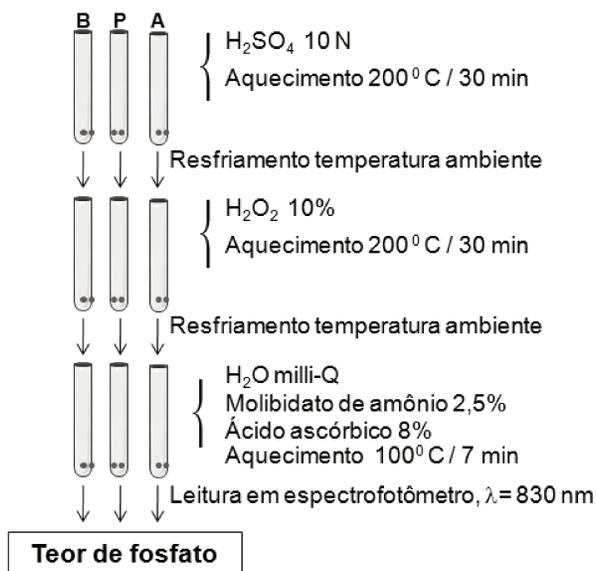


Figura 18 – Representação esquemática da metodologia de quantificação do teor de fosfato (B – branco, P – padrão fosfato, A – amostra).

3.6.3. Avaliação da estabilidade coloidal ao longo da estocagem

A estabilidade coloidal dos lipossomas foi avaliada através das variações de diâmetro e distribuição de tamanhos das vesículas, determinadas por PCS (item 3.6.2), em relação ao tempo de armazenamento. As dispersões lipossomais foram mantidas a temperatura de 8°C e analisadas ao longo de 30 dias, com intervalos de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

3.6.4. Quantificação da chalcona CH8

A determinação da concentração de chalcona CH8 em solução ou em lipossomas foi realizada por espectroscopia UV/VIS, em comprimento de onda de 337 nm. Para a quantificação da CH8, foi realizada uma varredura da CH8 solubilizada em acetonitrila e posteriormente uma curva analítica da CH8 em acetonitrila, variando as concentrações de fármaco (Anexo III).

As amostras de lipossomas e do permeado, foram solubilizadas em acetonitrila e a chalcona CH8 quantificada, os testes foram realizados em triplicata.

3.6.5. Morfologia

Para caracterizar os lipossomas e visualizar as estruturas, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A chalcona CH8 foi avaliada tanto na forma livre quanto dissolvida em solvente orgânico, por microscopia eletrônica varredura (MEV).

3.6.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Nesta técnica são utilizadas telas de cobre 300 mesh, como suporte para a amostra, recoberta com filme de parlódio (acetato de celulose) e carbono. Uma gota da dispersão lipossomal ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) foi aplicada sobre a tela, após 5 minutos (para fixação das vesículas no filme) o excesso de amostra foi retirado encostando levemente um pedaço de papel de filtro na tela. Uma gota de acetato de uranila 1% (p/v) foi então adicionada, após 1 minuto a amostra foi cuidadosamente seca com papel de filtro e aproximadamente 30 minutos após a amostra foi visualizada em microscópio eletrônico de transmissão, operando a 80 kV. Foram analisados lipossomas convencionais vazios e contendo CH8 encapsulada com auxílio de balão rotativo, lipossomas peguilados vazios e contendo chalcona CH8 e amostras do permeado dos lipossomas convencionais e peguilados descritos acima.

3.6.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A chalcona CH8 na sua forma livre (pó) ou dissolvida em solvente orgânico foi observada em microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram recobertas com ouro coloidal sob vácuo, a seguir, colocadas na câmara de microscopia, sendo obtidas fotomicrografias.

3.6.6. Temperatura de Transição de Fase

Amostras de lipossomas na forma líquida foram pesadas (condições ambientes) em cadinho de alumínio que foram hermeticamente fechados. As medidas foram feitas na faixa de temperatura entre -20 °C a 20 °C, a uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. Foram analisadas amostras de lipossomas na ausência ou presença de PEG-8L (peguilados), lipossomas contendo chalcona CH8 ou vazios, água, PEG-8L e chalcona CH8 em água.

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

3.6.7. Tensão superficial

A cinética de adsorção foi determinada pelo método da gota pendente, baseada na análise do perfil eixo-simétrico da gota (ADSA), (Rotenberg *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1990) usando um tensiômetro automático. Para tal, uma gota da solução aquosa de interesse foi formada por uma seringa, acoplada a uma bomba de injeção, na extremidade de uma agulha com ponta reta e diâmetro conhecido, contida em uma cubeta ótica contendo certo volume da solução trabalhada, para manter a atmosfera saturada, de forma a evitar a evaporação da gota durante as medidas. Dessa forma, a gota pode ser filmada por meio de uma câmara CCD. Um programa com um processo de disparo programado de filmagem, a partir do posicionamento conveniente de uma linha de referência, permite filmar imagens mesmo antes da formação da gota. O tempo zero é definido com a formação da interface (gota) após analisar o filme e selecionando-o quadro a quadro. A tensão superficial foi determinada digitalizando a imagem e analisando o seu perfil, quadro a quadro, ajustando-o à equação de Young-Laplace (Davies & Rideal, 1963), utilizada para condições de equilíbrio para dois fluidos homogêneos, separados por uma interface:

$$\Delta P = (\rho_1 - \rho_a)gh = (\gamma/R_1) + (\gamma/R_2) \quad \text{Equação 2}$$

para a qual ΔP corresponde à diferença de pressão entre o interior e a parte externa da gota; $\rho_1 - \rho_a$ são as densidades da fase líquida e do ar, respectivamente; g é aceleração da gravidade, h altura da coluna líquida na gota e R_1 e R_2 os dois raios principais de curvatura. De fato esses raios são expressos em termos de coordenadas no ajuste do perfil da gota à equação.

3.6.8. Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Os fosfolípidios (lecitinas) são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta, e fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os tensoativos não-iônicos tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (Mosqueira *et al.*, 2000). As características de superfície das partículas podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico (ex: PEG) (De Jaeghere *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2001; Soppimath *et al.*, 2001).

A carga superficial dos lipossomas antes e após permeação e o perfil de incorporação do PEG-8L para a caracterização dos LP foram avaliadas a partir de medidas do potencial zeta (ζ). As amostras foram adicionadas à cubeta contendo os eletrodos com capacidade para aproximadamente 1 mL, medidas foram realizadas com amostras diluídas na faixa de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, utilizando tampão HEPES, como meio de dispersão, a 25 °C.

3.7. Toxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados em parceria com a Prof^a Patrícia Santos Lopes, UNISO. A citotoxicidade e genotoxicidade foram avaliadas para LC e LP vazios.

3.7.1. Cultura Celular

Linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1) foi padronizada para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com antibiótico e antifúngico (100 unidades/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina e 25 ng/ml amfotericina), 2 mol.L⁻¹ glutamina e 10% de soro bovino a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% CO₂ até que as células atingissem confluência. Para as sub-culturas e experimentos, as células foram tratadas usando 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS (Rodas *et al.*, 2009).

3.7.2. Preparo dos Extratos de Lipossomas

Os lipossomas foram diluídos em meio RPMI e esterilizados por filtração. O mesmo extrato foi utilizado para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade (Rodas *et al.*, 2009).

3.7.3. Teste de Citotoxicidade

Microplacas contendo 96 poços foram preparadas com 50 µl de extrato; e diluídos de 100 a 6,25% em meio RPMI em quadruplicatas. Uma suspensão de CHO-k1 contendo 6 x 10⁴ células por ml foi preparada e 50 µl por poço foi aplicada na microplaca. As microplacas foram incubadas por 72 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A viabilidade celular foi medida pela adição de 20 µl de MTS/PMS (20:1) na incubadora, onde foi deixado por 2 horas a 37 °C. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm. Para os testes de genotoxicidade, as concentrações que apresentaram 10 a 98% de viabilidade celular foram escolhidas (Rodas *et al.*, 2009).

3.8. Ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Para determinar a elasticidade dos lipossomas e sua capacidade de deformação, foram feitos ensaios de permeação através de membranas sintéticas.

Para demonstrar a penetração cutânea das composições lipossomais, foi utilizado o modelo de pele de porco e a avaliação da eficácia das composições lipossomais foi realizada por meio de tratamento tópico da leishmaniose cutânea em camundongos. Estudos realizados em parceria com o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, tendo como colaboradores a Prof^a Dr^a. Bartira Rossi-Bergmann e a doutoranda Camila Alves Bandeira Falcão, trabalho este, com patente já depositada em 06 de fevereiro de 2009, número de protocolo de depósito: 020090011246 e intitulada **“Composições Farmacêuticas antiparasitárias contendo chalconas encapsuladas em lipossomas”**.

3.8.1. Permeação *in vitro* através de membranas sintéticas de nanoporos

Para os ensaios com membranas sintéticas de nanoporos, foram utilizados lipossomas unilamelares (1 mL), pressão de 2,5 atm (pressão transepidermica), temperatura de 37 °C e duas membranas de policarbonato com diâmetro de 30 nm que foram sobrepostas para induzir a tortuosidade ao sistema, simulando assim as condições da pele humana. Os ensaios foram feitos em extrusora de aço inox, com amostras de LP vazios ou incorporando CH8. Lipossomas convencionais vazios ou incorporando chalcona CH8 foram usados como controles. Após permeação das amostras o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos foram determinados, conforme item 4.6.2. Ensaios posteriores foram realizados para pressões que variaram de 2,5 atm até 20 atm e analisados em termos das curvas de vazão vs. queda de pressão, diâmetro e distribuição de tamanhos das partículas, imediatamente após permeação. A quantidade de fosfolípido permeado através das membranas foi determinada através do ensaio de quantificação do teor de fosfato descrito acima. A concentração de chalcona CH8 permeada foi determinada por espectroscopia UV/VIS. As permeações foram realizadas em triplicata para cada amostra.

3.8.2. Permeação *ex vivo* - modelo de célula de Franz, com pele de orelha de porco

Os estudos de retenção e permeação *ex vivo* foram conduzidos utilizando o modelo de célula de Franz, com pele de orelha de porco como membrana. Para tal foram utilizadas células de difusão vertical de Franz Modificada (Hanson Corporation), com célula de permeação contendo 7 ml de tampão PBS como meio dissolutor. A pele de orelha de porco foi dermatomizada a 500 μm , com uma área de permeação de 1,77 cm^2 (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

Para avaliação de permeação cutânea, a pele foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme voltado para baixo, ficando em contato com o meio receptor. Na região do estrato córneo foram aplicadas as formulações de chalcona CH8 até completar o anel dosador do equipamento, removendo assim o excesso e evitando a formação de bolhas entre a formulação e a membrana. Os experimentos foram conduzidos a 37 °C e a solução receptora foi constantemente agitada a 300 rpm por meio de um agitador magnético. Após tempos pré-determinados de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, várias alíquotas de 1 ml da solução receptora foram coletadas para quantificação do conteúdo de chalcona CH8 permeado (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

Foram conduzidos experimentos durante 4 e 12 horas para formulações de chalcona CH8 nos lipossomas. Após estes tempos, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente nas membranas foi delicadamente removido com auxílio de água destilada e, posteriormente, as peles foram secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em superfície plana e a área de retenção foi delimitada para a remoção do estrato córneo. O estrato córneo (EC) foi removido com auxílio de 13 fitas adesivas, sendo a primeira fita descartada. As fitas foram transferidas para tubo de ensaio contendo 3 mL de acetonitrila, sonificado por 15 minutos e, em seguida, agitado em “mixer” por 1 minuto. Após este procedimento, o sobrenadante foi injetado em HPLC para quantificação da chalcona CH8. A pele fixa na superfície plana, sem o estrato córneo, foi então separada a área de retenção (EP+D), picotada com tesoura e transferida para tubo de ensaio contendo 3 mL de acetonitrila. Em seguida, a pele foi triturada em aparelho triturador do tipo Turrax por 1 minuto e, agitada em mixer

por 1 minuto. A solução foi deixada então por 15 minutos em banho de ultra-som para rompimento das células e depois a mistura foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi analisado e quantificado em HPLC/CLAE (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

A chalcona CH8 foi quantificada por UV-CLAE utilizando bomba modelo LC10 AD, injetor com loop de 20 μ L, detector SPD-10A em 337 nm e interface de controle modelo SCL-10A. A separação foi realizada em coluna RP-18, Regis S5-100-ODS, 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m. A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila e ácido fosfórico 0,01%, numa proporção de 80:20 (v/v) e fluxo de 1,0 mL/min, isocrático. Nestas condições, o tempo de retenção da CH8 foi de 7,7 min. O método mostrou-se linear com concentrações variando de 0.04 μ g/mL a 50 μ g/mL e um coeficiente de correlação linear de (r) de 0.9998 (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

3.8.3. Avaliação *in vivo* da eficácia das composições lipossomais no tratamento tópico da leishmaniose cutânea

Para avaliar a melhoria da eficácia tópica da chalcona CH8 após sua encapsulação em lipossomas convencionais e peguilados, foi utilizado um modelo de infecção murina. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* GFP na orelha (n=5), em um volume de 10 μ l de PBS. No dia 12 de infecção, os animais foram separados em grupos para início do tratamento que teve duração de 30 dias, duas doses ao dia. O grupo tratado com CH8 em lipossomas convencionais (LC) recebeu 6,6 μ g CH8 / 20 μ l LC / dose, e o outro grupo tratado com CH8 em lipossomas peguilados (LP), 6,6 μ g CH8 / 33 μ l LC / dose. Um grupo foi tratado com chalcona CH8 1% em creme lanete (CL) (200 μ g CH8 / 20 mg creme Lanete / dose). Grupos controles receberam a mesma dose das formulações acima sem chalcona. Foi feito um grupo controle negativo, que não recebeu tratamento, e um controle positivo que recebeu 3,3 μ g CH8 / 10 μ l PBS de CH8 livre, pela via intralesional, duas vezes por semana, durante 4 semanas (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

O crescimento da lesão foi acompanhado 2x por semana com o auxílio de um paquímetro e a carga parasitária foi avaliada ao final do experimento por fluorimetria do macerado das lesões (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa Graph Pad Prisma- versão 4.0, com o teste Repeated Measures ANOVA e os valores obtidos nos resultados foram comparados por análise de variância: *One-way ANOVA* ou *Two-way ANOVA* e teste de Tukey. O grau de significância estatística foi definido como $p < 0.05$ ou $p < 0.001$.

Resultados e
Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais e sua respectiva discussão são apresentados dentro de três grandes tópicos: A) Preparação, Caracterização e Encapsulação da Chalcona CH8; B) Estudos de Permeação; C) Eficácia no Tratamento Tópico da Leishmaniose. Dentro desses tópicos, figuram as caracterizações físico-químicas pertinentes como: diâmetro médio e distribuição de tamanhos, rendimento das preparações em relação ao teor de fosfato, estabilidade coloidal das vesículas em função do tempo de armazenamento, temperatura de transição de fases, tensão superficial, potencial zeta e morfologia, e as caracterizações biológicas tais como toxicidade em cultura de células, permeação *ex vivo* através de pele de orelha de porco e tratamento tópico da leishmaniose em camundongos, realizados com as diferentes formulações.

A) Preparação, Caracterização e Encapsulação da Chalcona CH8

4.1. Lipossomas convencionais

4.1.1. Lipossomas vazios

Lipossomas convencionais (LC) vazios foram preparados, caracterizados e utilizados como controle para as avaliações dos lipossomas peguados (LP) e contendo a chalcona CH8.

4.1.1.1. Diâmetro médio e distribuição de tamanhos

Os resultados do diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas extrudados nas concentrações lipídicas $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ estão apresentados na Tabela 1. A distribuição de tamanhos das populações das vesículas foi analisada em termos de intensidade de luz espalhada (distribuição I) e número de vesículas (distribuição N)

Tabela 1 – Diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanho dos lipossomas convencionais vazios de EPC nas concentrações $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹.

Concentração	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
$1 \cdot 10^{-3}$	42 – 208	100	$98,0 \pm 0,69$	34 – 170	100	$57,0 \pm 1,67$
$1 \cdot 10^{-2}$	46 – 233	100	$104,1 \pm 4,16$	46 – 153	100	$60,5 \pm 3,28$

Concentração em mol.L⁻¹, Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

O método de espalhamento dinâmico de luz (QLS) é geralmente usado para a determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho de lipossomas (Egelhaaf *et al.*, 1996). A aquisição de dados permite a determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos em termos de intensidade da luz espalhada. Neste caso, o valor ponderado de intensidade (I) é proporcional ao diâmetro da partícula (D) elevado a sexta potência ($I \propto D^6$). Essa distribuição (I) mostra todo o espectro de tamanhos de partículas presentes no meio, porém tem a desvantagem de colocar em evidência as partículas maiores. Entretanto, uma distribuição mais realista pode ser obtida com a conversão em número ponderado, utilizando a Teoria de Mie. Neste caso, a distribuição reflete o número de partículas (N), o qual é proporcional ao diâmetro elevada à primeira potência ($N \propto D$) (Van De Hulst, 1957; Kerker, 1969; Dahneke, 1983; Provder, 1987; Van Der Meeren *et al.*, 1988; Hanus & Ploehn, 1999).

A Tabela 1 mostra que os LC obtidos a $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, apresentaram distribuição larga de tamanhos, variando de 42 a 208 nm e de 34 a 170 nm de acordo com as distribuições (I) e (N) respectivamente. Porém, predominam as partículas de 57 nm, como determinado pela distribuição (N). Para LC a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ a distribuição de tamanhos também se mantêm em uma faixa larga, variando de 34 a 170 nm e 46 a 153 nm de acordo com as distribuições (I) e (N) respectivamente, com partículas de 60,5 nm predominantes, determinadas pela distribuição (N). Estes resultados revelam que os lipossomas obtidos estão predominantemente, com diâmetro menor que 100 nm, considerado adequado

para a aplicação transdérmica pretendida (Cevc, 2004). Uma vez que o diâmetro médio dos lipossomas a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ aumentou somente cerca de 6% em relação à menor concentração lipídica $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, como esperado para lipossomas extrudados, torna-se mais interessante trabalhar com a maior concentração lipídica devido ao maior número de vesículas em solução.

4.1.1.2. Rendimento em relação ao teor de fosfato

No método de quantificação do teor fosfato, promove-se a digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e CO_2 por hidrólise ácida em altas temperaturas. Em seguida ocorre a complexação do ortofosfato formado com molibdato de amônia, gerando o ácido fosfo-molíbico, que é então reduzido pelo ácido ascórbico, formando um complexo azul, o fosfomolibdato, detectável espectrofotometricamente.

Para os LC vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, o rendimento da preparação dos lipossomas pelo método de Bangham foi de 98 %, e para os lipossomas a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ foi de 100 %. Portanto, praticamente não houve perdas, e todo o fosfolipídio adicionado para formação filme seco, esteve presente na dispersão lipossomal após hidratação. Um exemplo da curva analítica de fosfato está apresentada no Anexo II.

4.1.1.3. Estabilidade coloidal ao longo do tempo de estocagem

A estabilidade coloidal dos LC vazios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^\circ\text{C}$) por um período de 30 dias, foi avaliada através de medidas do diâmetro médio e distribuição de tamanhos, apresentada na Tabela 2 e graficamente na Figura 19.

Tabela 2 – Perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanhos, para lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, mantidos sob refrigeração (8 °C) por um período de 30 dias.

Tempo (dias)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
0	38 – 41	25,9	41,3 ± 2,46	35 – 47	99,6	41,0 ± 1,33
	117 – 135	74,1	126,4 ± 3,85	117 – 135	0,4	126,1 ± 2,97
1	44 – 48	44,7	45,5 ± 2,17	44 – 51	99,9	45,9 ± 2,94
	127 – 146	55,3	137,0 ± 3,60			
5	36 – 44	30,6	41,2 ± 4,74	32 – 48	99,7	40,3 ± 4,74
	108 – 146	69,4	127,3 ± 8,55	108 – 132	0,3	120,6 ± 4,17
10	36 – 41	27,2	39,2 ± 3,61	33 – 44	99,7	38,6 ± 3,80
	110 – 146	72,8	127,4 ± 3,16	118 – 136	0,3	127,1 ± 3,85
15	38 – 42	33,2	41,0 ± 4,03	34 – 46	99,8	40,6 ± 3,07
	126 – 139	66,8	131,0 ± 6,51	126 – 139	0,2	132,8 ± 4,87
20	33 – 40	23,1	37,4 ± 7,09	33 – 45	99,7	36,7 ± 7,11
	100 – 135	76,9	121,4 ± 7,37	100 – 123	0,3	111,6 ± 9,26
25	40 – 46	29,2	42,2 ± 3,38	37 – 49	99,6	41,8 ± 2,41
	115 – 142	70,8	128,2 ± 5,30	115 – 142	0,4	123,8 ± 4,84
30	35 – 38	36,0	37,9 ± 3,34	32 – 40	99,9	37,9 ± 3,47
	124 – 133	64,0	129,3 ± 9,31	116 – 133	0,1	124,5 ± 6,54

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

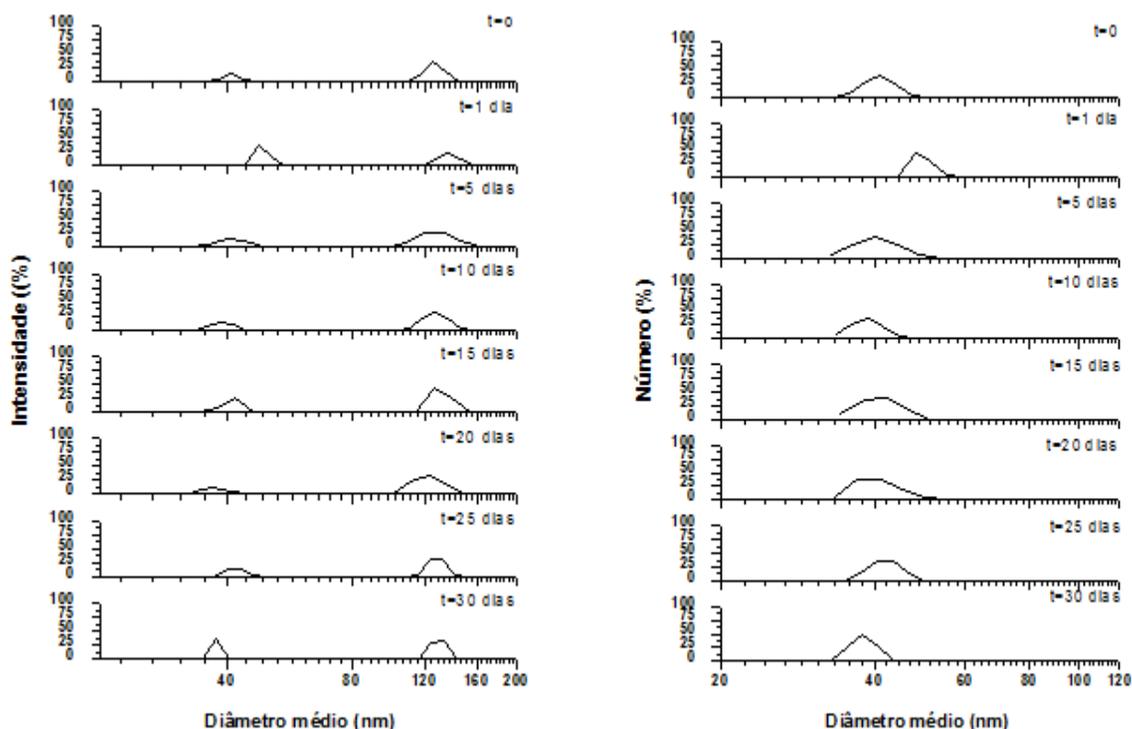


Figura 19 – Evolução do perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio e distribuição, para lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^\circ\text{C}$) por um período de 30 dias. Imediatamente após a preparação ($t=0$).

Os resultados mostram que as amostras de LC vazios apresentaram inicialmente duas populações, a primeira população na faixa de 38 a 41 nm e a segunda população na faixa de 117 a 135 nm (distribuição I), com predominância das partículas de 41 nm (distribuição N). A segunda população pode ser desconsiderada, uma vez que a porcentagem de ocorrência é menor que 1%. (distribuição N). A evolução com o tempo de estocagem mostra um comportamento dinâmico entre as duas populações, porém com a variação do diâmetro médio da população principal da distribuição N não excedendo 10% ao longo do tempo. Com estes resultados pode-se considerar que a preparação lipossomal se mantém estável por um período de 30 dias de armazenamento sob refrigeração ($8 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo este um período seguro de estocagem.

4.1.1.4. Morfologia

A Figura 20 apresenta as estruturas dos LC vazios, compostos de lecitina de ovo, após homogeneização e redução de tamanhos em membranas de nanoporos de 100 nm de diâmetro, em diferentes aumentos.

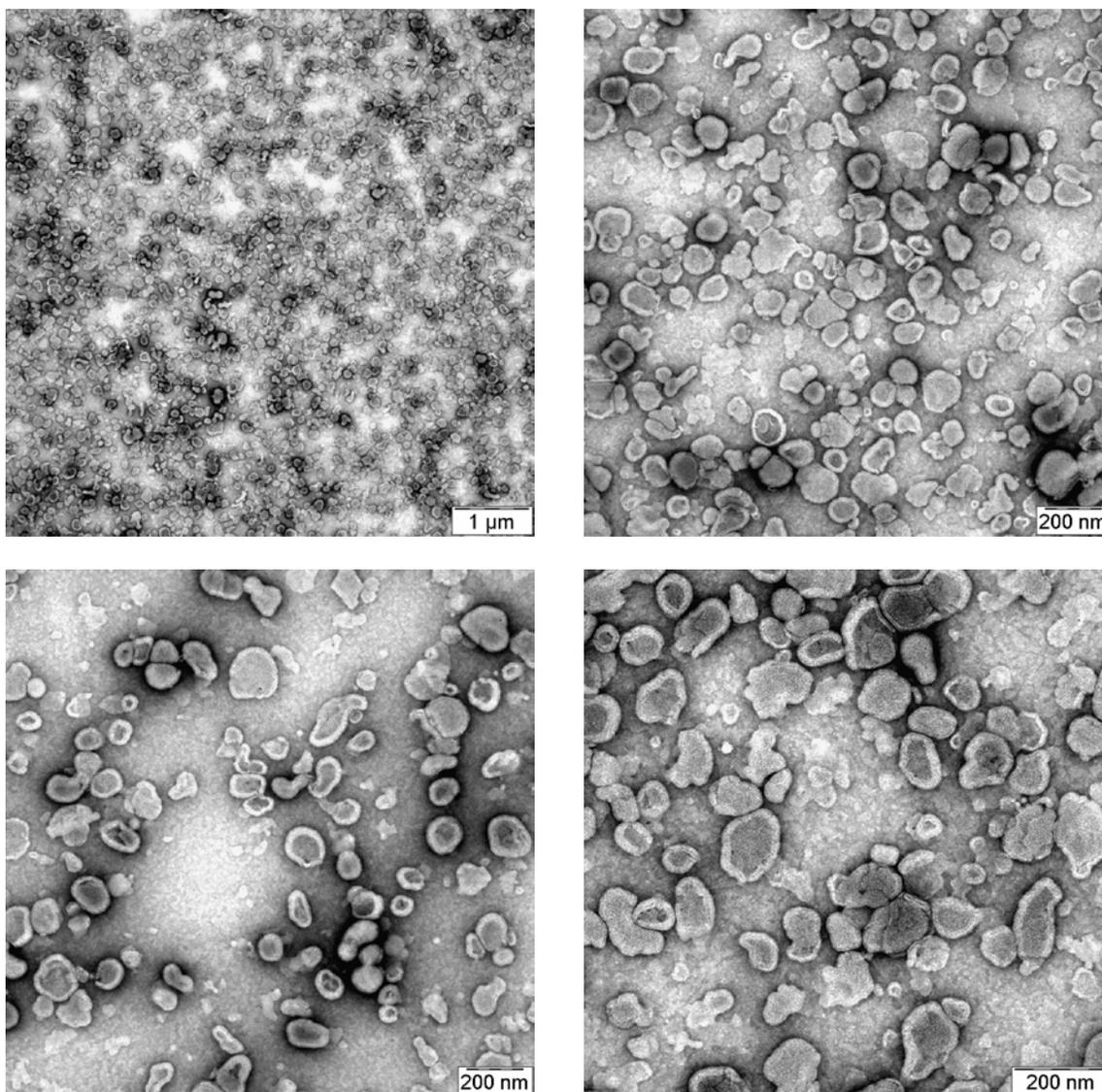


Figura 20 – Morfologia dos lipossomas convencionais vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) à temperatura ambiente (laboratorial).

Observa-se nas microscopias que os LC extrudados compostos de lecitina de ovo são aproximadamente esféricos com superfícies bem delineadas. Essa morfologia reflete a fluidez da bicamada lipídica composta de lecitina de ovo, a

qual encontra-se no estado líquido-cristalino à temperatura de 25 °C. O contorno espesso ao redor das partículas ressalta o domínio lipídico na bicamada e confirma a formação dos lipossomas com dois domínios distintos: interior aquoso e bicamada lipídica.

4.1.2. Encapsulação da chalcona CH8

A chalcona CH8 foi encapsulada em LC através de dois processos definidos em relação à forma da adição da chalcona: durante a formação do filme lipídico e a lipossomas pré-formados. Para o primeiro caso foi estudado o efeito do solvente na formação do filme. No segundo caso, a eficiência de encapsulação foi estudada com relação ao estado da chalcona, sólido ou líquido (dissolvida em etanol) e em diferentes condições de mistura.

4.1.2.1. Adição de chalcona CH8 ao filme lipídico

Devido à dificuldade de solubilização da CH8, esta foi adicionada na formação do filme lipídico em clorofórmio puro ou em mistura clorofórmio-metanol (9:1) e os lipossomas resultantes destas preparações foram analisados. O uso do clorofórmio-metanol é amplamente usado para a preparação de filmes de fosfolipídios, uma vez que estes apresentam regiões hidrofílicas (cabeças polares) e regiões hidrofóbicas (caudas de ácidos graxos). O metanol sendo um solvente polar auxilia a solubilidade das regiões hidrofílicas e o clorofórmio um solvente apolar solubiliza as regiões hidrofóbicas dos lipídios.

A influência do solvente na formação do filme lipídico contendo CH8 foi avaliada visualmente. Os lipossomas formados (não extrudados) a partir dos filmes em ambos os solventes foram analisados através de medidas de diâmetro médio e da distribuição de tamanhos (nm) (Tabela 3).

Tabela 3 – Influência do solvente – clorofórmio puro ou clorofórmio-metanol (9:1) – na formação do filme lipídico contendo chalcona CH8. Concentração de lipídios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

Solvente	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Clorofórmio	66 – 6640	39,6	$87,8 \pm 4,6$	66 – 492	99,8	$76,4 \pm 5,7$
		36,2	$309,0 \pm 9,1$			
		24,2	$1934,0 \pm 23,5$			
Clorofórmio -metanol	287 – 351	67,2	$316,0 \pm 12,9$	260 – 388	96,4	$317,4 \pm 6,3$
	1168 – 1427	32,8	$1333,1 \pm 30,9$	1168 – 1577	3,6	$1310,4 \pm 8,6$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Observações visuais mostraram que utilizando apenas clorofórmio, o filme apresentou-se coeso e espesso, com dificuldades de hidratação para a formação dos lipossomas, ficando predominantemente no fundo do balão. Na preparação utilizando a mistura clorofórmio-metanol, o filme mostrou-se mais fino e menos coeso, localizando-se na parede do balão, facilitando assim a hidratação.

Comparando os lipossomas formados (Tabela 3), pode-se verificar que o metanol, dispersa melhor a CH8 entre os lipídios. Quando foi utilizado somente o clorofórmio, os lipossomas apresentaram distribuição muito larga de tamanhos, variando de 66 a 6640 nm de acordo com a distribuição (I) e de 66 a 492 nm, com predominância de 76 nm, como determinado pela distribuição (N). Utilizando clorofórmio-metanol, a faixa de distribuição de tamanhos diminuiu, variando de 287 a 351 nm, distribuição (I) e 260 a 388 nm, distribuição (N), com partículas de 317 nm predominantes.

As microscopias da Figura 21 mostram a dispersão da CH8 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em clorofórmio-metanol. A presença de agregados demonstra que a solubilização não é completa, apesar da maior facilidade de dispersão comparada à utilização do clorofórmio puro. Destes resultados pode-se inferir que a distribuição mais uniforme da chalcona no filme lipídico formado com clorofórmio-metanol favorece a distribuição mais estreita de tamanhos, e a distribuição mais uniforme da chalcona nos lipossomas.

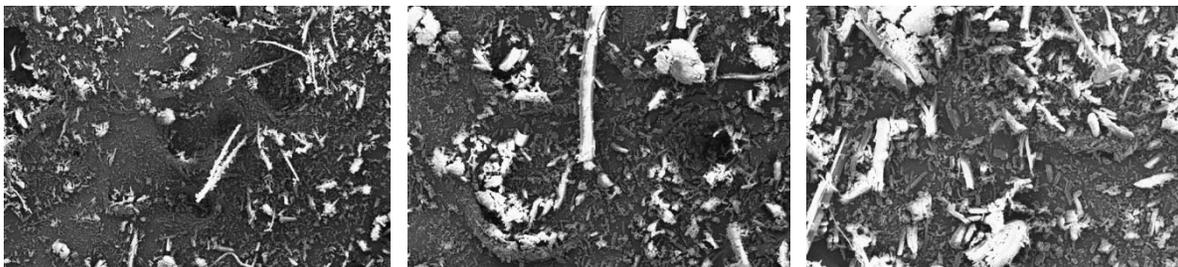


Figura 21 – Microscopias eletrônicas de varredura da chalcona CH8 adicionada à mistura clorofórmio-metanol (9:1).

Uma vez que os resultados acima se mostraram melhores para formação do filme lipídico a partir do clorofórmio-metanol (9:1), estes solventes foram padronizados para as preparações subsequentes dos lipossomas em estudo neste trabalho.

4.1.2.1.1. Homogeneização e redução de tamanhos

Os lipossomas formados pelo método de Bangham são multilamelares e polidispersos, devendo sofrer redução e homogeneização de tamanhos para tornarem-se lipossomas unilamelares e atenderem às necessidades da aplicação.

A extrusão é um processo pelo qual os lipossomas MLV são forçados a passar através de membranas com tamanhos de poros definido, para reduzir os tamanhos e fazer com que os mesmos fiquem com diâmetro médio próximo daquele dos poros (New, 1990). Este é um método amplamente usado na preparação de lipossomas, por gerar distribuições estreitas de tamanhos, como demonstrado em vários trabalhos da literatura (Hope *et al.*, 1985; Mayer *et al.*, 1985; Castile & Taylor, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

Os LC contendo chalcona CH8 encapsulada durante a formação do filme lipídico foram extrudados em membranas sintéticas de nanoporos com diâmetro de 100 nm, para redução de tamanhos para poderem ser utilizados para a aplicação pretendida. As medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos (nm) estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Diâmetro médio dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada durante a formação do filme lipídico, antes e após extrusão para redução e homogeneização de tamanhos.

Amostra	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Antes extrusão	287 – 351	67,2	$316,0 \pm 12,9$	260 – 388	96,4	$317,4 \pm 6,3$
	1168 – 1427	32,8	$1333,1 \pm 30,9$	1168 – 1577	3,6	$1310,4 \pm 8,6$
Após extrusão	38 – 240	100,0	$107,5 \pm 2,2$	30 – 152	100,0	$51,6 \pm 1,7$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Os resultados mostram que antes da extrusão co-existem duas populações de vesículas variando de 287 a 351 nm e de 1168 a 1427 nm de acordo com as distribuições (I). A distribuição (N) mostrou predominância do diâmetro 317 nm em 96,4% das vesículas. Após a extrusão, os lipossomas passaram a apresentar somente uma população de vesículas, devido à homogeneização de tamanhos, porém com uma distribuição larga, variando de 38 a 240 nm e 30 a 152 nm de acordo com as distribuições (I) e (N), com partículas de 51,2 nm predominantes, determinadas pela distribuição (N).

Comparando com os LC vazios (Tabela 1), observa-se que tanto o diâmetro predominante quanto a distribuição foram semelhantes, diferindo em cerca de 16% em relação ao diâmetro médio dos LC (60,5 nm). Isto evidencia tanto à redistribuição dos lipídios nos lipossomas na extrusão, quanto à reduzida capacidade da bicamada lipídica para incorporação da CH8.

Durante a extrusão, verificou-se que houve retenção da CH8 na membrana, facilmente visualizada pela coloração amarela acentuada característica da CH8. Essa retenção, produzida pela agregação da CH8 livre, além de produzir perdas do fármaco, contribuiu para a redução dos poros através da sua obstrução parcial, confirmando os resultados obtidos. Uma solução seria empregar métodos de homogeneização que não utilizem membranas, como a microfluidização, reduzindo assim a perda do material encapsulado (Mayer *et al.*, 1985).

Devido às limitações decorrentes do processo de adição da CH8 ao filme lipídico e extrusão através de membranas, decidiu-se partir de LC vazios pré-formados para posterior encapsulação da CH8.

4.1.2.2. Adição da chalcona CH8 a lipossomas pré-formados

4.1.2.2.1. Chalcona sólida

A chalcona CH8 no estado sólido, apresenta-se como cristais finos semelhantes a agulhas. A CH8 nesta forma foi adicionada a LC a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ pré-formados sob agitação mecânica. Devido a CH8 ser muito hidrofóbica esperava-se que esta se inserisse naturalmente na bicamada lipídica como uma forma de solubilização no meio aquoso, mesmo na forma sólida. No entanto, observou-se que a velocidade de sedimentação dos sólidos e a interação com o vidro do recipiente foram muito maiores que a de inserção na bicamada lipídica, resultando no acúmulo da CH8 no fundo ou nas laterais do becker. O tamanho dos cristais também contribuiu para os efeitos observados. Devido à essas limitações, partiu-se para a adição da CH8 na forma líquida (solubilizada em etanol).

4.1.2.2.2. Chalcona líquida

A chalcona CH8 foi triturada, com o intuito de melhorar sua solubilidade e, após, dissolvida em etanol. Neste caso, a inserção da CH8 na bicamada lipídica ocorre com a solubilização do etanol na água e desproteção da molécula hidrofóbica.

Para avaliar a eficiência de encapsulação da CH8 nos lipossomas pré-formados, estudou-se inicialmente a influência da concentração de fosfolípidios ($1,0 \cdot 10^{-2}$ a $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$). Para a encapsulação mais eficiente, avaliou-se as condições de mistura através da agitação com impelidores do tipo pá dentada e âncora, recíproca em shaker e em balão rotativo.

4.1.2.2.1. Influência da concentração lipídica

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração lipídica dos lipossomas na encapsulação da chalcona CH8, foram preparados LC vazios variando a concentração lipídica de $1,0 \cdot 10^{-2}$; $2,0 \cdot 10^{-2}$; $3,0 \cdot 10^{-2}$; $4,0 \cdot 10^{-2}$ e $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ e a chalcona CH8 em etanol foi gradativamente adicionada sob agitação em balão rotativo.

A encapsulação da chalcona CH8 (mg/mL) está apresentada na Figura 22 em função da variação da concentração lipídica dos lipossomas (mol.L⁻¹). Em todos os casos a eficiência de encapsulação foi considerada 100%, por não se observar sedimentação da CH8 livre adicionada. Portanto, os valores da ordenada representam a CH8 adicionada e encapsulada nos lipossomas.

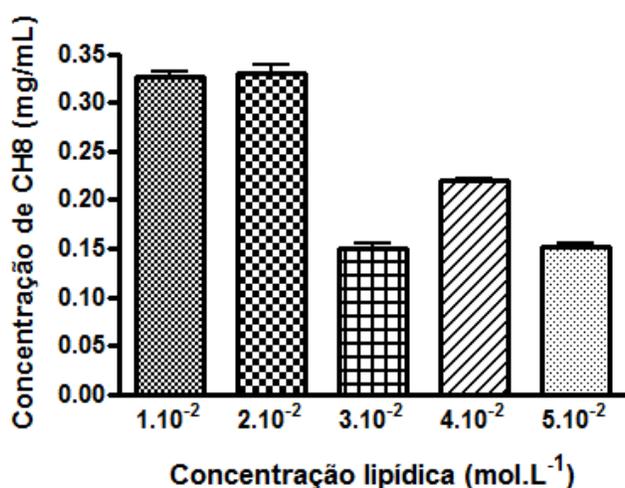


Figura 22 – Concentração de chalcona CH8 (mg/mL) encapsulada em função da concentração de lipídio.

Para as duas primeiras concentrações lipídicas ($1 \cdot 10^{-2}$ e $2 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹), a quantidade de CH8 encapsulada foi a mesma, no entanto, para as concentrações seguintes ($3 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-2}$ e $5 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹), houve uma diminuição na quantidade de chalcona CH8 encapsulada. Observava-se sedimentação da CH8 para quantidades maiores adicionadas. A análise estatística revelou que as amostras na concentração lipídica de $1 \cdot 10^{-2}$ e $2 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ são semelhantes

estatisticamente ($P > 0.05$), o mesmo resultado foi obtido para as amostras na concentração lipídica entre 3.10^{-2} e 5.10^{-2} mol.L⁻¹.

A Figura 23 apresenta a encapsulação em função da razão molar fármaco/lipídio (CH8:EPC).

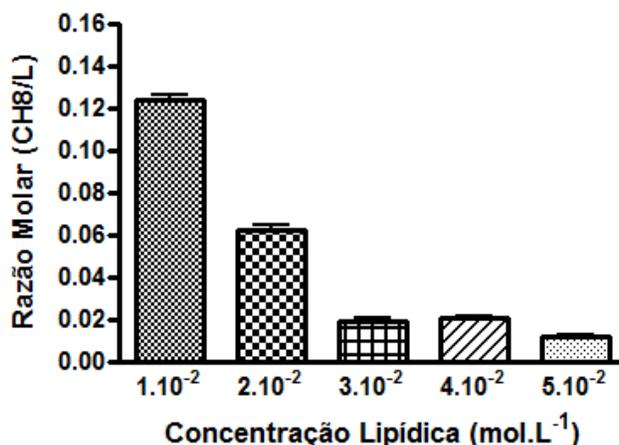


Figura 23 – Razão molar fármaco/lipídio (CH8:EPC) para as diferentes concentrações lipídicas dos lipossomas.

Analisando esses resultados, pode-se observar que a razão molar CH8:EPC diminuiu com o aumento da concentração de fosfolípidios na forma de lipossomas. Essa diminuição indica uma tendência para saturação da bicamada lipídica com menor quantidade de CH8, à medida que a concentração de fosfolípido aumenta.

Para explicar melhor esses efeitos, analisou-se o diâmetro médio e distribuição de tamanhos das populações de vesículas, dos LC vazios e com CH8 na faixa de concentração de fosfolípidios estudada. Os resultados são apresentados graficamente na Figura 24 em termos de diâmetro médio com distribuição (N). No Anexo V, podem ser visualizadas as tabelas para cada concentração lipídica ($1,0.10^{-2}$, $2,0.10^{-2}$; $3,0.10^{-2}$; $4,0.10^{-2}$; $5,0.10^{-2}$ mol.L⁻¹), separadamente.

Os LC vazios a $1,0.10^{-2}$ mol.L⁻¹, apresentaram distribuição larga de tamanhos, variando de 46 a 233 nm e de 46 a 153 nm de acordo com distribuições (I) e (N) respectivamente, com as vesículas de 60,5 nm predominantes, como

determinado pela distribuição (N). O aumento da concentração lipídica estreitou a distribuição de tamanhos dos LC vazios, a qual foi semelhante para as várias concentrações, $2,0 \cdot 10^{-2}$; $3,0 \cdot 10^{-2}$; $4,0 \cdot 10^{-2}$; $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, com diâmetro médio da ordem de 55 nm aproximadamente (distribuição N).

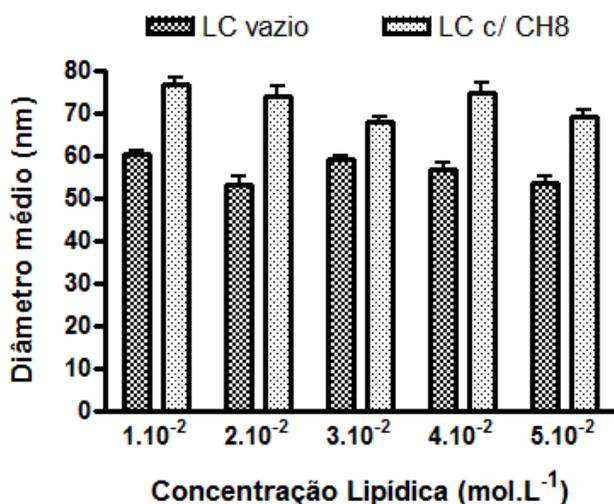


Figura 24 – Influência da encapsulação da chalcona CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios de $1,0 \cdot 10^{-2}$ a $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, determinação em termos de número de vesículas – distribuição (N).

Quando a CH8 foi adicionada a LC vazios a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, a distribuição de tamanhos ficou mais estreita, variando de 64 a 101 distribuição (I) e 50 a 127 de acordo com as distribuição (N), com partículas de 76,3 nm predominantes. Para as outras concentrações lipídicas o diâmetro predominante foi 70 nm.

Analisando estes resultados verifica-se que concentrações lipídicas maiores que $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ reduzem pouco o tamanho dos LC vazios, resultando em uma menor quantidade de fosfolípidios por lipossoma, e uma maior quantidade de lipossomas em solução. A adição de CH8 embora aumente o tamanho dos lipossomas, mantém o mesmo comportamento em relação ao aumento da concentração de lipídios. Para todas as concentrações lipídicas, a análise estatística revelou diferença significativa ($P < 0.001$) entre o diâmetro médio dos LC vazios e contendo CH8.

Relacionando os resultados de diâmetro com a quantidade de CH8 encapsulada (Figuras 22 e 24), pode-se inferir que a curvatura imposta pelos lipossomas de menor tamanho obtidos à concentrações lipídicas maiores que $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, reduz a capacidade da bicamada de acomodação da CH8, reduzindo também a razão molar CH8/EPC. No entanto, esta interpretação não explica a encapsulação obtida a $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, devendo ser melhor investigada por outras caracterizações.

Comparando os resultados de encapsulação com os apresentados no item 4.1.2.1.1., verifica-se a influência do método de preparação no diâmetro das vesículas obtidas com CH8. No primeiro caso, a encapsulação reduziu o tamanho dos lipossomas e neste caso, com lipossomas pré-formados, aumentou em relação aos LC vazios.

Diante desses resultados, a concentração de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, foi selecionada para experimentos de otimização de encapsulação da chalcona CH8 variando as condições de mistura.

De um modo geral, a encapsulação de substâncias ativas em lipossomas depende essencialmente da natureza e da concentração do fosfolipídio, da concentração da substância e das condições de obtenção dos lipossomas. A localização da substância ativa na estrutura lipossomal depende do coeficiente de partição entre as fases aquosa e lipídica, sendo que a quantidade máxima da substância a ser incorporada é dependente da solubilidade total em ambas as fases e do tipo de estrutura do lipossoma (multilamelar ou unilamelar). No caso da CH8, devido ao seu caráter altamente hidrofóbico, a partição é prioritariamente para a bicamada lipídica.

4.1.2.2.1.1. Rendimento em relação ao teor de fosfato

Para os LC vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, o rendimento da preparação dos lipossomas pelo método de Bangham foi de 98 %, e para os lipossomas $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ foi de 100 %. No ensaio fosfato para os LC de $1,0 \cdot 10^{-2}$ a $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, o fosfato foi dosado para os lipossomas vazios e após a encapsulação da chalcona CH8. O rendimento das preparações foi de 95 a 100 %. Após a encapsulação da chalcona CH8 foram realizados cálculos para correção do fosfato

presente na suspensão lipossomal. Portanto, praticamente não houve perdas significativas no processo de para formação filme seco para os lipossomas vazios e durante a encapsulação da chalcona CH8.

4.1.2.2.2. Influência das condições de mistura

Com base nos resultados obtidos, a influência das condições de mistura foi estudada para a os lipossomas na concentração de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, pois estes apresentaram melhores resultados na formação do filme delgado mais uniforme e melhor aspecto após hidratação do filme lipídico, através de observações visuais.

As condições de mistura estudadas foram: agitação mecânica de alto cisalhamento com impelidor pá dentada, agitação mecânica de baixo cisalhamento com impelidor âncora, agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo.

A Figura 25 apresenta a concentração de chalcona CH8 encapsulada através da adição gradativa a LC pré-formados, em função das condições de mistura.

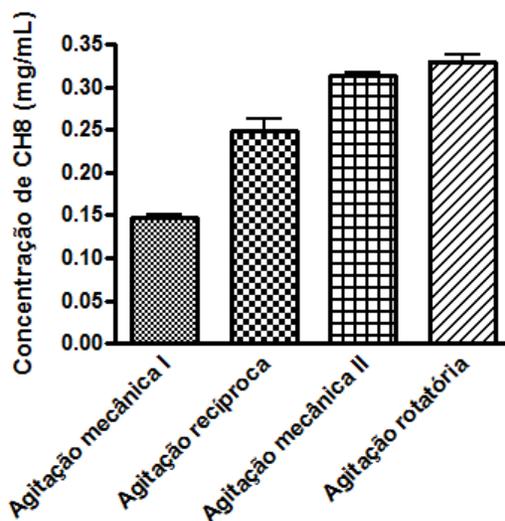


Figura 25 – Concentração de chalcona CH8 (mg/mL) encapsulada através da adição à lipossomas convencionais pré-formados, em função das condições de mistura, agitação mecânica I - alto cisalhamento com impelidor pá dentada;

agitação mecânica II - baixo cisalhamento com impelidor âncora; agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo.

Os resultados mostram que embora a velocidade de agitação tenha sido igual (140 rpm) em todos os casos, houve diferença na concentração da chalcona CH8 encapsulada que variou de 0,149 a 0,329 mg/mL quando a mistura foi feita por agitação mecânica de alto e baixo cisalhamento, agitação recíproca ou com agitação rotatória, respectivamente. Esse comportamento deve-se às diferenças no contato entre a chalcona CH8 e os lipossomas, ou mesmo aos diferentes níveis de cisalhamento impostos por cada condição. A agitação mecânica de alto cisalhamento apresentou diferença significativa ($P < 0.001$) quando comparada aos demais níveis de cisalhamento (agitação recíproca, rotativa e baixo cisalhamento). No entanto, quando a mistura foi feita por agitação rotatória e agitação mecânica de baixo cisalhamento não houve uma diferença significativa ($P > 0.05$), com concentração variando de 0,318 a 0,329 mg/mL, o que pode estar relacionado ao tipo de agitação mais branda imposta, sendo estas duas agitações consideradas brandas, favorecendo a encapsulação. A encapsulação do fármaco parece necessitar de um tempo mais prolongado de contato com a membrana lipídica, para a sua acomodação adequada.

Como se pode observar nos resultados obtidos, a dosagem da chalcona CH8 apresenta valores muito reduzidos se comparados aos requeridos terapeuticamente para o fármaco na forma livre. Nas condições do balão rotatório a concentração de CH8 (0,329 mg/mL) representa aproximadamente um terço da dose usual e recomendada para a chalcona CH8 livre. Entretanto, vários trabalhos na literatura registram aumento na eficiência terapêutica de fármacos encapsulados em lipossomas.

A encapsulação em função da razão molar fármaco/lipídio (CH8/EPC) é apresentada na Figura 26, para as diferentes condições de mistura no processo de encapsulação da chalcona CH8.

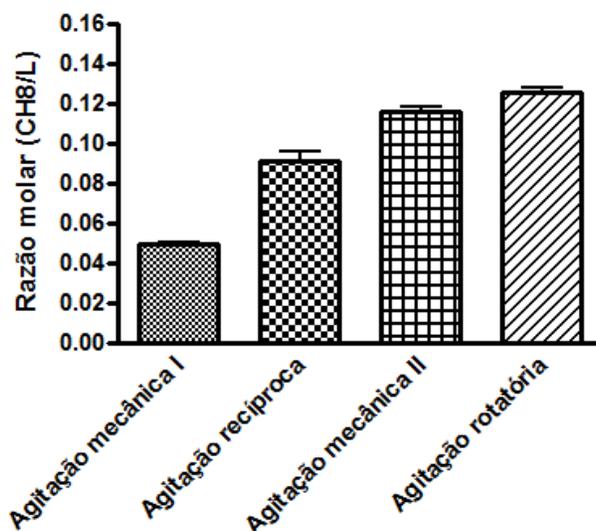


Figura 26 – Razão molar fármaco/lipídio (CH8:EPC) para as diferentes condições de mistura: agitação mecânica I - alto cisalhamento com impelidor pá dentada; agitação mecânica II - baixo cisalhamento com impelidor âncora; agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo.

Analisando os resultados, pode-se observar que a razão molar CH8:EPC diminuiu com a agitação mecânica de alto cisalhamento, sendo significativa ($P < 0.001$), no entanto, a agitação mecânica de baixo cisalhamento e a agitação rotatória se mostram semelhantes ($P > 0.05$), sendo estas duas condições de mistura consideradas brandas e por isso não apresentam diferenças significativas. Para as demais condições de mistura (recíproca, rotatória e baixo cisalhamento), apesar do nível de agitação ter sido o mesmo (140 rpm), o método de mistura utilizando agitação rotatória, apresentou maior proporção CH8:EPC (0,13) o que corresponde a uma incorporação molar um pouco maior que 10% de chalcona CH8 em relação ao total de fosfolipídio.

A Tabela 5 e a Figura 27 mostram a influência da encapsulação da chalcona CH8 no diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas pré-formados, em função das diferentes condições de mistura – agitação mecânica de alto cisalhamento com impelidor pá dentada, agitação mecânica de baixo cisalhamento com impelidor âncora, agitação recíproca com Shaker e agitação rotatória com balão rotativo.

Tabela 5 – Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em função das diferentes condições de mistura.

Condições de mistura	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC Vazio)	46 – 233	100	$104,1 \pm 3,8$	46 – 153	100	$60,5 \pm 2,9$
Agitação mecânica I (alto cisalhamento)	48 – 194	100	$117,2 \pm 4,4$	39 – 194	100	$61,8 \pm 4,0$
Agitação recíproca	43 – 217	100	$117,9 \pm 6,3$	34 – 217	100	$61,1 \pm 3,7$
Agitação mecânica II (baixo cisalhamento)	41 – 305	100	$126,5 \pm 7,5$	41 – 185	100	$64,5 \pm 2,8$
Agitação rotatória	64 – 101	97,5	$86,5 \pm 3,3$	50 – 127	100	$76,3 \pm 3,8$
	2025 - 2600	2,5	$25550,0 \pm 22,0$			

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

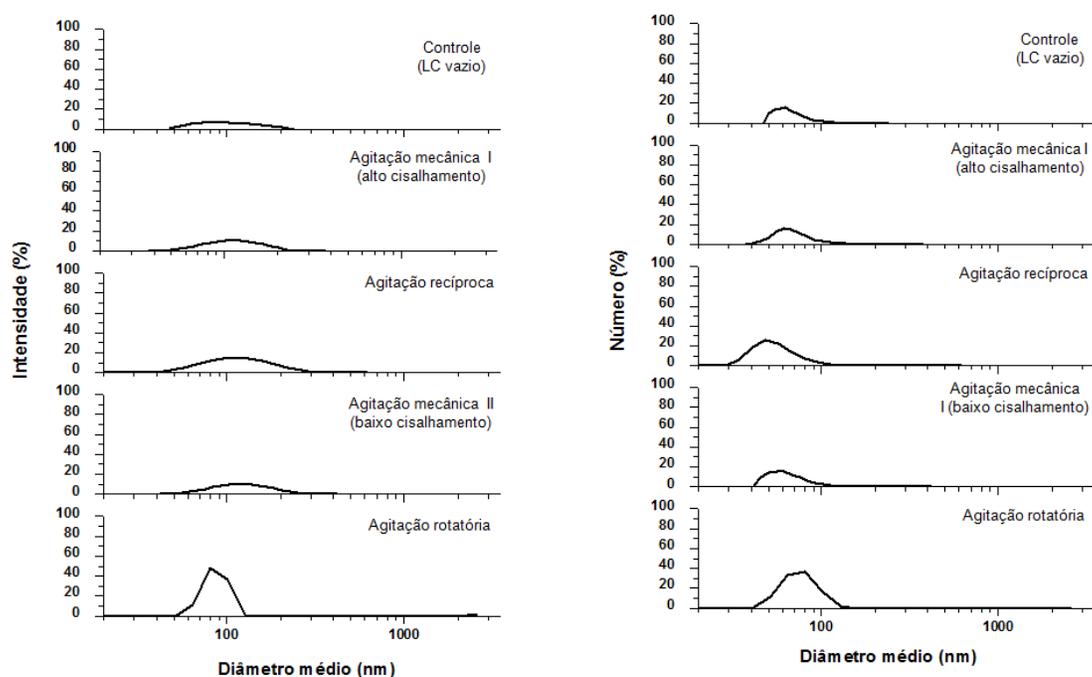


Figura 27 – Evolução gráfica da encapsulação da chalcona CH8 na variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em função das diferentes condições de mistura.

Os LC vazios a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹, apresentaram distribuição larga de tamanhos, variando de 46 a 233 nm distribuição (I) e de 46 a 153 nm de acordo com a distribuição (N), porém, predominam as partículas de 60,5 nm. Para os lipossomas contendo chalcona CH8 encapsulada pelo método de agitação mecânica de alto cisalhamento, agitação recíproca e agitação rotatória, as vesículas apresentaram diâmetro médio de 61,8; 61,1; 64,5 e 76,3 nm predominantes.

Como a encapsulação da CH8 em lipossomas pré-formados aumenta o seu diâmetro médio, como demonstrado anteriormente (item 4.1.2.2.2.1.), os maiores diâmetros foram obtidos com as agitações de baixo cisalhamento.

Analisando os resultados de encapsulação da CH8 apresentados nos itens 4.1.2.2.2.1. e 4.1.2.2.2.2., a dispersão lipossomal a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ contendo chalcona CH8 encapsulada pelo método de baixo cisalhamento apresentou maior eficiência de encapsulação. Portanto, a agitação com balão rotativo foi selecionada para os estudos subsequentes. A agitação com agitador de âncora apresenta-se promissora para o escalonamento de processos.

4.1.2.2.2.3. Identificação da saturação da bicamada lipídica

Espectros de varredura em UV/VIS da CH8 no solvente acetonitrila, devido a maior solubilidade da CH8 (Figura 28) foram obtidos para identificar com maior precisão, a capacidade de incorporação da CH8 na bicamada lipídica.

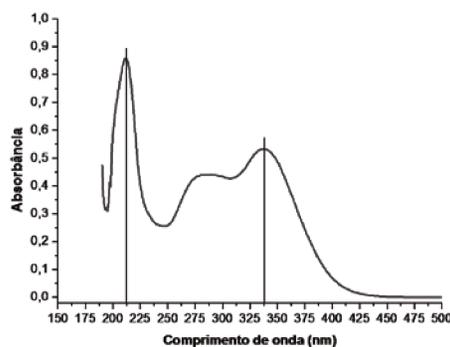


Figura 28 – Espectro de varredura UV/VIS da chalcona CH8 no solvente acetonitrila.

Os resultados mostram que em meio orgânico e em baixas concentrações, a chalcona CH8 tem um espectro de absorção na região do UV, com duas bandas maiores localizadas nas faixas de 325 a 375 nm e 200 a 250 nm. Estes resultados confirmam o comprimento de onda máximo referenciado em literatura de $\lambda = 337$ nm (Boeck *et al.*, 2006).

A presença de chalcona CH8 nos lipossomas foi acompanhada por espectrofotometria de varredura, à medida que a CH8 era adicionada aos lipossomas pré-formados, pelo método do balão rotativo. Os espectros da varredura são apresentados na Figura 29.

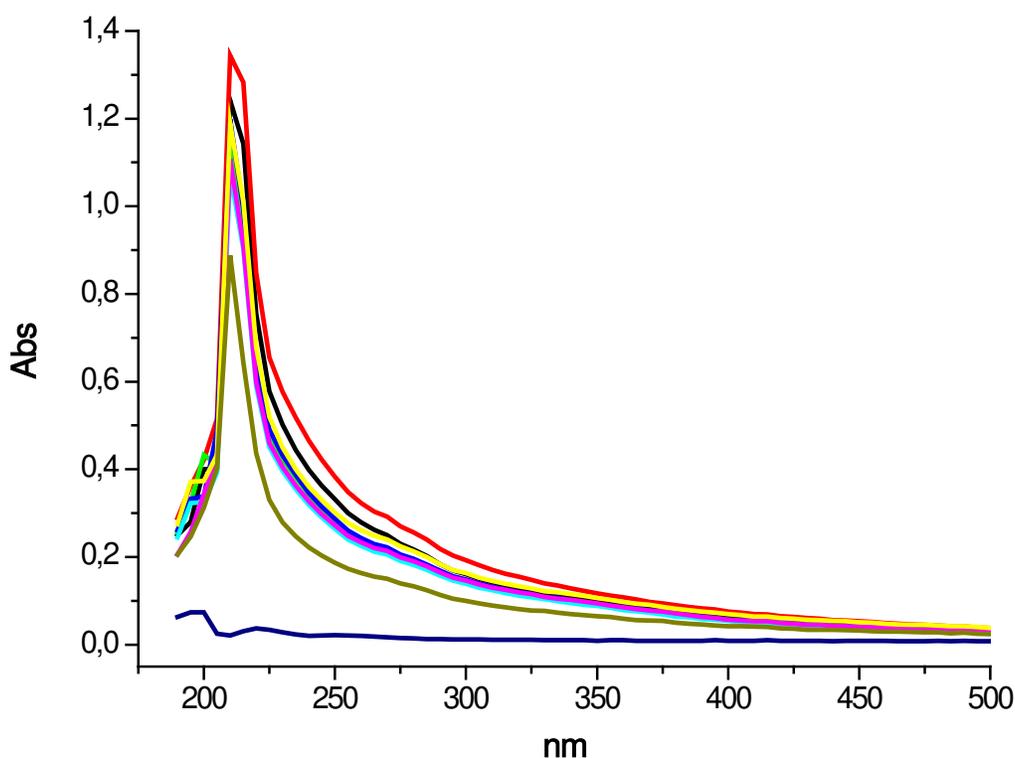


Figura 29 – Espectro de varredura dos lipossomas em presença de CH8. Varredura para lipossomas vazios (—), lipossomas contendo: 0,078 mg/mL de CH8 (—), 0,149 mg/mL de CH8 (—), 0,215 mg/mL de CH8 (—), 0,274mg/mL de CH8 (—), 0,329 mg/mL de CH8 (—), 0,379 mg/mL de CH8 (—), 0,548 mg/mL de CH8 (—) e CH8 em presença de tampão HEPES(—).

Na região do espectro de varredura de 200 a 250 nm, foi verificado que ocorre uma absorção. Os espectros mostram alteração da absorção no

comprimento de onda de 205 a 215 nm, no qual os lipossomas foram detectados. O espectro da chalcona CH8 na forma livre, parcialmente solubilizada em tampão HEPES, é apresentado em azul mais escuro, o primeiro espectro e mais deslocado dos demais. Os perfis decresceram em intensidade com relação ao perfil do lipossoma vazio (em preto), exceto o vermelho, identificando a presença da chalcona encapsulada nos lipossomas. O decréscimo foi proporcional à quantidade de chalcona encapsulada. Uma vez que os lipossomas foram diluídos em HEPES, e supõe-se que toda a chalcona adicionada foi encapsulada nos lipossomas, não foi detectado o pico na região de 337 nm característica da absorção da chalcona CH8 livre. A máxima capacidade de encapsulação foi identificada em 0,329 mg/mL de CH8 (curva rosa), a partir da qual observava-se precipitação da CH8. Estes resultados corroboram com o anteriormente apresentado no item 4.1.2.2.2.

4.1.2.2.4. Estabilidade Coloidal ao longo da estocagem

A estabilidade física pode estar relacionada ao rompimento das vesículas com o concomitante extravasamento do material encapsulado ou a agregação das partículas menores formando vesículas multilamelares grandes (Talsma *et al.*, 1992).

As avaliações da estabilidade de lipossomas são de grande interesse para sua aplicação como veículos de formulações farmacêuticas. Como parâmetro de estabilidade das preparações de lipossomas contendo chalcona CH8, o tamanho das vesículas foi acompanhado em função do tempo de armazenamento.

Uma vez que os lipossomas a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC contendo chalcona CH8 encapsulada pelo método de balão rotativo, apresentaram maior eficiência de encapsulação, a estabilidade coloidal das vesículas foi analisada nessas condições de preparação. A estabilidade coloidal (Tabela 6) foi analisada por um período de 30 dias de armazenamento sob refrigeração (8 °C).

Tabela 6 – Perfil de estabilidade coloidal em relação ao tempo, em termos de diâmetro médio e distribuição, para lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ contendo chalcona CH8, mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de 30 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
0	67 – 213	99,7	$113,7 \pm 4,0$	53 – 213	100	$86,4 \pm 3,1$
1	26 – 356	100	$160,1 \pm 4,6$	21 – 160	100	$37,7 \pm 1,2$
2	31 – 46	14,5	$40,8 \pm 1,8$	25 – 56	99,8	$39,2 \pm 2,4$
	125 – 229	84,1	$166,8 \pm 3,8$	125 – 153	0,2	$139,9 \pm 9,9$
5	53 – 63	25	$61,2 \pm 2,4$	45 – 75	99,4	$59,4 \pm 2,0$
	176 – 209	75	$181,1 \pm 4,3$	149 – 209	0,6	$164,5 \pm 12,0$
10	17 – 20	4,1	$18,7 \pm 1,1$	17 – 25	99,9	$48,6 \pm 1,5$
	69 – 933	95,1	$159,7 \pm 5,7$			
15	45 – 53	17,4	$47,3 \pm 1,7$	38 – 63	99,7	$46,5 \pm 3,4$
	149 – 176	82,3	$173,9 \pm 5,1$	149 – 209	0,3	$178,3 \pm 14,4$
20	50 – 61	1,5	$55,9 \pm 4,3$	50 – 61	90,3	$56,1 \pm 1,6$
	168 – 185	98,5	$173,6 \pm 2,9$	152 – 205	9,7	$172,4 \pm 21,7$
25	67 – 90	45,4	$78,1 \pm 3,4$	60 – 100	99,6	$75,3 \pm 4,1$
	183 – 247	54,6	$222,4 \pm 8,5$	183 – 247	0,4	$214,3 \pm 29,8$
30	30 – 37	7,9	$33,0 \pm 3,2$	25 – 46	99,7	$32,0 \pm 3,2$
	102 – 186	90,7	$140,0 \pm 5,4$	102 – 152	0,3	$126,8 \pm 5,1$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s - desvio padrão.

Os resultados mostram que as amostras preparadas apresentaram inicialmente somente uma população de vesículas, nas faixas de 67 a 213 nm e 53 a 213 nm de acordo com as distribuições (I) e (N) respectivamente, com predominância das partículas de 86,4 nm (distribuição N). A partir do segundo dia de armazenamento, duas populações de vesículas foram observadas, com variação de diâmetro médio inicial de aproximadamente 55% se mantendo até os trinta dias com duas populações de vesículas. A variação no diâmetro médio pode ser muito provavelmente pelo rearranjo imposto pelas moléculas de chalcona CH8 na organização das bicamadas lipídicas. Embora não fosse observada nenhuma precipitação, considera-se que a formulação é instável na forma líquida sob refrigeração, devendo ser armazenada na forma sólida.

4.1.2.2.5. Morfologia

Na Figura 30, pode-se visualizar as microscopias dos LC contendo chalcona CH8 encapsulada com agitação branda (balão rotativo).

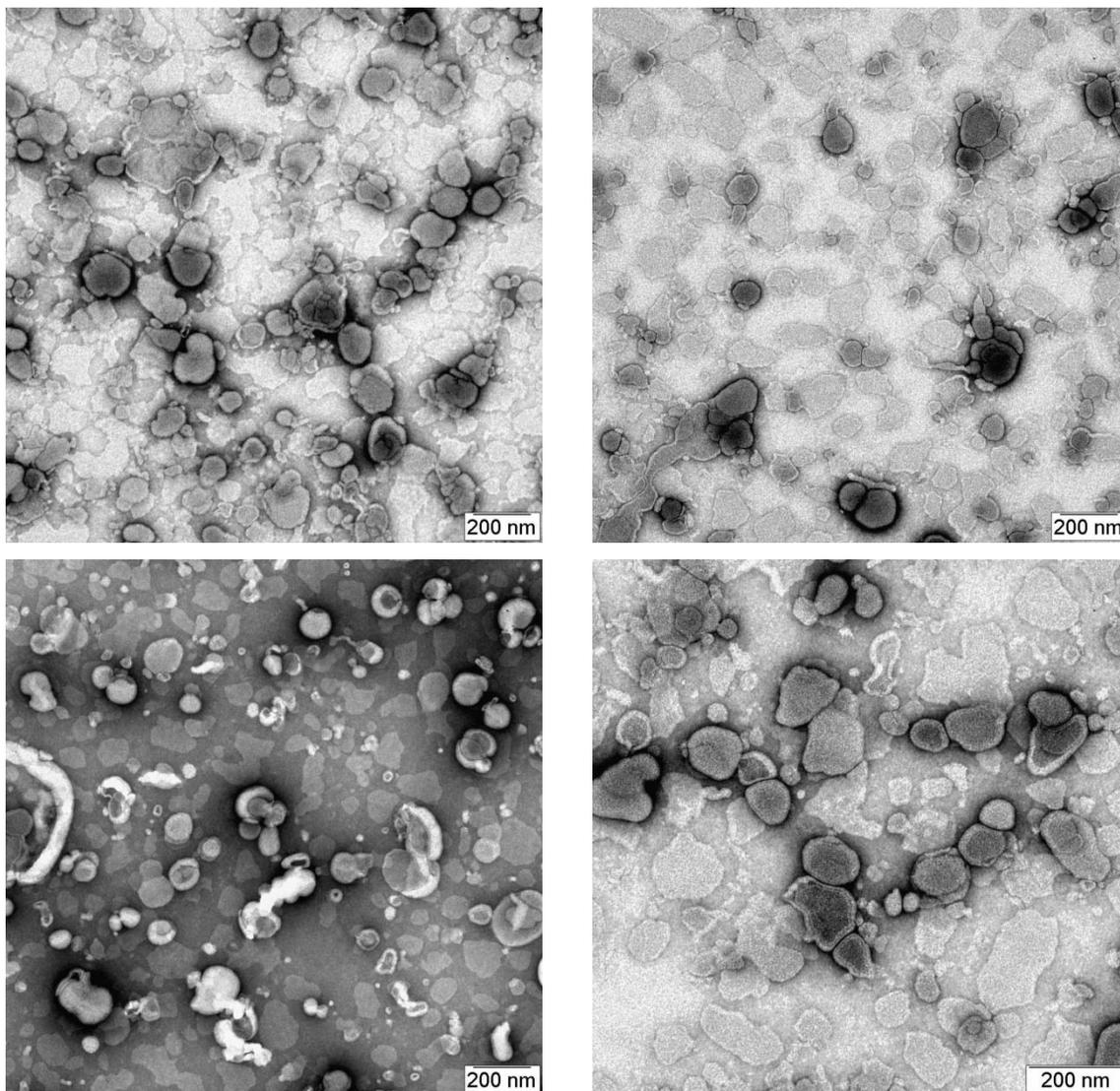


Figura 30 – Morfologia dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada.

Os LC com chalcona CH8 encapsulada mantêm a característica aproximadamente esférica dos LC vazios. Portanto, a chalcona CH8 inserida nas bicamadas não modifica significativamente a morfologia dos LC vazios.

4.2. Lipossomas Peguilados

A preparação dos lipossomas peguilados (LP) foi realizada através da incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais. A incorporação de PEG-8L em lipossomas ocorre com sua migração para a bicamada lipídica, onde as cadeias de ácido graxo se inserem entre as cadeias de fosfolipídios, e a porção de PEG modifica a superfície das vesículas através de uma camada hidratada pelas caudas da cadeia polimérica.

O efeito global é um distúrbio no empacotamento da bicamada lipídica na membrana, induzindo a desestabilização e uma alta propensão para estruturas curvas tais como micelas. Como uma consequência disto, a energia necessária para a deformação é diminuída permitindo que as vesículas adquiram formas transitórias mantendo sua integridade. Devido a esses efeitos os lipossomas peguilados são também chamados de lipossomas elásticos ou deformáveis (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005)

A incorporação do PEG-8L foi feita nos LC a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de EPC, contendo CH8 adicionada ao filme lipídico ou adicionada a lipossomas pré-formados pelo método do balão rotativo. Os LC vazios na mesma concentração foram usados como controle para a análise da peguilação. A proporção utilizada para preparar os lipossomas peguilados foi 60% de fosfolipídio para 40% de PEG-8L (v:v), ambos em concentrações molares. A incorporação do PEG-8L aos LC foi acompanhada através da variação de diâmetro médio e distribuição de tamanhos (nm), ao longo do tempo de incubação. Como comparativo, temos na Tabela 7 a distribuição de tamanhos e o diâmetro médio da solução do tensoativo PEG-8L livre. Adicionalmente, a peguilação também foi analisada pela variação da tensão superficial e potencial zeta.

Tabela 7 – Diâmetro médio, % de ocorrência da população e distribuição de tamanho do tensoativo PEG-8L livre em solução de tampão HEPES.

Intensidade (I)			Número (N)		
Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
42,8 – 270,6	99,9	112,0 \pm 2,4	34 – 170,7	100	156,1 \pm 7,6

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

A solução de tensoativo de PEG-8L apresentou uma população com diâmetro de 112,0 quando foi analisada por intensidade de luz espalhada e de 156,1 para número de ocorrências.

4.2.1. Lipossomas vazios

4.2.1.1. Incorporação do PEG-8L

A Tabela 8 apresenta a distribuição de tamanhos dos lipossomas após a incorporação do PEG-8L por um período de 24 horas, estes resultados são apresentados graficamente na Figura 31 por um período de 1 hora e na Figura 32 por um período de 24 horas.

Tabela 8 – Cinética de incorporação do PEG-8L em lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do tempo de incubação acompanhadas por um período de 24 horas.

Tempo (h)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
0	34 – 54	11,9	$43,0 \pm 8,7$	34 – 54	98,7	$43,6 \pm 3,3$
	108 – 171	87,5	$131,9 \pm 26,9$	85 – 171	1,3	$124,6 \pm 24,5$
0,25	36 – 48	24,6	$42,7 \pm 5,3$	36 – 51	99,6	$41,7 \pm 3,7$
	119 – 158	75,4	$137,8 \pm 33,4$	119 – 148	0,4	$133,6 \pm 32,8$
0,50	51 – 55	31	$53,8 \pm 12,2$	47 – 59	99,3	$53,4 \pm 4,8$
	146 – 157	69	$147,5 \pm 18,9$	136 – 157	0,7	$146,9 \pm 26,3$
0,75	51 – 54	34,7	$54,6 \pm 9,5$	47 – 58	99,1	$54,5 \pm 1,9$
	135 – 145	65,3	$145,7 \pm 31,8$	135 – 156	0,9	$143,7 \pm 16,9$
1	47 – 64	32,5	$55,2 \pm 3,6$	43 – 71	98,8	$52,6 \pm 4,6$
	106 – 175	67,5	$137,9 \pm 24,8$	96 – 158	1,2	$126,6 \pm 18,3$
2	41 – 48	21,5	$44,6 \pm 6,4$	36 – 55	99,1	$43,7 \pm 3,6$
	111 – 128	78,5	$124,7 \pm 17,9$	96 – 147	0,9	$121,3 \pm 19,1$
5	53 – 58	31,6	$54,7 \pm 7,6$	48 – 65	99,2	$54,3 \pm 5,9$
	131 – 145	68,4	$144,3 \pm 42,8$	131 – 160	0,8	$145,4 \pm 23,9$
10	42 – 48	23,8	$44,2 \pm 2,9$	39 – 51	99,6	$44,0 \pm 2,6$
	129 – 148	76,2	$139,5 \pm 18,6$	129 – 148	0,4	$138,5 \pm 31,6$
15	63 – 84	90,7	$74,9 \pm 11,9$	55 – 97	100	$71,4 \pm 6,9$
	225 – 258	9,3	$246,5 \pm 43,9$			
20	14 – 27	8,5	$19,7 \pm 2,8$	14 – 32	99,6	$16,6 \pm 2,4$
	39 – 213	91,2	$96,9 \pm 16,5$	39 – 65	0,4	$51,3 \pm 9,9$
24	45 – 49	16,3	$46,0 \pm 6,9$	42 – 52	99,1	$46,0 \pm 8,4$
	122 – 140	58,9	$129,3 \pm 23,2$			
	173 – 198	24,7	$185,7 \pm 33,8$			

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão o.

Após incubação com PEG, os lipossomas apresentam duas populações de vesículas, uma população com menor diâmetro e maior porcentagem populações, característica dos lipossomas e, outra população com maior diâmetro e menor porcentagem de populações, características do PEG livre. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2007), com lipossomas preparados a partir de lecitina de ovo comercial, produzida pela Degussa.

Para os LC a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, houve uma predominância de partículas de 60,5 nm, determinado por distribuição (N). Os LP vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, apresentaram inicialmente duas populações de vesículas, com uma distribuição (I) larga de tamanhos, variando de 108 a 171 nm e de 34 a 54 nm para distribuição (N). Porém, predominam as partículas de 43,6 nm, como determinado pela distribuição (N). Após 24 horas de incubação, as partículas com 46 nm (distribuição N) foram predominantes. Ao longo do tempo de incubação, houve uma variação no diâmetro médio de aproximadamente 10%. O diâmetro médio dos LP vazios se mostrou menor em praticamente todos os tempos analisados, devido à re-estruturação lipídica em consequência da incorporação do PEG-8L.

A Análise de tamanho demonstra que a presença de PEG-8L reduz o diâmetro médio dos LC (60 nm). A distribuição prévia monodispersa muda para duas populações por volta de 50 e 100 nm, predominando a população de menor tamanho, O equilíbrio de partição foi atingido em 24 horas, onde o PEG-8L foi distribuído entre a membrana lipídica e as micelas, as quais coexistem em solução.

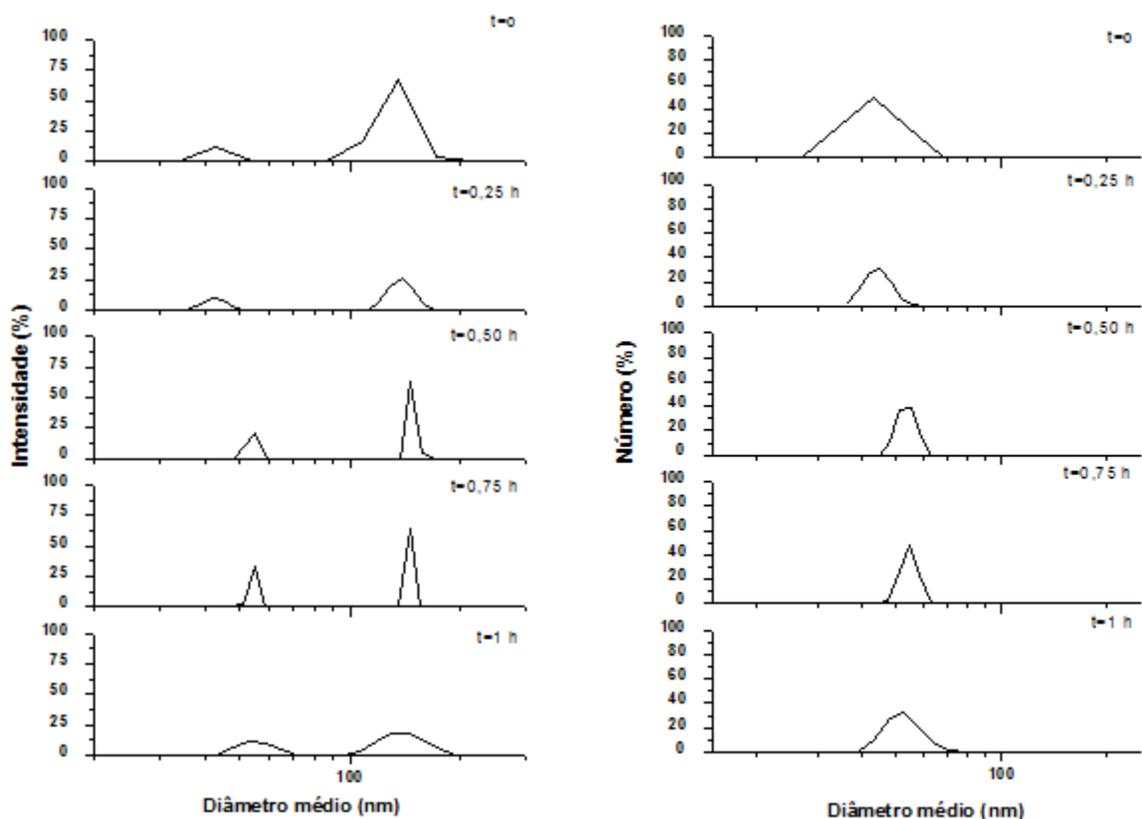


Figura 31 – Evolução da cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 1 hora. t=0 – imediatamente após a adição do PEG-8L.

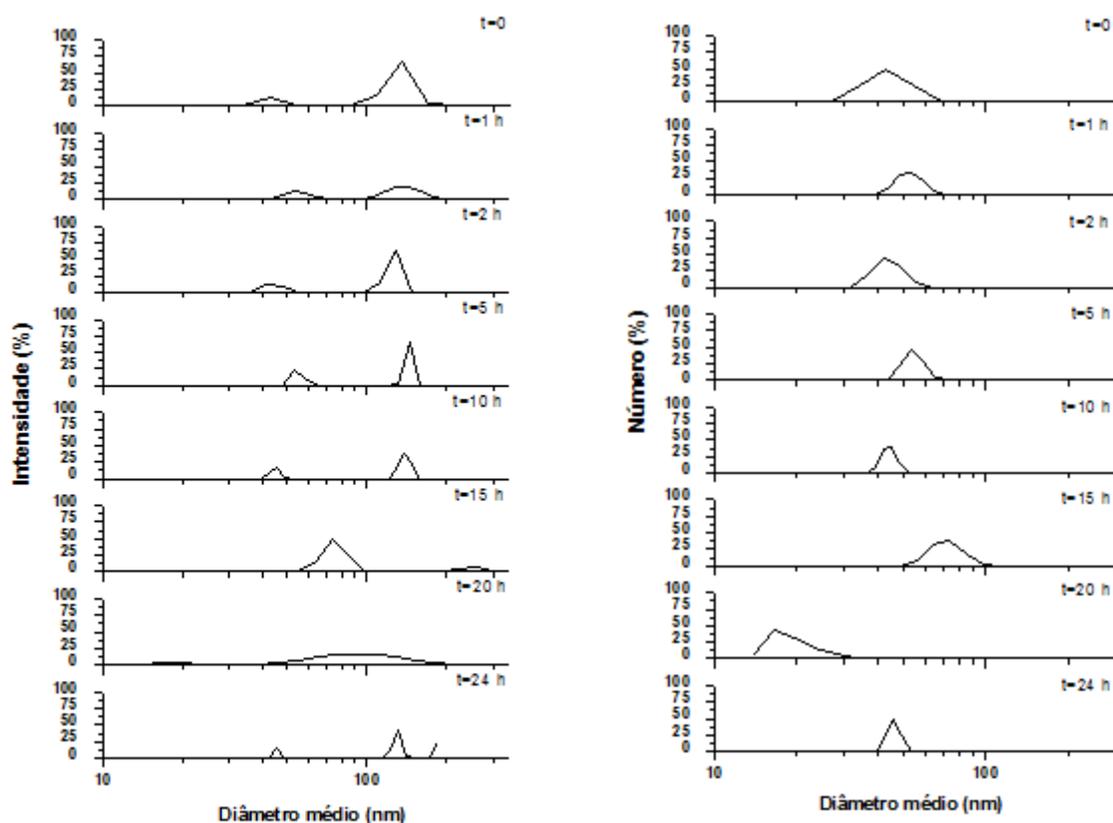


Figura 32 – Evolução da cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 24 horas. t=0 – imediatamente após a adição do PEG-8L.

4.2.1.2. Morfologia

A morfologia dos LP vazios, compostos de lecitina de ovo e PEG-8L (60:40), pode ser visualizada na Figura 33. Na Figura 34 fez-se uma comparação das vesículas convencionais e peguizadas.

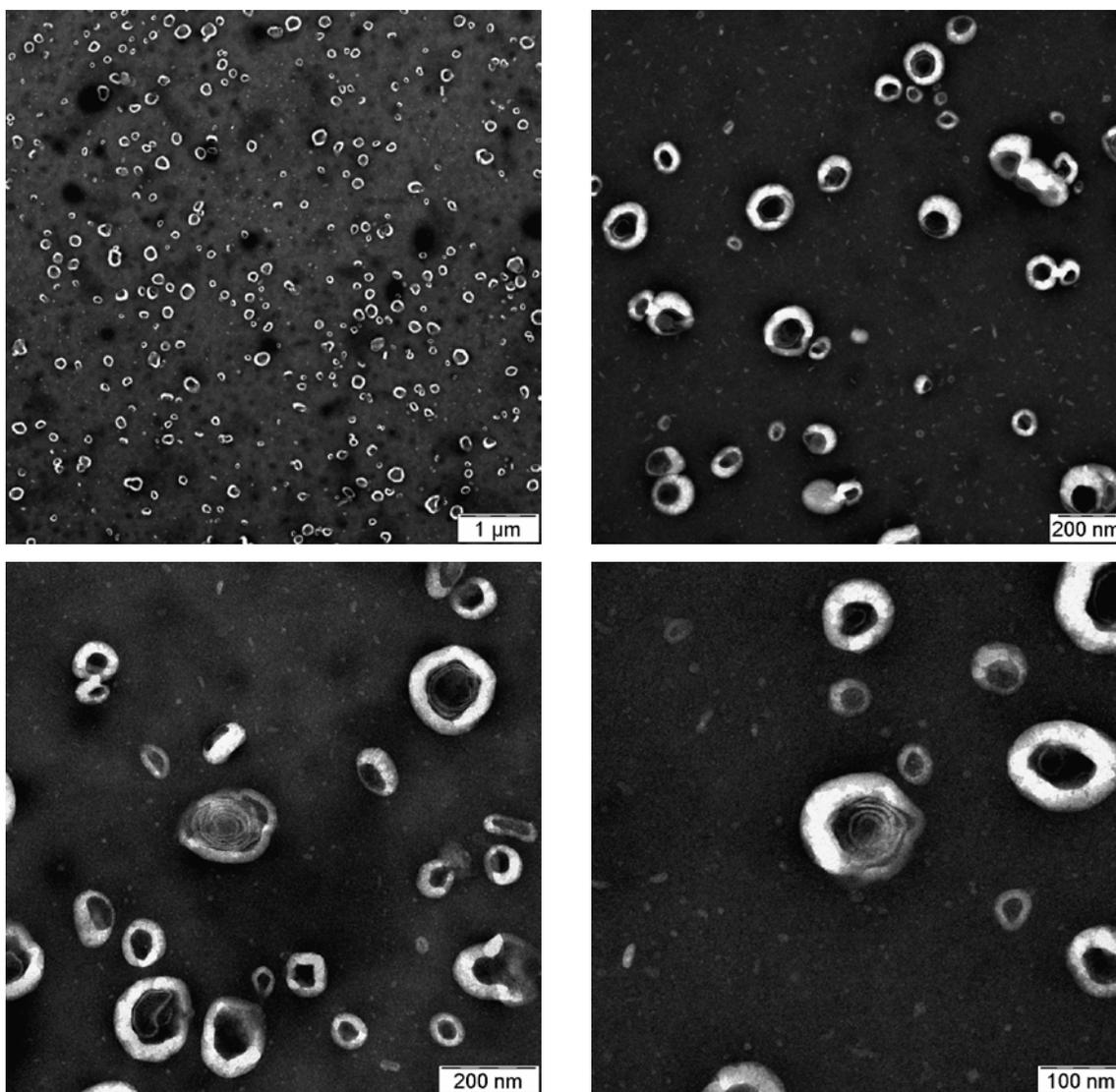


Figura 33 – Morfologia dos lipossomas peguilados vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) e PEG-8L (60:40).

A análise por MET revelou vesículas esféricas com um contorno espesso e mais claro que o interior das vesículas, apresentando uma melhor definição do delineamento da superfície dos lipossomas. Essa melhor definição deve ser provavelmente devido à presença do PEG inserido na superfície da bicamada lipídica. Devido às perturbações resultantes da incorporação do PEG-8L, pode-se também observar a presença de mais de uma lamela compondo a região lipídica dos lipossomas.

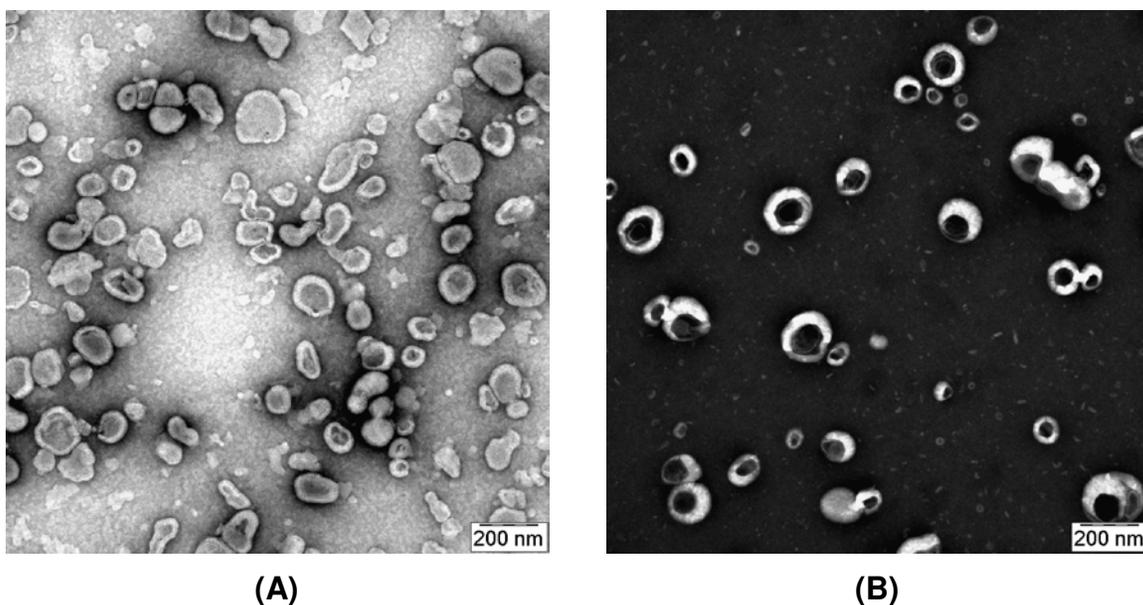


Figura 34 – Morfologia dos lipossomas convencionais vazios (A) e lipossomas peguilados vazios (B) após incubação com PEG-8L por 24 horas.

De acordo com o apresentado acima, nota-se que os LP se diferem dos LC, embora mantendo a característica aproximadamente esférica. No entanto, a bicamada se apresenta com um contorno mais homogêneo e espesso com certa luminosidade ao redor da vesícula, produzida pela inserção do PEG na bicamada lipídica, conforme já identificado anteriormente por Lasic (1993).

4.2.1.3. Tensão Superficial

A incorporação do PEG-8L foi também analisada por medidas da tensão superficial da solução aquosa de PEG-8-L livre na faixa de concentrações ($1 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e adicionado aos LC vazios. A tensão superficial do PEG-8-L livre e a sua curva para determinação da concentração micelar crítica (CMC) são mostradas na Figura 35 A e B, respectivamente. A Figura 36 mostra os resultados de tensão superficial acompanhada ao longo de 48 horas, quando o PEG-8L, na mesma faixa de concentração acima indicada, foi adicionado aos LC vazios. Os efeitos comparativos na tensão superficial do PEG-8L livre e incorporado aos LC vazios são apresentados na Figura 37.

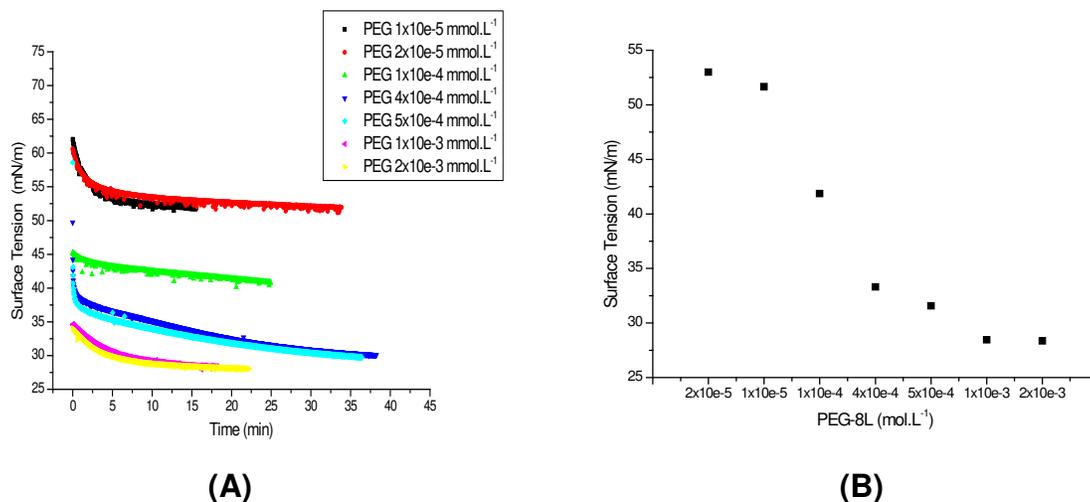


Figura 35 – Influência da concentração de PEG-8L na tensão superficial (A) e curva para determinação da CMC do PEG-8L livre (B).

De acordo com as curvas cinéticas das Figuras 35 A e 36 pode-se dizer que o equilíbrio nas medidas foi praticamente instantâneo em todas as situações. Não houve mudanças significativas na tensão superficial nas 48 horas de incubação dos LC com o PEG-8-L nas várias concentrações. Portanto, o tempo de 1 hora de incubação foi adotado nos experimentos de incorporação do PEG-8L, para garantir o estabelecimento do equilíbrio. Da Figura 35 B conclui-se que a concentração micelar crítica (CMC) do PEG-8-L em água situa-se em torno da concentração $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, e é da ordem de 28 mN/m.

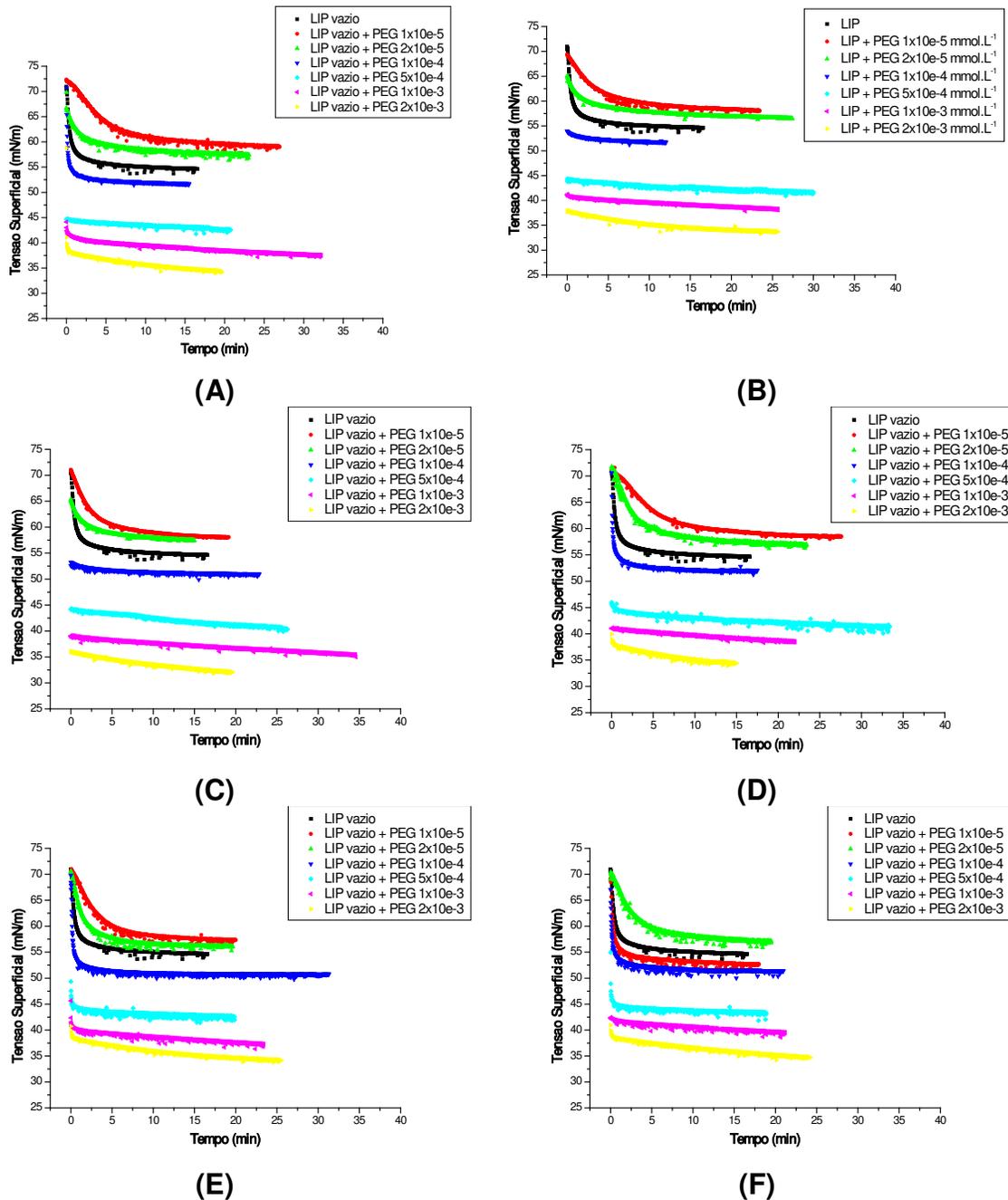


Figura 36 – Cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais vazios, (A) tempo 0, imediatamente após adição do PEG-8L, (B) 3 horas, (C) 6 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas e (F) 48 horas após incubação.

A Figura 37 foi construída para analisar o equilíbrio entre o PEG-8L incorporado e não incorporado, abaixo representado, e estabelecido durante a

incubação. Considerando que não houve mudanças relevantes nos valores de tensão superficial, durante as 48 horas de incubação, o gráfico da Figura 37 foi construído com uma média dos valores de tensão superficial nos vários tempos (0 a 48 h), para cada concentração de PEG-8L.

PEG não incorporado \xrightleftharpoons{K} PEG incorporado (LIP + PEG)

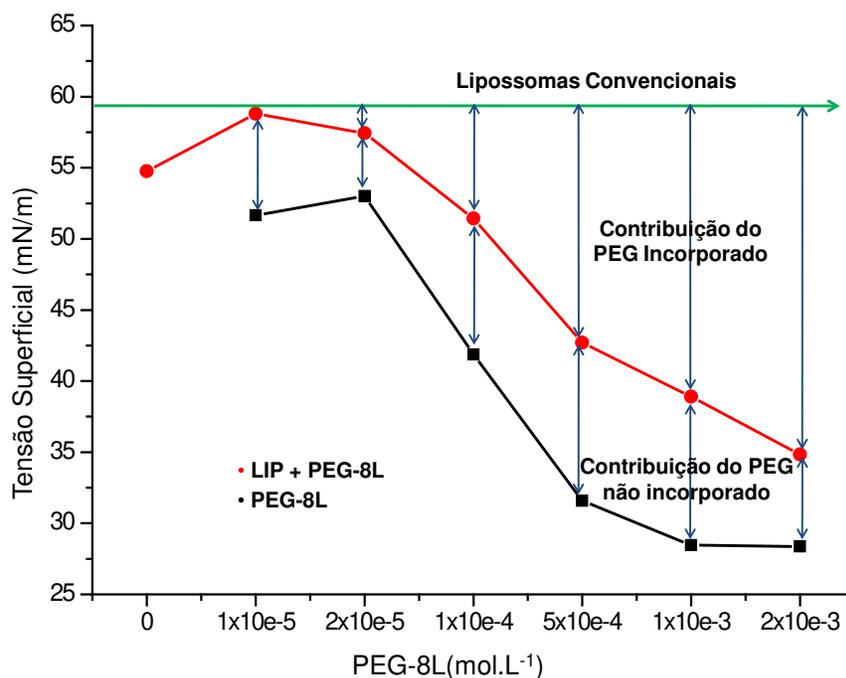


Figura 37 – Tensão superficial em função da concentração do PEG-8L livre e adicionado a lipossomas convencionais vazios.

Os resultados obtidos mostram que a tensão superficial dos LC é maior que a do PEG-8L livre, e a adição de PEG-8L modifica a tensão superficial desses em toda a faixa de concentração. À concentração tão baixa quanto $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, há um aumento da tensão superficial dos LC, devido à hidrofiliçidade da superfície ar-água, conferida pela adição do PEG-8L. Com o aumento da concentração de PEG-8L, a redução da tensão superficial evidencia a sua incorporação na bicamada lipídica. A Figura 38 esquematiza a distribuição das moléculas de lipídio e PEG-8L entre a superfície ar-água e o seio da solução nas várias concentrações de PEG-8L adicionadas aos LC.

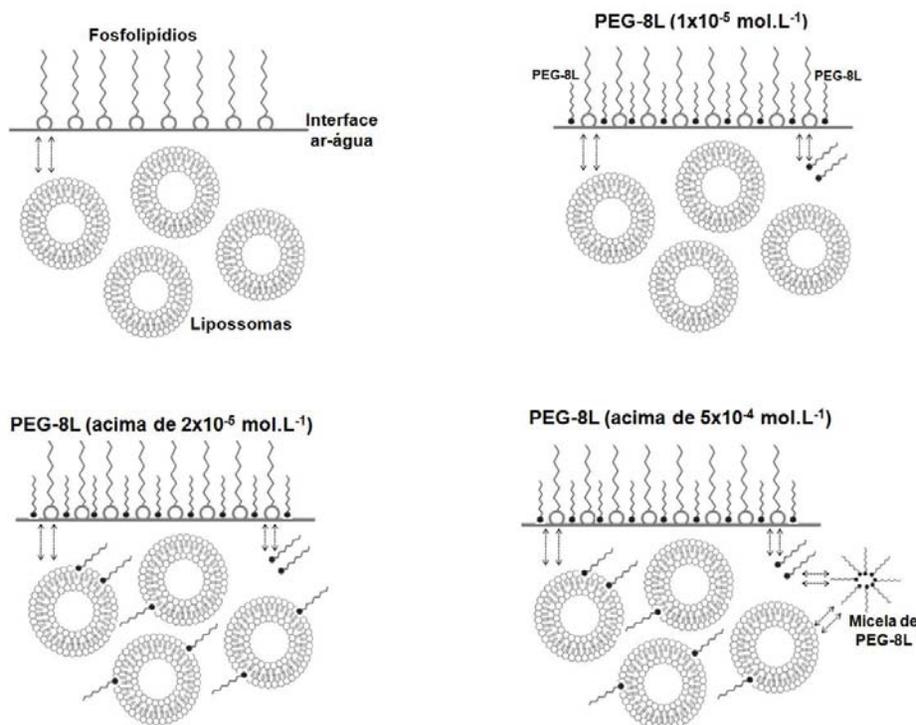


Figura 38 – Representação esquemática da distribuição das moléculas de lipídio e PEG-8L entre a superfície ar-água e o seio da solução nas várias concentrações de PEG-8L adicionadas aos lipossomas convencionais na incubação.

Para quantificar a proporção relativa do PEG-8L incorporado e não incorporado em solução, traçou-se uma linha de referência no valor da tensão superficial 60 mN/m, a partir da qual foi iniciada a redução. A diferença entre o valor da tensão superficial dos lipossomas após a adição do PEG-8L (curva em vermelho) e a linha de referência, caracteriza a contribuição do PEG-8L incorporados aos lipossomas. Já a contribuição do PEG-8L não incorporado, pode ser caracterizada pela diferença entre o valor de tensão superficial do PEG-8L livre (curva preta) e dos lipossomas após adição do PEG-8L (curva vermelha).

A partir dessas considerações, os cálculos, cujo detalhamento é mostrado no Anexo VI, foram feitos para a concentração adicionada de PEG-8L $4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, que corresponde à proporção molar 60:40 EPC:PEG, usada na preparação dos lipossomas. Dos resultados obtidos tem-se que:

Razão entre as tensões superficiais LIP+PEG / PEG livre: 1,42

Considerando o comportamento linear entre a tensão superficial e a concentração de PEG na faixa de $2 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹.

PEG incorporado em lipossomas (LIP+PEG): $2 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹

PEG não incorporado: $2 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹

Portanto, no equilíbrio, 50 % do PEG adicionado é incorporado nos LC e 50 % permanece distribuído entre superfície ar-água e predominantemente na forma de micelas em solução.

Considerando 60 nm como o diâmetro médio dos lipossomas, tem-se:

Número de lipossomas dispersão: $2,2 \times 10^{16}$ lipossomas.L⁻¹

Número de moléculas de PEG-8L incorporadas: 4450 moléculas/lipossoma (aproximadamente).

Estes resultados mostram que na formulação de lipossomas preparada na proporção molar 60:40 EPC:PEG, coexistem PEG-8L livre e incorporado em lipossomas, e que as 6000 moléculas de PEG/lipossoma são responsáveis por grande parte da densa camada branca localizada na superfície dos lipossomas como mostrado nas micrografias da Figura 33.

4.1.1.1. Potencial zeta

Partículas em suspensão apresentam acúmulo de carga superficial que origina um potencial elétrico (potencial zeta - ζ). A medida desta propriedade permite obter informações sobre a estabilidade do sistema e de como as propriedades superficiais são modificadas nos processos e formulações. A Figura 39 apresenta a influência coloidal, da adição de PEG-8L, nas várias concentrações, aos LC vazios.

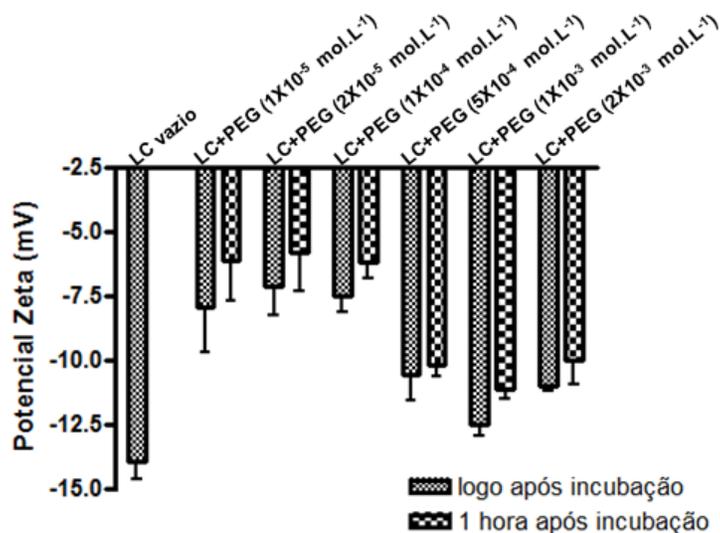


Figura 39 – Influência coloidal da adição de PEG-8L nas várias concentrações aos lipossomas convencionais vazios.

Os resultados de potencial zeta, obtidos e apresentados na Figura 39 revelam valores situados entre -5,85 e -13,97 para as várias concentrações de PEG-8L. Em todas as concentrações, o potencial zeta decresce após 1h incubação. Os LC vazios possuem o maior potencial zeta em valor absoluto, o qual decresce com a adição de PEG-8L. Os valores absolutos mais baixos foram até a concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de PEG-8L, os quais crescem expressivamente na faixa de $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Este comportamento demonstra a distribuição do PEG-8L incorporado nos LC e na forma de micelas em solução, como esquematizado na Figura 38.

4.2.1.5. Toxicidade

A determinação da toxicidade das formulações lipossomais é imprescindível para as aplicações farmacêuticas. A Figura 40 e a Tabela 9 mostram o potencial de citotoxicidade e genotoxicidade dos LC vazios e peguilados, estudados neste trabalho.

Os resultados mostram que em ambos os casos a citotoxicidade aumenta com a concentração de lipossomas nas amostras, porém, em concentrações em

torno de 1%, a citotoxicidade é muito baixa, sendo esta, a mesma concentração utilizada para os ensaios de permeação.

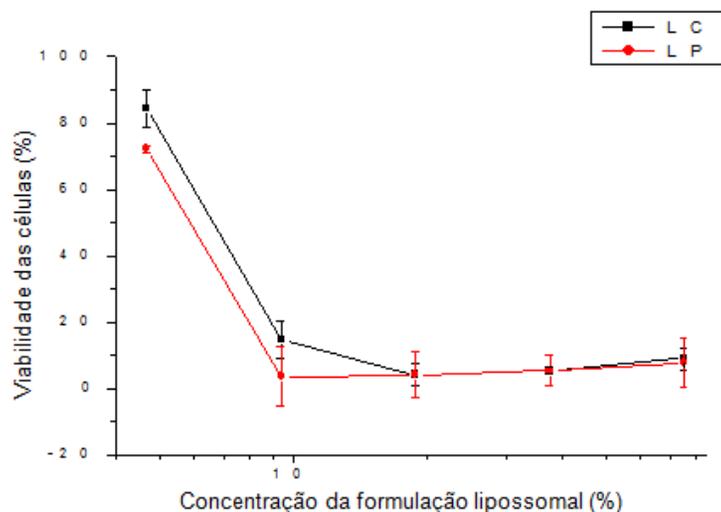


Figura 40 – Viabilidade das células a partir da concentração da formulação lipossomal. (■) – lipossomas convencionais; (●) – lipossomas pegulados (Rodas *et al.*, 2009).

Sabendo-se da não toxicidade da EPC e do PEG-8-L, atribui-se os efeitos observados aos componentes tóxicos do solvente, que ainda permaneceram presentes após o procedimento de formação dos lipossomas, ou seja, o solvente não foi totalmente evaporado na formação do filme lipídico.

Quando foi analisada a frequência de micronúcleos, pode-se observar que quando foi usado S9 (ativador metabólico), a frequência de micronúcleos tem um valor de segurança quando comparado com os resultados sem S9, tanto na formulação de LC ou LP. Este resultado permite determinar uma concentração de segurança dos lipossomas para formulações tópicas ou para administração oral, devendo se ressaltar que a concentração utilizada nos ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, estavam dentro da faixa de segurança, pois foram utilizadas na concentração de 1.10^{-2} mol.L⁻¹.

Tabela 9 – Índice de Proliferação das células e correspondente percentual de frequência de micronúcleo de formulação de lipossomas (Rodas *et al.*, 2009).

Formulação	sem S9		com S9	
	Índice de Proliferação	Frequência micronúcleo (%)	Índice de Proliferação	Frequência micronúcleo (%)
Controle (meio de cultura)	1,848 ± 0,013	2,18 ± 0,06	1,823 ± 0,013	5,64 ± 0,29
Lipossomas convencionais 10%	1,207 ± 0,002	8,13 ± 1,59	1,521 ± 0,008	3,98 ± 1,07
Lipossomas convencionais 3%	1,637 ± 0,006	1,61 ± 0,81	1,745 ± 0,009	1,67 ± 0,39
Lipossomas convencionais 1%	1,765 ± 0,017	0,87 ± 0,26	1,714 ± 0,057	1,98 ± 1,18
Lipossomas peguilados 10%	1,098 ± 0,002	12,83 ± 3,86	1,724 ± 0,001	5,95 ± 1,78
Lipossomas peguilados 3%	1,410 ± 0,004	4,20 ± 0,32	1,292 ± 0,003	3,71 ± 0,20
Lipossomas peguilados 1%	1,773 ± 0,008	2,71 ± 0,09	1,235 ± 0,101	2,12 ± 0,94

4.2.2. Lipossomas contendo chalcona CH8

4.2.2.1. Incorporação do PEG-8L

A incorporação do PEG-8L às vesículas já contendo chalcona CH8 encapsulada, foi caracterizada através do diâmetro médio e distribuição, morfologia, tensão superficial e temperatura de transição de fases. A Tabela 10 apresenta a distribuição de tamanhos dos lipossomas após a incorporação do PEG-8L por um período de 24 horas.

Tabela 10 – Cinética de incorporação do PEG-8L em lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ contendo chalcona CH8 encapsulada, em função do tempo de incubação, acompanhadas por um período de 24 horas.

Tempo (h)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
0	37 – 46	9,3	$41,2 \pm 3,3$	29 – 74	99,1	$39,2 \pm 2,8$
	93 – 296	89,8	$160,4 \pm 45,3$	93 – 186	0,9	$124,2 \pm 25,9$
0,25	99 – 118	69,5	$115,0 \pm 23,8$	99 – 139	98,8	$112,6 \pm 33,7$
	233 – 276	30,5	$234,8 \pm 55,9$	196 – 276	1,2	$235,9 \pm 55,8$
0,50	53 – 66	26,9	$63,8 \pm 8,9$	42 – 84	99,1	$60,4 \pm 4,3$
	168 – 211	73,1	$171,3 \pm 20,0$	133 – 211	0,9	$170,3 \pm 22,8$
0,75	33 – 41	6,6	$36,1 \pm 2,7$	26 – 52	98,9	$34,6 \pm 3,0$
	82 – 262	93,3	$146,5 \pm 33,8$	65 – 165	1,1	$105,2 \pm 15,6$
1	48 – 57	16,3	$54,6 \pm 5,8$	40 – 67	99	$52,8 \pm 3,9$
	158 – 187	83,7	$158,8 \pm 36,9$	133 – 187	1	$159,5 \pm 19,6$
2	33 – 52	8,8	$40,0 \pm 2,6$	26 – 166	100	$36,7 \pm 1,8$
	66 – 263	91,1	$146,4 \pm 25,9$			
5	35 – 49	15,1	$41,1 \pm 4,4$	29 – 49	99,8	$40,7 \pm 4,9$
	136 – 162	84,9	$159,2 \pm 24,9$	136 – 162	0,2	$149,4 \pm 25,6$
10	79 – 94	50,3	$90,0 \pm 12,7$	67 – 111	98,3	$87,3 \pm 11,9$
	156 – 200	49,7	$185,9 \pm 38,0$	156 – 220	1,7	$187,3 \pm 43,2$
15	42 – 265	100	$113,1 \pm 21,9$	33 – 167	100	$58,2 \pm 4,9$
20	37 – 342	100	$116,7 \pm 18,4$	31 – 173	100	$50,6 \pm 6,1$
24	48 – 53	30,6	$50,7 \pm 3,7$	48 – 59	99,8	$51,0 \pm 4,8$
	146 – 218	69,4	$177,0 \pm 15,0$	161 – 178	0,2	$170,3 \pm 19,5$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s - desvio padrão.

Dos resultados obtidos verifica-se que após a incubação com PEG-8L, dos lipossomas contendo CH8, também são produzidas 2 populações, semelhantes à incorporação do PEG-8L em lipossomas vazios. A distribuição de tamanhos oscila entre as duas populações, com as faixas de variação de cada população estando definidas durante o tempo de aproximadamente 1 hora. Pouca variação na distribuição foi verificada em 24h. Semelhante aos LC, essas distribuições apresentam também somente as duas populações características dos lipossomas e do PEG livre, indicando que a inserção do PEG-8L não expulsa a chalcona CH8 da bicamada lipídica.

4.2.2.2. Morfologia

As microscopias dos LP contendo CH8 encapsulada pelo método de agitação branda (em balão rotativo) na proporção molar 60:40 (EPC:PEG) são apresentadas na Figura 41.

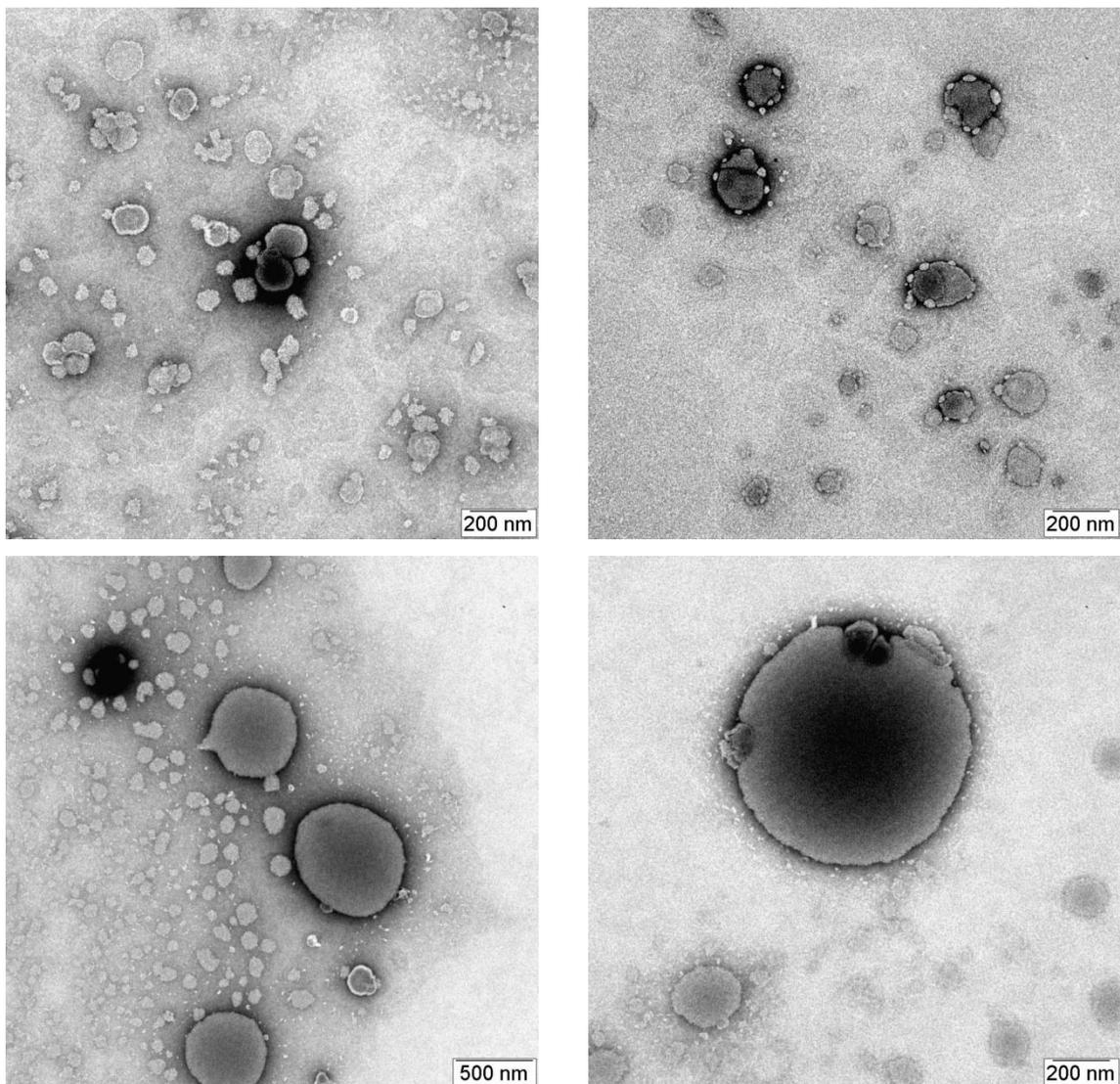


Figura 41 – Morfologia dos lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada, na proporção molar de 60:40 (EPC:PEG).

A incorporação do PEG-8L em lipossomas contendo chalcona CH8 encapsulada manteve a integridade dos lipossomas e a sua forma aproximadamente esférica. No entanto, pode-se observar claramente modificações na região lipídica na superfície das vesículas. Nessa região, a presença da CH8 parece preencher os espaços entre as bicamadas lipídicas

resultando em aspecto liso, e a camada de hidratação do PEG-8L aparece mais difusa em torno da partícula. O PEG-8L parece distribuir-se regularmente em toda a superfície, com o aparecimento de pontos brancos mais densos, que podem representar os pontos de inserção das moléculas de PEG-8L na superfície dos lipossomas.

4.2.2.3. Tensão Superficial

A Figura 42 apresenta a cinética de incorporação do PEG-8L nos lipossomas contendo CH8. Do mesmo modo que para os LC vazios, o equilíbrio na medida da tensão superficial é atingido instantaneamente, e não ocorrem modificações na tensão superficial ao longo de 48 horas de incubação. A incorporação do PEG-8L nos LC contendo CH8 reduz a tensão superficial mesmo para a mais baixa concentração, demonstrando a influência da presença da CH8 no equilíbrio. Para concentrações mais altas de PEG-8L, os valores de tensão superficial resultante são próximos aos dos LC vazios peguilados (Figura 39).

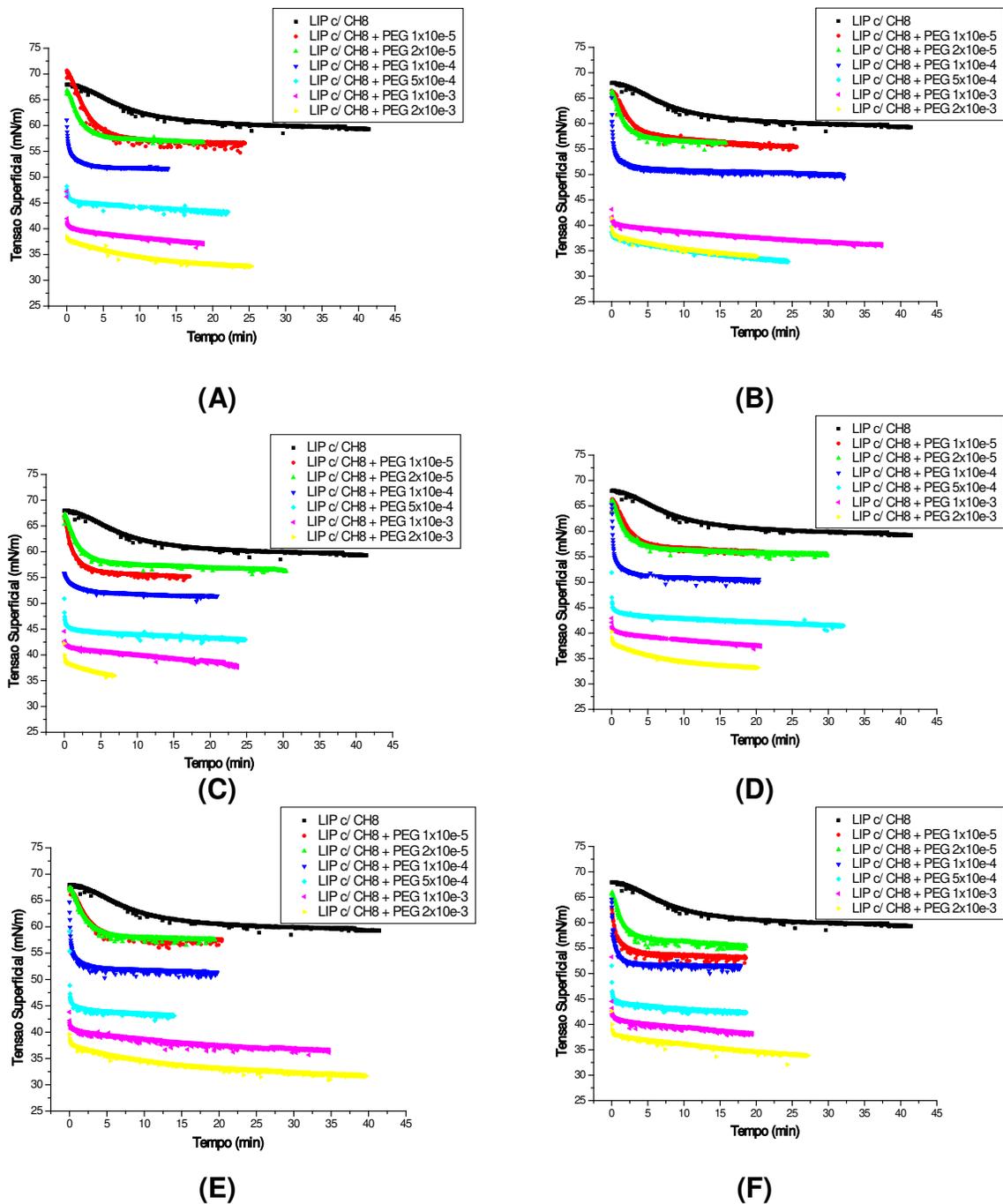


Figura 42 – Cinética de incorporação do PEG-8L aos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada, (A) tempo 0, imediatamente após adição do PEG-8L, (B) 3 horas, (C) 6 horas, (D) 12 horas, (E) 24 horas e (F) 48 horas após incubação.

4.2.2.4. Temperatura de Transição de Fase

A temperatura de transição de fase dos lipossomas foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC). Sendo uma técnica termodinâmica muito eficiente, sensível e não invasiva, utilizada para a caracterização do comportamento termotrópico e da estabilidade térmica das bicamadas lipídicas e para a investigação de interações fármaco-membrana (Puglisi *et al.*, 1995). Esta técnica foi utilizada com o objetivo de analisar a influência da chalcona CH8 na bicamada lipossomal.

Para todas as estruturas formadas por fosfolipídios existe uma temperatura na qual as cadeias acila sofrem transformação (reversível) passando de um estado mais ordenado gel (L_{α}) para um estado mais fluído e desordenado, líquido-cristalino (L_{β}). A temperatura na qual ocorre esta transição é denominada de temperatura de transição de fase (T_m). As curvas de capacidade calorífica (C_p) versus temperatura foram obtidas diretamente das medidas de calorimetria diferencial de varredura através das quais pôde-se obter a T_m , que é a temperatura onde a C_p é máxima, através deste pode ser calculado o valor da entalpia (Δ).

A T_m foi determinada para os LC e LP contendo a chalcona CH8. Os lipossomas vazios, de ambos os tipos, e a chalcona livre, foram usados como controles. Os termogramas (Figura 43) obtidos pela técnica de DSC para os vários sistemas e seus controles, foram utilizados para analisar as interações entre a chalcona, PEG-8L e a bicamada dos lipossomas.

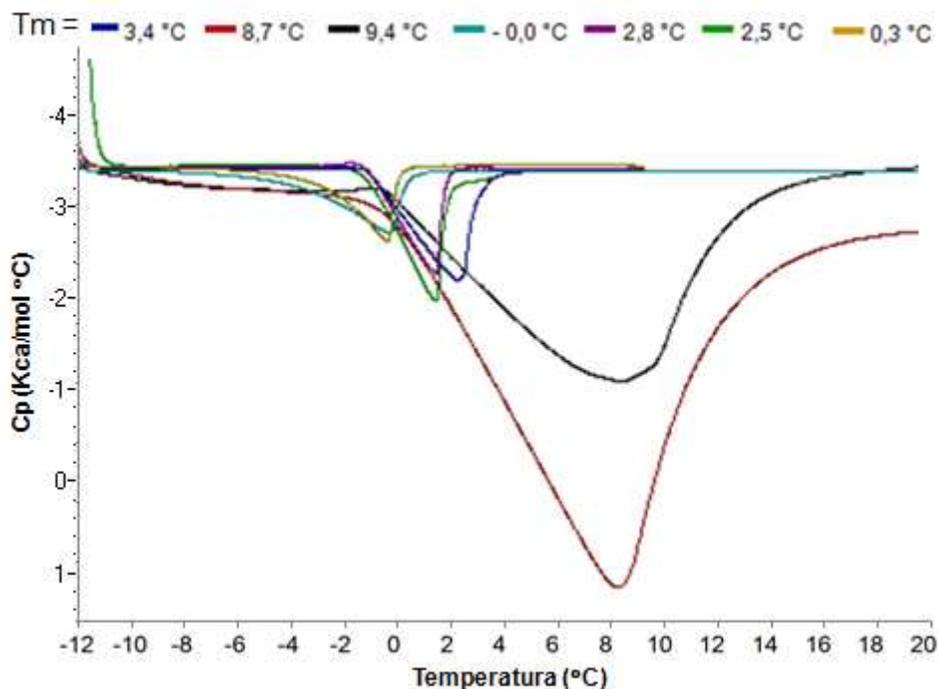


Figura 43 – Termograma de DSC para água (—); lipossomas convencionais vazios (—); chalcona CH8 em água (—); lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada (—); PEG-8L em água (—); lipossomas peguilados vazios (—); lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada (—). No topo as temperaturas de transição de fase (T_m) obtidas de cada curva com taxa de aquecimento de 1 °C/min.

Comparando os termogramas obtidos, observa-se que a temperatura de transição de fases dos LC (8,7 °C) foi maior que a dos LP (2,5 °C). Esta redução aparece em consequência da maior fluidez, ou desorganização das membranas lipídicas produzida pela inserção da porção hidrofóbica do tensoativo PEG-8L na bicamada lipídica, e a repulsão da parte hidrofílica do polímero localizado na superfície dos lipossomas, como mostrado na Figura 44.

A incorporação da chalcona reduziu o valor da temperatura de transição de fase para ambos os lipossomas, convencional e peguilado. No convencional a T_m passou de 8,7 °C para 0,0 °C, enquanto no peguilado a variação foi de 2,5 °C para 0,3 °C. A diminuição nos valores da T_m indica que a chalcona perturbou o empacotamento dos lipídios ao se inserir na bicamada lipídica. Essa desorganização foi muito mais intensa para os LC, cujo empacotamento dos

lipídios é maior, comparados com os peguilados, nos quais o empacotamento já sofreu os efeitos da inserção do PEG aumentando assim a fluidez da membrana. O balanço de forças entre os lipídios na bicamada e as cadeias de PEG na superfície é mostrado na Figura 44. Trotta *et al.* (2003), obtiveram resultados semelhantes de diminuição da temperatura de transição de fases dos lipossomas quando o ativo natural hidrofóbico glicirrizinato foi encapsulado em lipossomas de lecitina de soja.

A diminuição da T_m é causada pelas interações do grupo fosfato do fosfolipídio com o da molécula de chalcona CH8, que em pH próximo de 7 está em quase sua totalidade na forma zwitteriônica, proporcionando um aumento no afastamento entre as cadeias fosfolipídicas. Esta repulsão afasta os lipídios, levando à uma diminuição da energia requerida para que ocorra a T_m , e conseqüentemente, a temperatura em que ocorrerá a transição será maior.

Nestes termogramas obtidos à velocidade de aquecimento $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, não foram observadas pré-transições de fase, que podem ser um indicativo da rápida mudança de fase, não havendo na região de pré-transição de fase, na qual há coexistência dos anfífilicos no estado gel e no estado líquido-cristalino.

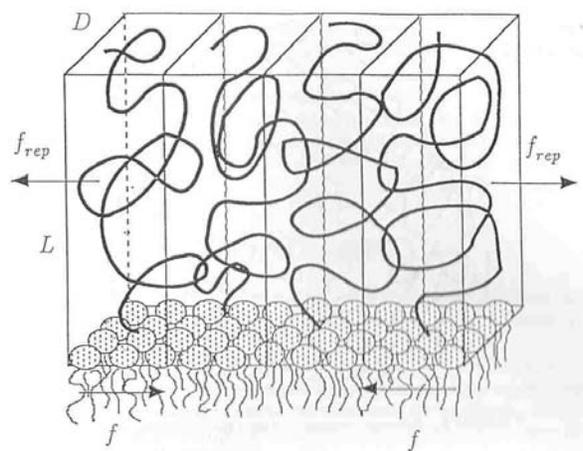


Figura 44 – Diagrama esquemático dos efeitos da inserção do PEG-8L no empacotamento da bicamada lipídica dos lipossomas, adaptado de Lasic & Martin (1995).

B) Permeação de Lipossomas

4.3. Transporte dos Lipossomas Através de Membranas Sintéticas de Nanoporos

Para avaliar a elasticidade dos lipossomas foram realizados ensaios de permeação em membranas sintéticas de nanoporos, com diâmetro aproximadamente igual aos poros da pele. O transporte dos lipossomas através de membranas de nanoporos tem por objetivo avaliar a quantidade de lipídio e de chalcona CH8 que consegue permear a membrana e, portanto, supostamente, alcançar as camadas mais profundas da pele.

O transporte através de membranas de nanoporos foi realizado após incorporação do PEG-8L na concentração molar de 40% aos LC vazios e contendo chalcona CH8, lipossomas convencionais vazios e contendo chalcona CH8 foram utilizados como controle. O diâmetro médio foi analisado para cada caso, após a permeação, para verificar a transição de formas e a variação de diâmetro médio do permeado.

4.3.1. Quantificação da CH8 permeada

A Tabela 11 apresenta a quantidade de chalcona CH8 que permeou através da membrana sintética em diferentes pressões (2,5 a 20 atm), contida em LC e LP analisada em porcentagem de chalcona CH8 permeada em relação ao seu valor inicial encapsulado nos lipossomas. Na Figura 45 temos a representação gráfica das quantidades permeadas. Observe-se que devido à CH8 ser uma substância lipossolúvel, na análise empregada para determinar a concentração de chalcona CH8, foi utilizado como solvente a acetonitrila que tanto serviu para desintegrar as vesículas lipossomais como para extrair a CH8 encapsulada. A CH8 livre agrega-se e não permeia através do sistema de membranas.

Tabela 11 – Quantificação da chalcona CH8 encapsulada em lipossomas convencionais e peguilados (40% de PEG), após permeação em membrana sintética, nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm, em porcentagem de chalcona CH8 permeada.

LIPOSSOMAS	PRESSÃO (atm)	CH8 Inicial (mg/mL)	CH8 Final (mg/mL)	PERMEADA (%)
Convencionais	2,5	0,0329	0,0037	11,12
	5		0,0043	13,22
	12		0,0057	17,45
	20		0,0062	18,81
Peguilados	2,5	0,0246	0,0027	10,84
	5		0,0033	13,53
	12		0,0043	17,58
	20		0,0047	19,54

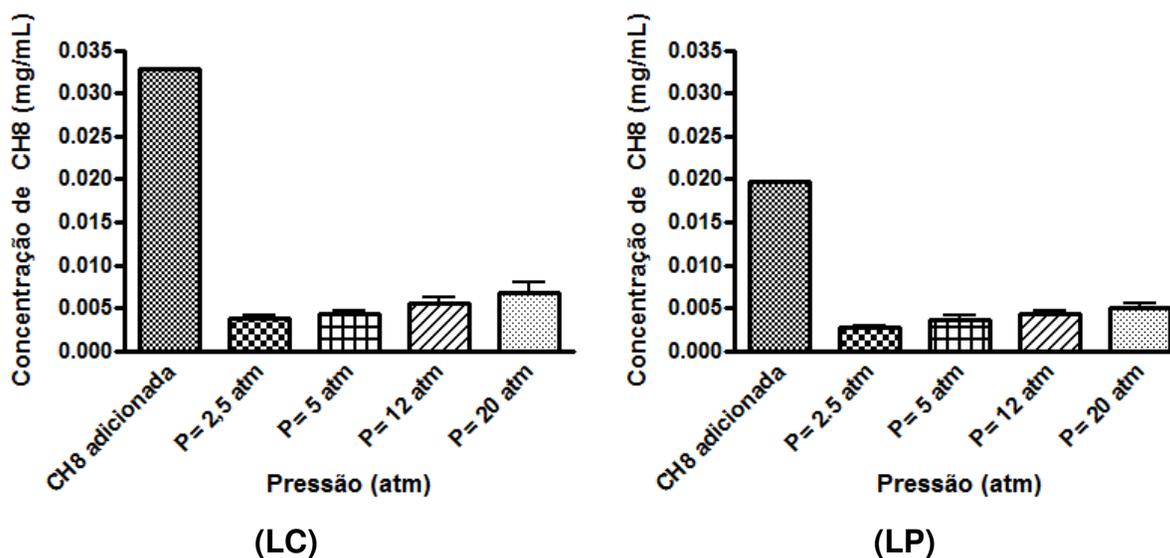


Figura 45 – Quantificação da chalcona CH8 após permeação de lipossomas convencionais (LC) e peguilados (LP) em membrana sintética, nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

Os resultados experimentais mostram que a quantidade de CH8 permeada aumenta com a pressão aplicada na permeação. A análise estatística para a

quantidade de CH8 permeada revelou que há somente diferença significativa ($P < 0.05$) entre as pressões de 2,5 e 20 atm. Já para a permeação dos lipossomas peguilados, houve diferença significativa ($P < 0.01$) quando se analisou as pressões de 2,5 com 12 atm e 20 atm.

Em relação à permeação dos LC contendo chalcona CH8, é possível que a chalcona CH8 tenha se inserido na bicamada lipídica, conferindo elasticidade ao sistema, aumentando a capacidade de deformação, fazendo com que permeasse mais chalcona (0,0037 mg/mL) quando comparado aos LP (0,0027 mg/mL), podendo estar relacionado com uma possível competição entre a chalcona CH8 e o PEG-8L pelas bicamadas lipídicas, provavelmente o PEG ao se inserir na bicamada tenha expulsado a chalcona CH8, deixando-a livre em solução, o que dificulta sua passagem na forma livre através de poros muito pequenos.

4.3.2. Teor de fosfato após permeação

A quantificação do fosfato foi realizada para verificar a quantidade de lipídio que permeou à membrana. Na Tabela 12, estão apresentados os valores do teor de fosfato dos LC e LP vazios e contendo chalcona CH8 encapsulada. Os resultados são apresentados nesta tabela, para as pressões de 2,5 atm (pressão do gradiente transepidermal), 5 atm (pressão pouco acima do gradiente transepidermal), 12 atm (pressão intermediária) e 20 atm (pressão mais elevada). A determinação do teor de fosfato foi realizada em triplicata e a curva padrão plotada, obtendo-se um coeficiente de regressão linear acima de 0,99.

Tabela 12 – Quantificação do teor de fosfato dos lipossomas convencionais e peguilados (40% de PEG-8L), vazio e contendo chalcona CH8 encapsulada, após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de diâmetro de 30 nm, a uma temperatura de 37 °C e sob pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

LIPOSSOMAS	PRESSÃO (atm)	PO ₄ ⁻³ Inicial (mmol.L ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ Final (mmol.L ⁻¹)	PERMEADO (%)
Convencionais Vazio	2,5	1,00	0,09	9,4
	5		0,26	26,0
	12		0,30	30,4
	20		0,37	37,5
Peguilados Vazio	2,5	0,60	0,16	26,6
	5		0,29	48,2
	12		0,39	65,5
	20		0,51	85,0
Convencionais com CH8	2,5	0,80	0,13	16,8
	5		0,29	35,7
	12		0,33	40,8
	20		0,38	47,8
Peguilados com CH8	2,5	0,48	0,16	34,3
	5		0,24	49,1
	12		0,28	57,3
	20		0,33	68,3

Os resultados mostram que a dosagem de fosfato, das frações permeadas, aumenta com o aumento da pressão e foram mais elevadas para os LP que para LC vazios ou contendo CH8. Comparando esses resultados com os da Tabela 11, observa-se que a razão CH8/EPC se reduz com a pressão, ou seja, embora aumente a quantidade de CH8 permeada, a quantidade de lipídio aumenta muito mais, indicando que parte dos lipossomas perderam a CH8 encapsulada na permeação, principalmente no caso dos peguilados. Isso explica a retenção acentuada da CH8 na membrana sintética e a baixa quantidade de CH8 permeada em ambos os tipos de lipossomas.

4.3.3. Diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas permeados

A Figura 46 apresenta uma distribuição de diâmetro médio comparativa para LC e LP (60:40), vazios ou contendo chalcona CH8 encapsulada, após a permeação, em função da pressão aplicada ao sistema (2,5; 5; 12 e 20 atm).

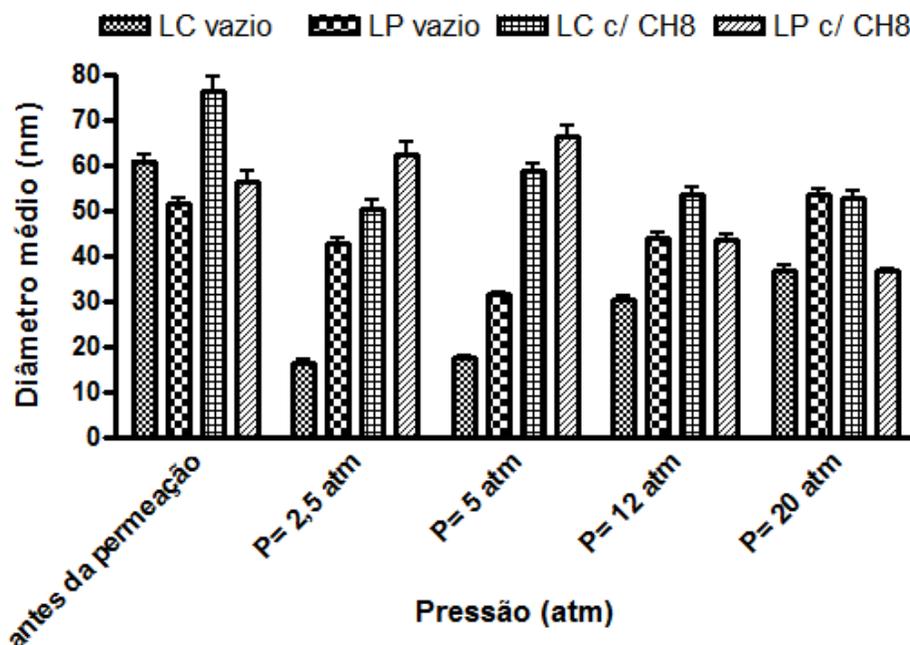


Figura 46 – Efeito da pressão (2,5; 5; 12 e 20 atm) aplicada ao sistema, sob o diâmetro médio dos lipossomas convencionais e peguilados (60:40), vazios ou contendo chalcona CH8 encapsulada.

Observa-se nos resultados, que o diâmetro médio dos lipossomas se reduz com a pressão aplicada. Esses efeitos são mais pronunciados nos lipossomas vazios convencionais comparados aos peguilados. A redução do tamanho dos lipossomas após a permeação também é mais acentuada para os lipossomas vazios (LC e LP) do que contendo CH8. A redução no tamanho com a pressão é uma conseqüência do rompimento das vesículas durante a passagem através dos poros. A incorporação do PEG-8L e da CH8 forneceu elasticidade aos lipossomas e capacidade de permeação através de poros estreitos. No caso da CH8 a elasticidade deve-se à maior fluidez da bicamada como visto nos espectros de DSC e na temperatura de transição de fases.

A elasticidade conferida por compostos hidrofóbicos presentes na bicamada de lipossomas também foi evidenciado em trabalho realizado por Trotta *et al.* (2003) com lipossomas contendo glicirrizinato encapsulado fornecendo lipossomas de diâmetro médio $301 \text{ nm} \pm 25$. Com os LC vazios de lecitina de soja apresentados no trabalho de Trotta *et al.* (2003), ocorreu apenas a filtração dos lipossomas com diâmetro menor que o dos poros da membrana. Neste caso, a lecitina de soja, devido à sua maior temperatura de transição de fases (55 C) é muito menos fluida que a lecitina de ovo à temperatura ambiente. Resultados semelhantes de elasticidade também foram obtidos em trabalho subsequente de Trotta *et al.* (2004) com o metotrexato também hidrofóbico, co-encapsulado em lipossomas compostos de lecitina de soja e glicirrinato.

Os valores de diâmetro médio e distribuição de tamanhos para cada uma das formulações lipossomais em função da pressão aplicada é apresentado no Anexo VII Os resultados obtidos concordam com o comportamento do diâmetro médio apresentado na Figura 46, onde observa-se maior capacidade de deformação dos lipossomas peguilados em relação aos convencionais vazios, e a influência positiva na elasticidade conferida pela CH8 em ambos os tipos de lipossomas.

4.3.4. Morfologia

A capacidade de deformação das vesículas foi também avaliada através da morfologia dos lipossomas antes e após a permeação, para os LC vazios (Figura 47), LC contendo chalcona CH8 encapsulada (Figura 48) LP vazios (Figura 49) e LP contendo chalcona CH8 encapsulada (Figura 50). Nas figuras a letra A, representa as microscopias antes da permeação e a letra B, após permeação (P= 2,5 atm).

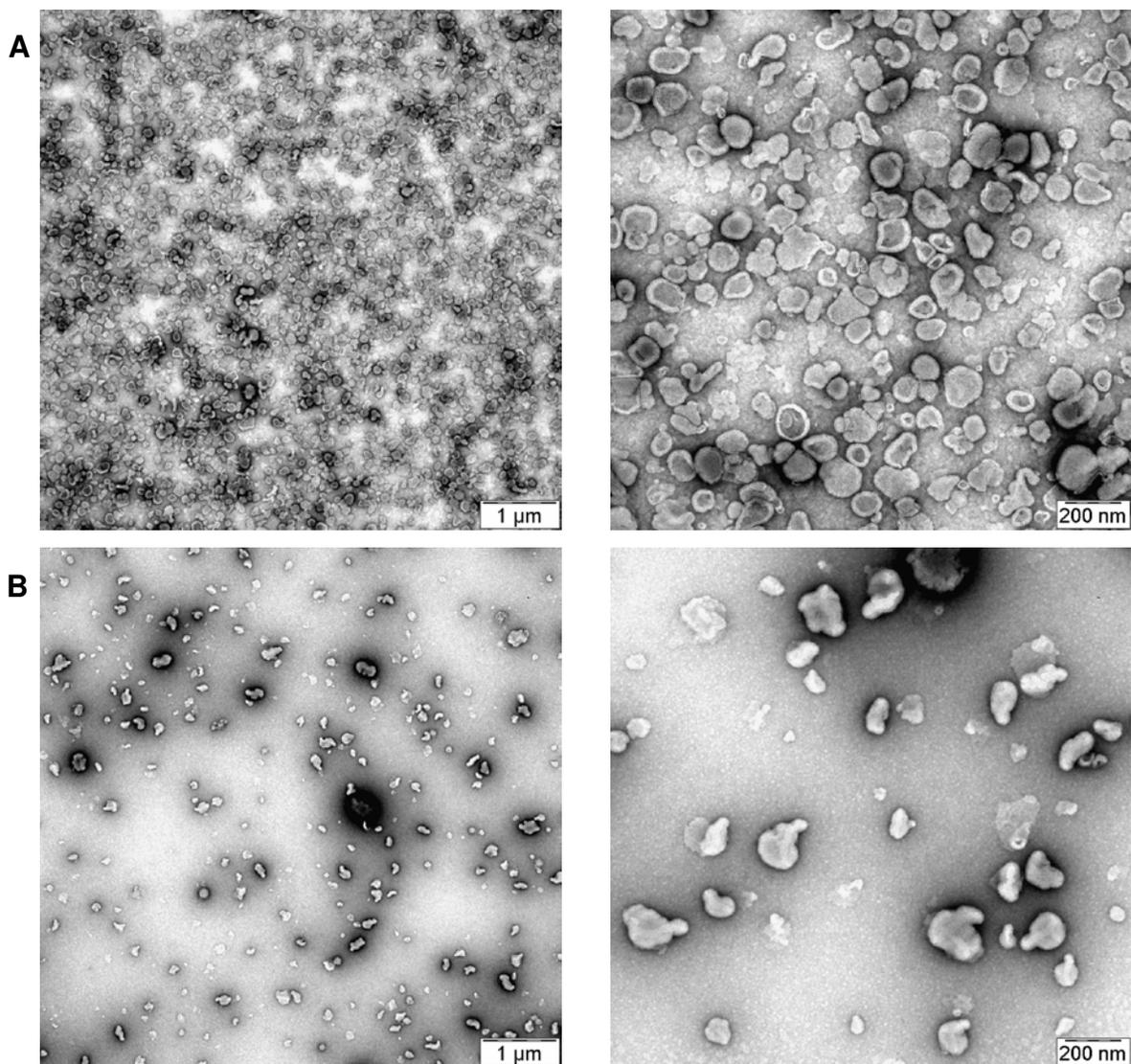


Figura 47 – Morfologia dos lipossomas convencionais vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) antes (A) e após permeação (B) através de membranas ($P= 2,5$ atm).

As microscopias da Figura 47 mostram que os LC vazios apresentam deformação em relação à forma esférica, mesmo antes da permeação, devido à fluidez da bicamada conferida pela lecitina de ovo à temperatura ambiente. Essas deformações aparecem mais acentuadas após a permeação.

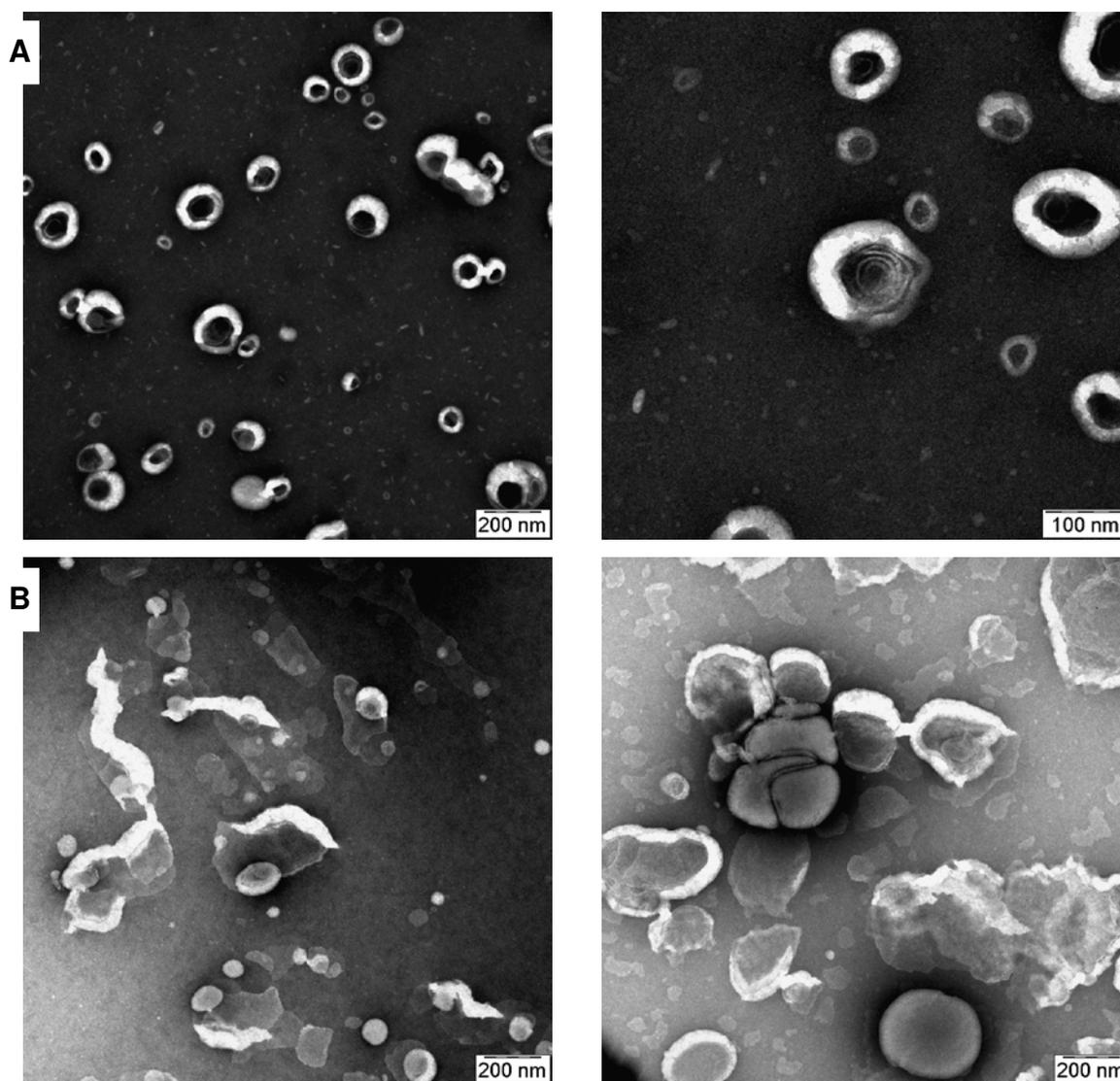


Figura 48 – Morfologia dos lipossomas peguilados vazios compostos de lecitina de ovo (LIPOID – E80) e PEG-8L (60:40) antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm.

Para os lipossomas peguilados vazios, a densidade da camada superficial produzida pela inserção do PEG-8L mostra formas mais esféricas antes da permeação, com deformações mais nítidas após a permeação. Os campos analisados mostram algumas agregações dos lipossomas após a permeação e algumas formas alongadas, que podem representar o PEG liberado da superfície dos lipossomas durante a permeação.

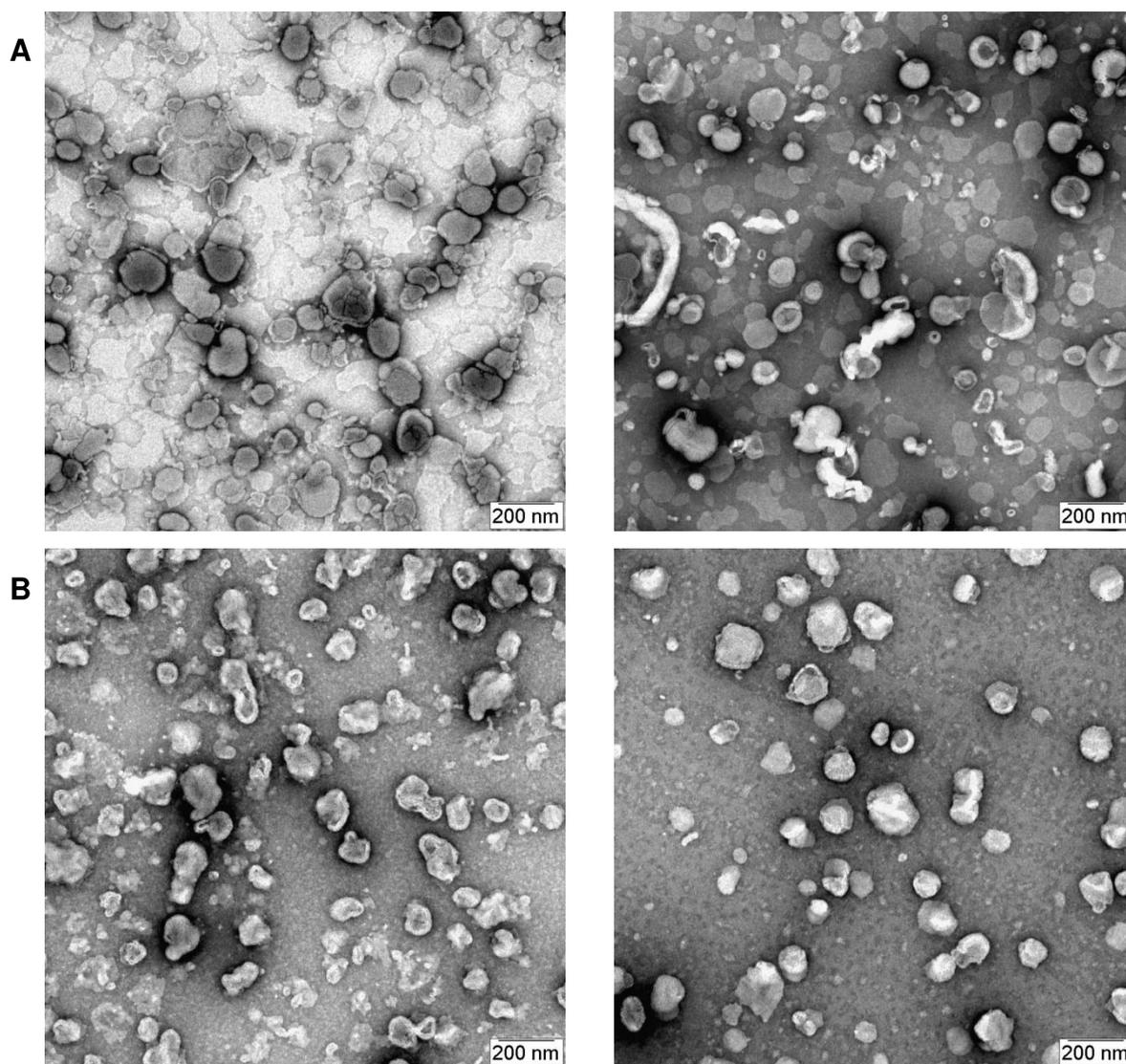


Figura 49 – Morfologia dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 encapsulada antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm.

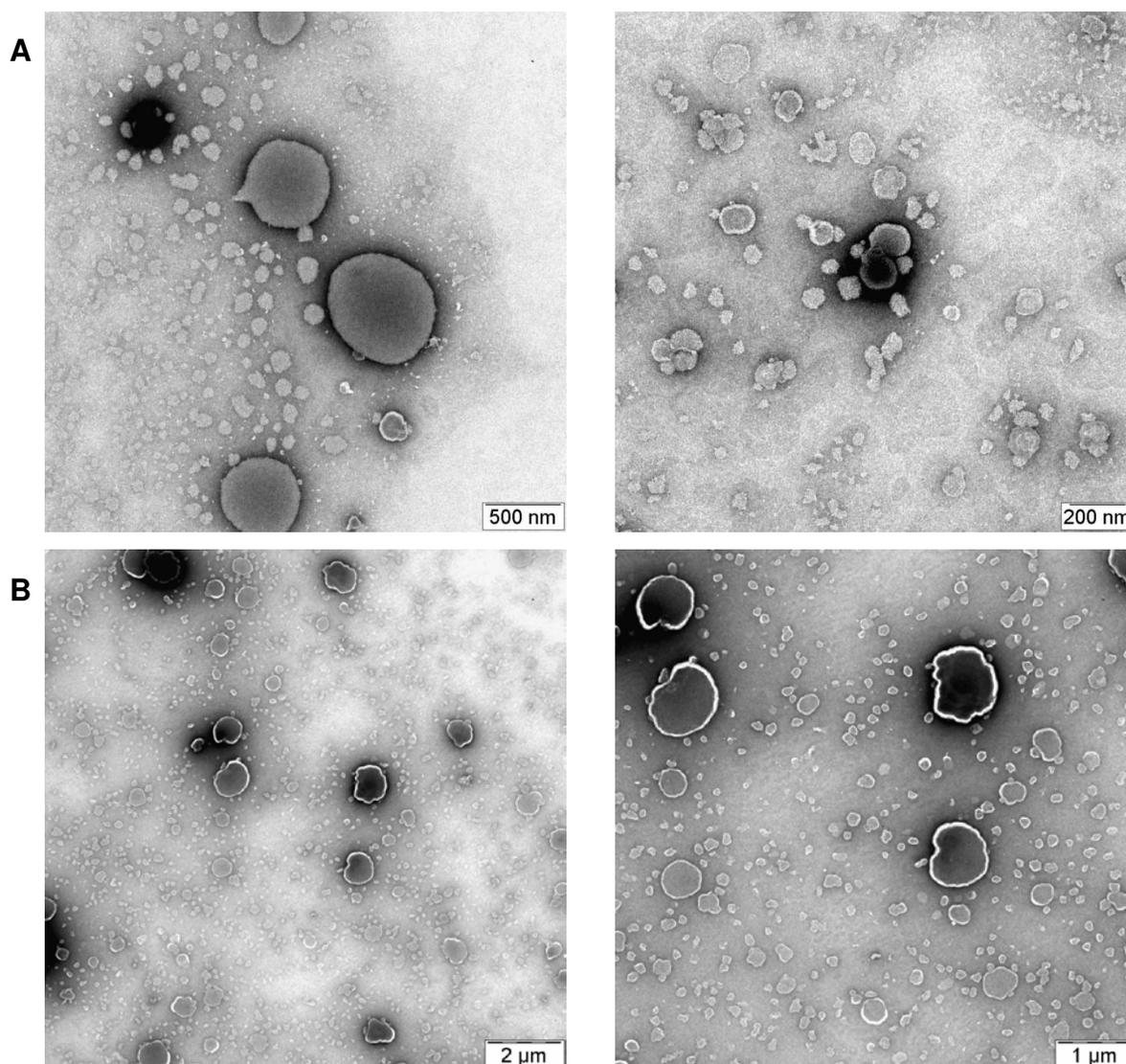


Figura 50 – Morfologia dos lipossomas peguilados contendo chalcona CH8 encapsulada, incubados com PEG-8L (60:40) antes (A) e após (B) permeação através de membranas (30 nm) com pressão de 2,5 atm.

Nas microscopias das Figuras 49 e 50 pode-se observar que para os lipossomas contendo CH8 as mudanças após a permeação são muito menos pronunciadas que para os lipossomas vazios, tanto para os convencionais quanto para os peguilados.

4.3.5. Tensão Superficial

A Figura 51 apresenta os resultados da tensão superficial dos LC e LP vazios, antes e após permeação, assim como do tensoativo PEG-8L utilizado como

controle. A influência da encapsulação da chalcona CH8 na tensão superficial pode ser avaliada na Figura 52, antes e após permeação e comparativamente com os lipossomas vazios.

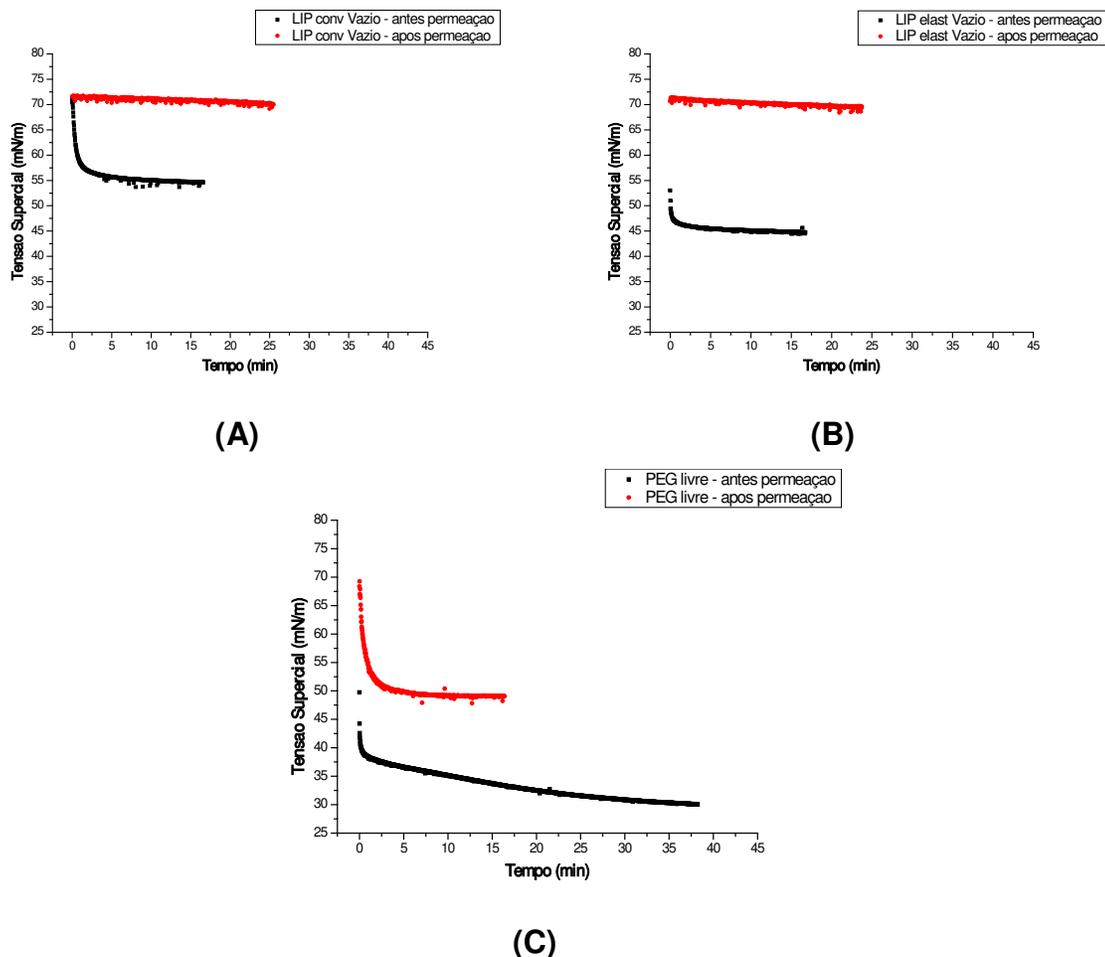


Figura 51 – Tensão superficial dos lipossomas convencionais vazios (A) e peguilados vazios (B) e da solução de PEG-8L livre (C), utilizado como controle, medidas antes e após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de 30 nm de diâmetro, sob pressão de 2,5 atm e temperatura de 37 °C.

Após a permeação, a tensão superficial aumenta tanto para os lipossomas convencionais e peguilados, quanto para o PEG-8L isento de lipossomas em solução. Nos dois primeiros casos a tensão superficial após a permeação fica próxima da tensão superficial da água, fato que se deve tanto à redução da concentração dos lipossomas após a permeação, quanto à redistribuição do PEG-8L nas próprias vesículas e/ou a sua liberação dos lipossomas, ambos devido ao

cisalhamento imposto nos poros durante a permeação. No caso da permeação do PEG-8L na ausência de lipossomas, o aumento da tensão superficial deve-se à redistribuição do PEG-8L entre as micelas e a superfície ar-água após a permeação. Portanto, no caso dos lipossomas, o valor da tensão superficial obtido é uma resultante de ambas as contribuições: do PEG-8L nos lipossomas e na forma de micelas em solução.

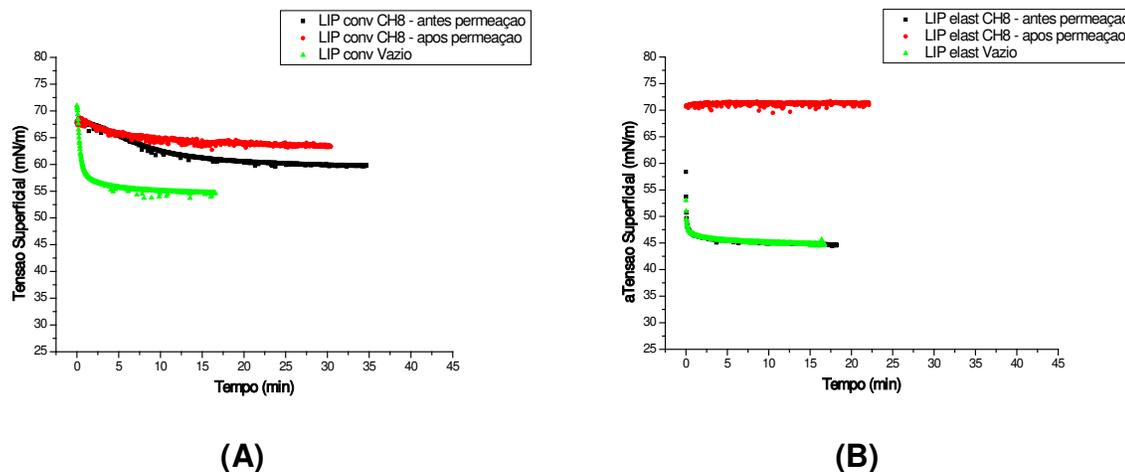


Figura 52 – Tensão superficial dos lipossomas convencionais contendo chalcona CH8 (A) e peguilados contendo chalcona CH8 (B), medidas antes e após permeação em membranas sintéticas de nanoporos de 30 nm de diâmetro, sob pressão de 2,5 atm e temperatura de 37 °C, comparativamente com os lipossomas vazios.

A Figura 52 mostra comportamento semelhante da tensão superficial dos lipossomas contendo CH8, em relação aos lipossomas vazios, com o aumento da tensão superficial após a permeação. Pode-se observar que a tensão superficial dos lipossomas peguilados antes da permeação é igual para os lipossomas vazios ou contendo CH8, ou seja, a CH8 não interfere na atividade de superfície, devendo ser atribuída somente ao PEG incorporado. O mesmo comportamento não acontece com os lipossomas convencionais antes da permeação, cuja encapsulação da CH8 aumenta a sua tensão superficial.

4.3.6. Potencial Zeta

Na Figura 53 apresenta-se a influência do PEG-8L no potencial zeta dos lipossomas após a permeação (P= 2,5 atm).

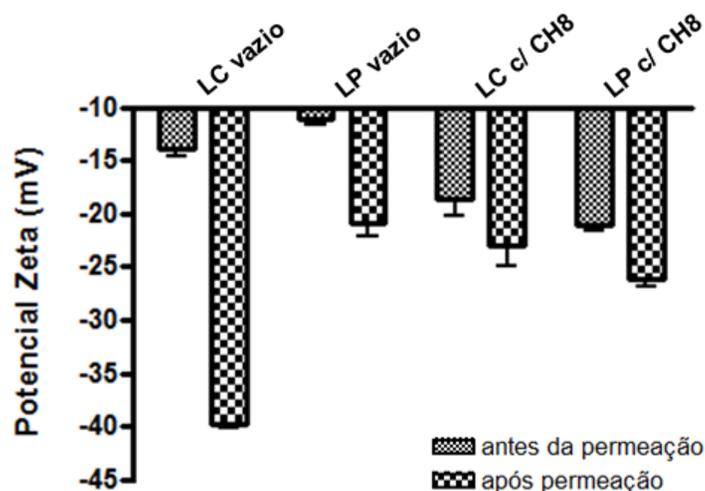


Figura 53 – Efeito da permeação (P= 2,5 atm e 37 °C) sobre o potencial zeta dos lipossomas. LC – lipossomas convencionais e LP – lipossomas peguilados.

Os valores do potencial zeta apresentados na Figura 53 mostram a influência do PEG. Este reduz significativamente ($P < 0.01$) a carga eletrostática da camada adjacente à superfície dos lipossomas, em relação aos LC vazios antes da permeação. A presença da CH8 diminui o potencial zeta, sendo esse efeito mais acentuado para os LP. Esse efeito comprovam a reestruturação dos lipídios na bicamada com mudanças na superfície, decorrentes da encapsulação da CH8.

Após a permeação o potencial zeta diminui em valor absoluto, sendo mais acentuado nos LC vazios do que nos LP. Isto demonstra a maior integridade dos LP após a permeação, em relação aos LC. A presença da CH8 reduziu a intensidade desses efeitos após a permeação tanto para ambos LC e LP.

4.3.7. Reologia de Lipossomas em Membranas de Nanoporos

A Lei de Darcy foi desenvolvida em 1856, pelo engenheiro hidráulico francês Henry Darcy (1803-1858) ao conduzir seu famoso experimento de

escoamento de água através de meios porosos. Essa lei considera a linearidade entre a vazão e a queda de pressão; e a constante de proporcionalidade representa a permeabilidade do meio, que só depende das suas propriedades físicas. Posteriormente, essa lei foi estendida para representar o escoamento da grande parte de fluidos em meios porosos, incluindo membranas (Slattery, 1972).

Numa visão de engenharia, a pele humana foi simulada por uma membrana com raio de poro igual ao tamanho de poro do estrato córneo (30 nm) e a permeação de lipossomas foi analisada como uma permeação em meio poroso complexo. A Lei de Darcy prevê que não existe vazão de solução na ausência de uma diferença de pressão transmembrana. Hunter & Frisken (1998) apontam essa mesma afirmação para dispersões coloidais como as de lipossomas.

4.3.7.1. Comportamento da e vazão versus pressão para os lipossomas

As curvas de permeação dos lipossomas em função da pressão são apresentadas na Figura 54, juntamente com a curva de permeação de água. Nela observa-se que os vários lipossomas uma resistência inicial ao escoamento a baixas pressões, ou seja, foram observadas baixas vazões nessas condições. Porém, para pressões acima de 8 atm, observa-se uma grande sensibilidade da vazão com a pressão. Observa-se também que para as mesmas pressões, as vazões dos lipossomas são maiores para os LP comparados aos LC ambos vazios. A presença da CH8 nos lipossomas reduz as vazões para os LP, enquanto que aumenta acentuadamente a capacidade de permeação dos LC. Esses resultados comprovam as evidências anteriores com relação à elasticidade imposta pelo PEG-8L e CH8, e neste ensaio ficou evidente a diferenciação de elasticidade da CH8 nos LP, comparada aos LC. A elasticidade dos LP, confirma os resultados da literatura apresentados por Bouwstra *et al.* (2003).

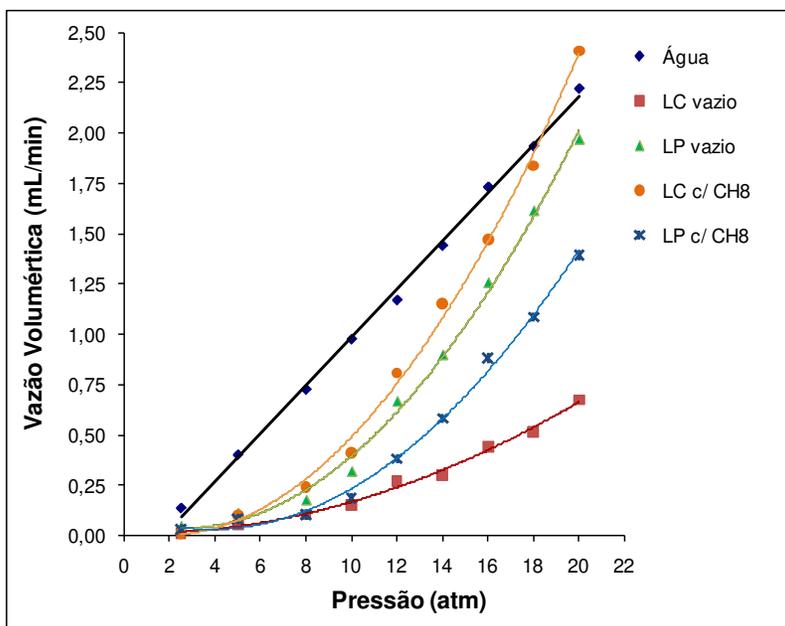


Figura 54 – Curvas de permeação de água deionizada, lipossomas convencionais e peguados em duas membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de poros 30 nm.

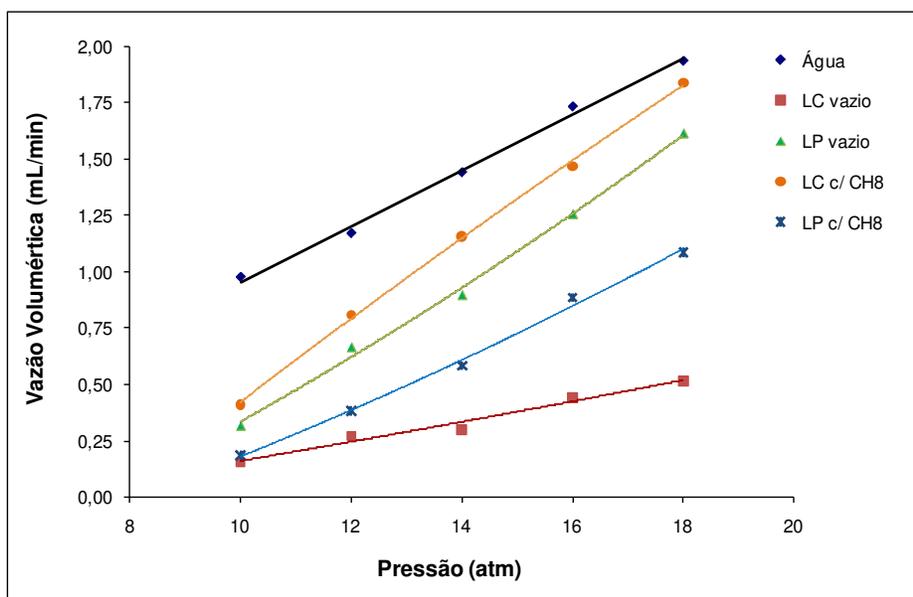


Figura 55 – Permeação dos lipossomas na região de 10 a 18 atm, ajustadas a uma reta.

A Figura 55 ressalta a região linear das curvas, compreendida entre as pressões 10 e 18 atm. O comportamento mostra que após a resistência inicial à

baixas pressões, os lipossomas escoam através das membranas obedecendo a lei de Darcy para meios porosos. Essa evidência simplifica o estudo do escoamento através de membranas de nanoporos podendo-se utilizar uma modelagem matemática já bem estabelecida para análise do escoamento de sistemas mais simples que os lipossomais, e de meios porosos também mais simples comparados às membranas de nanoporos ou a pele.

O comportamento observado é o mesmo da Figura 54, e mostra que a permeação é muito mais facilitada com a presença da chalcona CH8 em LC do que com a chalcona CH8 em LP, até mesmo em relação aos LP vazios. Portanto, esses resultados confirmam que a chalcona CH8 contribui muito mais para a elasticidade dos lipossomas, do que o PEG-8L, trazendo vantagens com relação à produção, e aos custos associados.

4.4. Permeação *ex vivo* - modelo de célula de Franz, com pele de orelha de porco

No ensaio de permeação cutânea usando as formulações lipossomais em pele de porco, não foi detectado por CLAE-UV qualquer pico referente à passagem da chalcona nas amostras de tampão coletadas abaixo da pele até 12 horas de aplicação, respeitando os limites de quantificação e detecção do método analítico. Esses resultados mostram que em ambas as formulações lipossomais a chalcona CH8 ficou retida na pele por pelo menos 12 horas, sugerindo que não devem ser absorvidas para a circulação sistêmica durante o tratamento.

A retenção cutânea *ex vivo* da chalcona CH8 veiculada em lipossomas convencionais ou peguilados está representada na Figura 56.

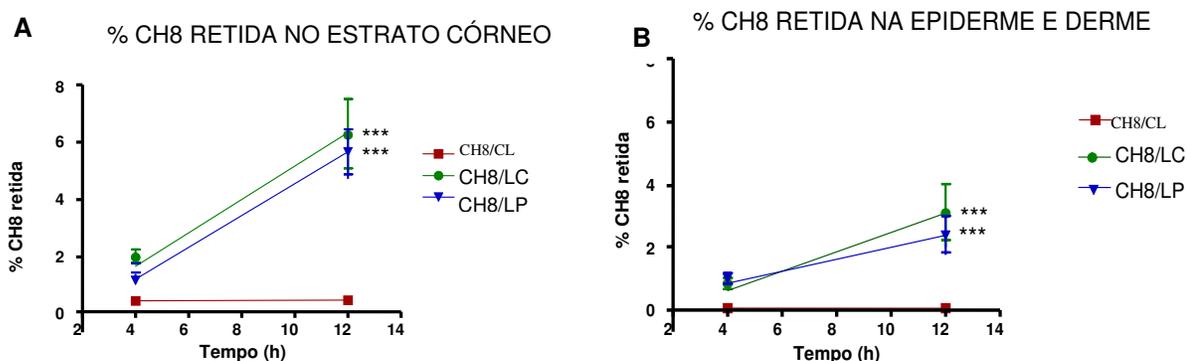


Figura 56 – Demonstração da penetração cutânea *ex vivo* das composições lipossomais utilizando o modelo de pele de porco. Em (A) é apresentado o percentual de chalcona retida no estrato córneo e em (B) o percentual de chalcona CH8 retido na epiderme e derme (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

Para as duas formulações, houve um aumento significativo na concentração de chalcona CH8 retida nas camadas da pele, tanto de extrato córneo (EC), quanto na epiderme e derme (EP+D) com o tempo de aplicação de 12 h. Após esse tempo, $8,43 \pm 4,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $6,06 \pm 4,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de chalcona CH8 foram quantificados no EC, nas formulações de lipossomas convencionais e peguilados, respectivamente. Já na EP+D, $2,86 \pm 1,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $2,22 \pm 1,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram quantificados para as formulações de lipossomas convencionais e peguilados, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre as formulações, indicando que mesmo sem PEG-8L, a formulação de lipossomas convencionais é capaz de atingir camadas mais profundas da pele. Ambas as formulações levaram a um aumento da retenção cutânea em relação à formulação com creme lanete, que apresentou retenção em 12h de $7,59 \pm 1,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o estrato córneo, e $0,94 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para epiderme e derme.

Em todas as camadas da pele, houve maior retenção de chalcona CH8 em função do tempo, sendo 12 horas o tempo de aplicação mais adequado, já que foi possibilitou maior detecção da chalcona. Após 12 h, a concentração de chalcona CH8 na EP+D aumentou 3,6 vezes em relação ao tempo de 4h, para a formulação de chalcona CH8 em lipossomas convencionais, e 3,5 vezes para os peguilados.

O desempenho dos lipossomas convencionais com chalcona CH8 foi melhor que com os lipossomas peguilados, que contém PEG-8L em sua superfície. Entre os lipossomas vazios, o com PEG-8L apresentou melhor desempenho, demonstrando a importância da chalcona CH8 para a elasticidade da membrana lipossomal.

Avaliando os resultados de retenção cutânea, ambas as formulações foram capazes de penetrar na pele, atingindo a derme. As formulações lipossomais apresentaram perfil de retenção semelhante, com maior eficácia no tempo de 12h, sendo uma relação tempo-dependente. Ambas obtiveram melhores resultados de retenção cutânea em relação ao creme lanete, quando se avalia a % de chalcona CH8 retida.

As formulações lipossomais mostraram-se eficazes em promover a retenção da chalcona CH8 nas camadas de pele, sendo porém indicadas para aplicação tópica ao invés de sistêmica, já que não foram capazes de permear em grande proporção através da pele.

C) Eficácia in vivo no tratamento tópico da Leishmaniose

4.5. Avaliação das composições lipossomais

Na avaliação de atividade *in vivo* com o tratamento pela via tópica, o tratamento tópico de camundongos com os LC contendo 6,6 µg chalcona CH8 apresentou a mesma atividade que o controle positivo intralesional, que recebeu 3,3 µg da chalcona CH8 livre (Figura 57). O mesmo efeito é obtido com a avaliação da carga parasitária ao final do experimento (Figura 58). Este resultado demonstra a capacidade da formulação em LC de penetrar a pele e veicular a chalcona à região infectada, possibilitando assim, o tratamento por uma via não invasiva. O grupo tratado com a formulação de chalcona CH8 em LC apresentou maior eficácia que o grupo tratado com uma dose bem mais alta de 200 µg de chalcona CH8 livre em creme lanete. Os demais grupos que foram tratados com os veículos vazios (lipossomas convencionais - LC, lipossomas peguilados - LP e creme lanete - CL) apresentaram perfil semelhante ao grupo não tratado, indicando atividade específica da chalcona.

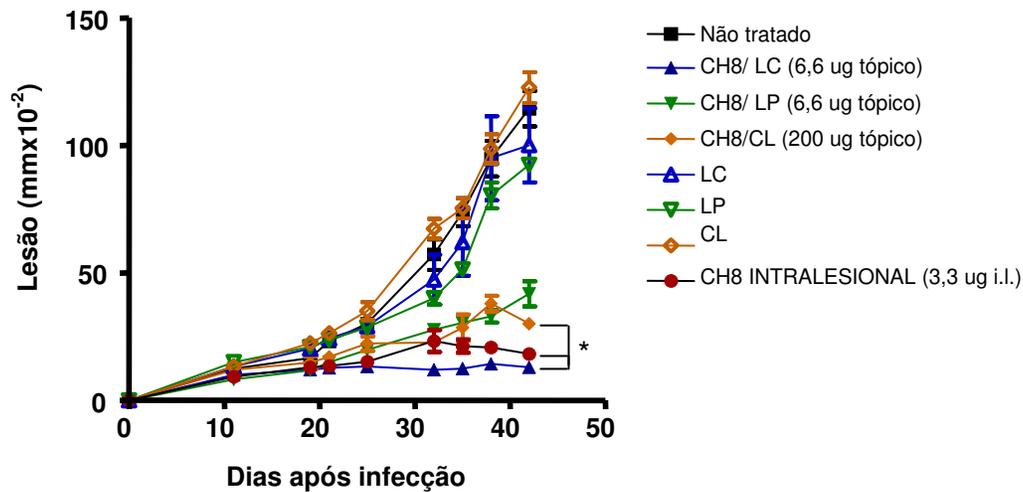


Figura 57 – Eficácia da chalcona CH8 veiculada em lipossomas convencionais e peguillados no tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via tópica. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* GFP na orelha. Tratamento administrado pela via tópica por 30 dias consecutivos, 2x ao dia, 12 dias após infecção; intralesional 2x por semana, durante 4 semanas, 12 dias após infecção. Crescimento de lesão com tratamento tópico com formulações lipossomais na dose de 6,58 μg chalcona CH8, e creme lanete de 200 μg chalcona CH8. Tratamento do grupo controle intralesional com 3,29 μg chalcona CH8. Crescimento de lesão medido semanalmente com auxílio

de paquímetro (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

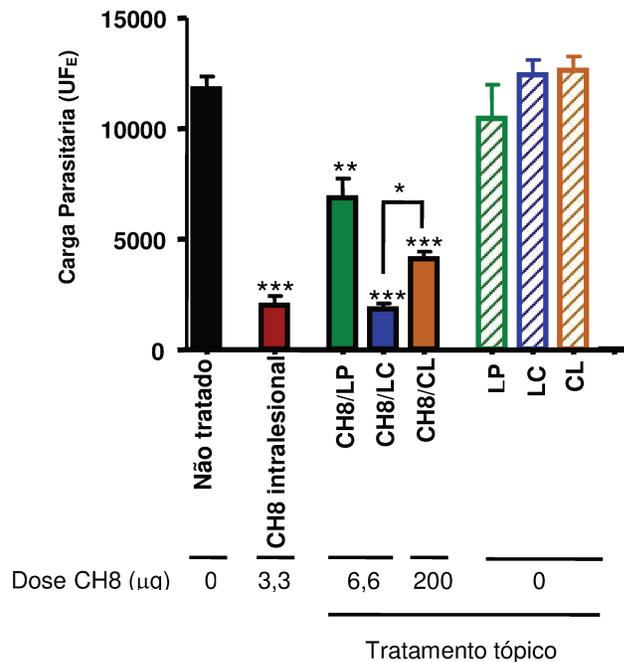


Figura 58 – Eficácia da chalcona CH8 encapsulada veiculada em lipossomas convencionais e peguilados no tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via tópica. Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* GFP na orelha. Tratamento administrado pela via tópica por 30 dias consecutivos, 2x ao dia, 12 dias após infecção; intralesional 2x por semana, durante 4 semanas, 12 dias após infecção. Carga parasitária medida por unidades de fluorescência específica, obtida 42 dias após infecção. Fluorescência basal = 7575 ± 1289 , (Média \pm SD, n=5), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Rossi-Bergmann *et al.*, 2009).

O uso da formulação de chalcona CH8 encapsulada em lipossomas convencionais é a mais vantajosa, pois apresenta o mesmo desempenho que os lipossomas peguilados, sem a etapa adicional de incorporação de PEG-8L, na avaliação de retenção cutânea em células de Franz. E sua eficácia foi maior que o peguilado no tratamento pela via tópica, apresentando o mesmo controle da infecção que o grupo tratado com chalcona CH8 intralesional, com o uso preferencial de uma via não invasiva.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A leishmaniose é uma doença negligenciada e o tratamento é a grande arma de combate devido à complexidade de sua epidemiologia. Sendo até os dias de hoje, o fármaco de primeira escolha, o Sb^{5+} , introduzido no início do século passado, tóxico e injetável. A descoberta de novos fármacos e a veiculação em sistemas de liberação variados se torna um atrativo interessante, ainda mais na forma de administração por via tópica.

Conclui-se portanto, que a encapsulação da chalcona CH8 em lipossomas é factível, sendo confirmada para ambas as formulações lipossomais (LC e LP), com modificações na morfologia, diâmetro médio, tensão superficial e temperatura de transição de fase em relação aos LC vazios. Os estudos de permeação (*in vitro*) em membranas sintéticas de nanoporos com diâmetro de 30 nm mostraram que os LP vazios possuem maior capacidade de permeação que os LC vazios, e que a CH8 produz elasticidade aos LC aumentando a sua capacidade de permeação mesmo em relação aos LP contendo CH8. Os estudos de permeação em pele de orelha de porco (*ex vivo*) mostraram que a CH8 em ambos os tipos de lipossomas foi capaz de permear as camadas da pele, atingindo a derme. A avaliação da atividade *in vivo* no tratamento da leishmaniose mostra que as formulações lipossomais foram mais eficientes que a CH8 livre, destacando-se a eficácia da CH8 em LC, cuja ação foi semelhante à aplicação da CH8 livre intralesional. O desenvolvimento tecnológico da preparação de LC e LP contendo CH8 contribuem para o tratamento mais eficaz da leishmaniose cutânea.

Conclusões parciais mostram que:

- A encapsulação da CH8 em lipossomas convencionais é favorecida pela agitação branda, durante a sua adição à lipossomas pré-formados.
- A máxima capacidade de incorporação em torno de 10%, foi obtida com agitação em balão rotativo e em “shaker”.
- A presença de CH8 aumenta de 20% o diâmetro médio dos lipossomas convencionais, sugerindo sua inserção na bicamada lipídica.
- A incorporação do PEG-8L, gera duas populações, sendo a menor característica dos lipossomas, e a maior, correspondente ao PEG-8L livre.

- O PEG-8L é incorporado na bicamada lipídica dos LC, produzindo maior fluidez e elasticidade e a incorporação também modifica a tensão superficial e o potencial zeta dos LC
- A incorporação do PEG-8L em lipossomas contendo CH8, não alterou as duas populações iniciais, indicando que não houve expulsão da CH8 encapsulada.
- A maior facilidade de permeação em membranas com pressão foi obtida com lipossomas convencionais encapsulando à CH8.
- Lipossomas convencionais e encapsulando a CH8 apresentam comportamento linear de vazão versus queda de pressão na faixa de 5 a 12 atm.
- A incorporação da CH8 em lipossomas convencionais de lecitina de ovo é factível e promove elasticidade expressiva na membrana, trazendo simplicidade ao processo de obtenção de lipossomas elásticos.
- Lipossomas convencionais contendo CH8 encapsulada em ensaios *in vitro* e *in vivo* se mostram mais eficazes para o transporte de CH8.
- A nova formulação farmacêutica, composta de lipossomas convencionais e CH8 apresenta-se promissora para o tratamento da Leishmaniose cutânea, com patente já depositada em 06 de fevereiro de 2009, número de protocolo de depósito: 020090011246 e intitulada “**Composições Farmacêuticas antiparasitárias contendo chalconas encapsuladas em lipossomas**”.

Sugestões para
próximos trabalhos

6. Sugestões para próximos trabalhos

- ✓ Preparar e caracterizar lipossomas peguilados em diferentes concentrações de tensoativo, avaliando a influência do PEG-8L na elasticidade dos lipossomas.
- ✓ Estudar a encapsulação de outras substâncias ativas (hidrofílicas ou hidrofóbicas) nos sistemas lipossomas estudados (LC e LP)
- ✓ Realizar estudos das interações moleculares entre chalcona CH8, PEG-8L e EPC através de monocamadas de Langmuir.
- ✓ Aprimorar processos de escalonamento para encapsulação, sendo que a agitação mecânica de baixo cisalhamento com impelidor âncora apresenta-se promissora.
- ✓ Caracterizar mais detalhadamente a estabilidade durante o armazenamento, podendo ser melhor estocado na forma sólida (liofilização).
- ✓ Estabelecer metodologia analítica para a quantificação (CLAE) da chalcona CH8 em presença de lipídios.
- ✓ Incorporação da formulação lipossomal em uma forma farmacêutica para administração tópica, diminuindo efeitos tóxicos e indesejáveis, levando a uma uma melhor aceitação por parte dos pacientes ao tratamento.

Referências

Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, T. Particle Size Measurements. London: Chapman & Hall, v.2. 1997. 595 p.
- Amato, V.S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Tópicos em terapêutica. Revista Brasileira de Medicina, v.53, p.202-212. 1998.
- Amato, V.S., Nicodemo, A.C., Amato, J.G., Boulos, M. & Neto, V.A. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome). J. Antimicrob. Chemother., v.46, n.2, August 1, 2000, p.341-342. 2000.
- Amato, V.S., Rabello, A., Rotondo-Silva, A., Kono, A., Maldonado, T.P.H., Alves, I.C., Floeter-Winter, L.M., Neto, V.A. & Shikanai-Yasuda, M.A. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. Acta Tropica, v.92, n.2, p.127-132. 2004.
- Amin, M. & Manisali, M. Cutaneous leishmaniasis affecting the face: Report of a case. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.58, n.9, p.1066-1069. 2000.
- Banghan, 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.
- Barichello, J.M., Handa, H., Kisyuku, M., Shibata, T., Ishida, T. & Kiwada, H. Inducing effect of liposomalization on the transdermal delivery of hydrocortisone: Creation of a drug supersaturated state. Journal of Controlled Release, v.115, n.1, p.94-102. 2006.
- Barry, B.W. Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption. New York: Informa Health Care, v.18. 1983.
- Barry, B.W. Modern methods of promoting drug absorption through the skin. Molecular Aspects of Medicine, v.12, n.3, p.195-241. 1991.

- Basano, S.A. & Camargo, L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.7, n.3, p.328-337. 2004.
- Bawarski, W.E., Chidlow, E., Bharali, D.J. & Mousa, S.A. Emerging nanopharmaceuticals. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v.4, n.4, p.273-282. 2008.
- Berman, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clinical infectious diseases, v.24, n.4, p.684-703. 1997.
- Berman, J.D., Waddell, D. & Hanson, B.D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. Antimicrob. Agents Chemother., v.27, n.6, June 1, 1985, p.916-920. 1985.
- Biltonen, R.L. & Lichtenberg, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. Chemistry and physics of lipids, v.64, n.1-3, p.129-142. 1993.
- Boeck, P., Bandeira Falcão, C.A., 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, n.5, p.1538-1545. 2006.
- Boinpally, R.R., Zhou, S.-L., Poondru, S., Devraj, G. & Jasti, B.R. Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, v.56, n.3, p.389-392. 2003.
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S. & Ponec, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research, v.42, n.1, p.1-36. 2003.
- Bouwstra, J.A. & Ponec, M. The skin barrier in healthy and diseased state. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1758, n.12, p.2080-2095. 2006.

- Brasil. Caderno Informativo sobre as Leishmanioses no Estado do Pará. Belém, Pará: Instituto Evandro Chagas. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação de Parasitologia. Programa de Leishmanioses. 2000a.
- Brasil. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana: Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. 2000b.
- Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2003.
- Brasil. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV. Brasília, DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 2004.
- Brasil. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006.
- Brown, M., Noursadeghi, M., Boyle, J. & Davidson, R.N. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. British Journal of Dermatology, v.153, n.1, p.203-205. 2005.
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaële, D., D'angelo, J., Noel, J.-P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J.P. & Couvreur, P. Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. Pharmaceutical Research, v.18, n.8, p.1157-1166. 2001.
- Castile, J.D. & Taylor, K.M.G. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. International journal of pharmaceutics, v.188, n.1, p.87-95. 1999.
- Cevc, G. Transfersomes[®]. European Patent. PI nº 911141638-2114 1991.
- Cevc, G. Transdermal Drug Delivery of Insulin with Ultradeformable Carriers. Clinical Pharmacokinetics, v.42, n.5, p.461-474. 2003.

- Cevc, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. Advanced Drug Delivery Reviews, v.56, n.5, p.675-711. 2004.
- Cevc, G. & Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1104, n.1, p.226-232. 1992.
- Cevc, G. & Blume, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1514, n.2, p.191-205. 2001.
- Cevc, G. & Blume, G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, Transfersomes®. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1614, n.2, p.156-164. 2003.
- Cevc, G. & Blume, G. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1663, n.1-2, p.61-73. 2004.
- Cevc, G., Blume, G. & Schätzlein, A. Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. Journal of Controlled Release, v.45, n.3, p.211-226. 1997.
- Cevc, G., Blume, G., Schätzlein, A., Gebauer, D. & Paul, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. Advanced Drug Delivery Reviews, v.18, n.3, p.349-378. 1996.
- Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A. & Blume, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1368, n.2, p.201-215. 1998.

- Cevc, G., Schätzlein, A. & Blume, G. Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. Journal of Controlled Release, v.36, n.1-2, p.3-16. 1995.
- 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 (BBA) - Biomembranes, v.1564, n.1, p.21-30. 2002.
- Chen, P.S., Toribara, T.Y. & Warner, H. Microdetermination of phosphorus. Analytical Chemistry, v. 28, p.1756-1758. 1956.
- Cheng, P., Li, D., Boruvka, L., Rotenberg, Y. & Neumann, A.W. Automation of axisymmetric drop shape analysis for measurements of interfacial tensions and contact angles. Colloids and Surfaces, v.43, n.2, p.151-167. 1990.
- Costa, J.W., Milner, D.A. & Maguire, J.H. Mucocutaneous leishmaniasis in a US citizen. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics, v.96, n.5, p.573-577. 2003.
- Croft, S.L. & Brazil, R.P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v.76, n.1, p.37-43. 1982.
- Croft, S.L., Seifert, K. & Duchêne, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Molecular and Biochemical Parasitology, v.126, n.2, p.165-172. 2003.
- Croft, S.L. & Yardley, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. Current Pharmaceutical Design, v.8, p.319-342. 2002.
- Cruz, E.A., Da-Silva, S.A.G., Muzitano, M.F., Silva, P.M.R., Costa, S.S. & Rossi-Bergmann, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. International Immunopharmacology, v.8, n.12, p.1616-1621. 2008.

- D'aquino, R., Harper, T. & Vas, C.R. Nanobiotechnology -Fulfilling the promise of nanomedicine Chemical Engineering Progress, v.102, n.2, p.35-37 2006.
- Da Silva, S.A.G., Costa, S.S. & Rossi-Bergmann, B. The anti-leishmanial effect of Kalanchoe is mediated by nitric oxide intermediates. Parasitology, v.118, n.06, p.575-582. 1999.
- Da Silva, S.A.G., Costa, S.S., Silva, E.M., Moraes, V.L.G. & Rossi-Bergmann, B. Therapeutic effect of oral Kalanchoe pinnata leaf extract in murine leishmaniasis. Acta Tropica, v.60, n.3, p.201-210. 1995.
- Dahneke, B.E. Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering. New York: Wiley. 1983.
- Davies, J.T. & Rideal, E.K. Interfacial Phenomena. New York: Academic Press. 1963.
- De Jaeghere, F., Allémann, E., Leroux, J.-C., Stevels, W., Feijen, J., Doelker, E. & Gurny, R. Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake. Pharmaceutical Research, v.16, n.6, p.859-866. 1999.
- De Leeuw, J., De Vijlder, H., Bjerring, P. & Neumann, H. Liposomes in dermatology today. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v.23, n.5, p.505-516. 2009.
- Deo, M.R., Sant, V.P., Parekh, S.R., Khopade, A.J. & Banakar, U.V. Proliposome-Based Transdermal Delivery of Levonorgestrel. J Biomater Appl, v.12, n.1, July 1, 1997, p.77-88. 1997.
- Descoteaux, A. & Turco, S.J. Functional aspects of the Leishmania donovani lipophosphoglycan during macrophage infection. Microbes and Infection, v.4, n.9, p.975-981. 2002.
- Du Plessis, J., Weiner, N. & Müller, D.G. The influence of in vivo treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v.103, n.2, p.R1-R5. 1994.

- Edwards, K.A. & Baeumner, A.J. Liposomes in analyses. Talanta, v.68, n.5, p.1421-1431. 2006.
- Egbaria, K. & Weiner, N. Topical application of liposomal preparations. Cosmetics and toiletries, v.105, n.3, p.79-93. 1991.
- Egelhaaf, S., Wehrl, E., Muller, M., Adrian, M. & Schurtenberger, P. Determination of the size distribution of lecithin liposomes: a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. Journal of Microscopy, v.184, n.3, p.214-228. 1996.
- El Maghraby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.In Press, Corrected Proof. 2008.
- El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. & Barry, B.W. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditional Liposomes: Mechanistic Studies. Journal of pharmacy and pharmacology, v.51, p.1123-1134. 1999.
- El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. & Barry, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. International journal of pharmaceutics, v.196, n.1, p.63-74. 2000.
- El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. & Barry, B.W. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. Journal of pharmacy and pharmacology, v.53, p.1069-1077. 2001a.
- El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. & Barry, B.W. Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. Journal of pharmacy and pharmacology, v.53, p.1311-1322. 2001b.
- El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. & Barry, B.W. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? Journal of pharmacy and pharmacology, v.58, p.415-429. 2006.
- Elias, P.M. Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization. International Journal of Dermatology, v.20, n.1, p.1-19. 1981.

- Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F. & Khalafallah, N.M. Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. Pharmazie, v.62, n.2, p.133-137. 2007.
- Essa, E.A., Bonner, M.C. & Barry, B.W. Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. International journal of pharmaceutics, v.240, n.1-2, p.55-66. 2002.
- Fresta, M. & Puglisi, G. Corticosteroid dermal delivery with skin-lipid liposomes. Journal of Controlled Release, v.44, n.2-3, p.141-151. 1997.
- Frézard, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. Brazilian Journal of Medical and Biological Reserach, v.32, p.181-189. 1999.
- Frézard, F., Schettini, D.A., Rocha, O.G.F. & Demicheli, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. Química Nova, v.28, n.3, p.511-518. 2005.
- Frost, P. & Horwitz, S.N. Principles of Cosmetics for the Dermatologist. St. Louis: C.V. Mosby Company v.36. 1982. 59-69 p.
- Furtado, T. & Vieira, J.B.F. Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.57, n.3, p.135-140. 1982.
- Ganesan, M.G., Weiner, N.D., Flynn, G.L. & Ho, N.F.H. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. International journal of pharmaceutics, v.20, n.1-2, p.139-154. 1984.
- Giacomini, P.U. Advancement in skin aging: the future cosmeceuticals. Clinics in Dermatology, v.26, n.4, 2008/8//, p.364-366.
- Gontijo, B. & Carvalho, M.L.R. American cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, n.1, p.71-80. 2003.
- Grant, G. & Bansinath, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. Regional Anesthesia and Pain Medicine, v.26, n.1, p.61-63. 2001.
- Gregoriadis, G. & Ryman, B.E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. Biochemical Journal, v.124, p.58. 1971.

- Grogl, M., Thomason, T.N. & Franke, E.D. Drug Resistance in Leishmaniasis: Its Implication in Systemic Chemotherapy of Cutaneous and Mucocutaneous Disease. Am J Trop Med Hyg, v.47, n.1, July 1, 1992, p.117-126. 1992.
- Guo, J., Ping, Q., Sun, G. & Jiao, C. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. International journal of pharmaceutics, v.194, n.2, p.201-207. 2000a.
- Guo, J., Ping, Q. & Zhang, L. Transdermal Delivery of Insulin in Mice by Using Lecithin Vesicles as a Carrier. Drug Delivery, v.7, n.2, p.113 - 116. 2000b.
- Hanus, L.H. & Ploehn, H.J. Conversion of Intensity-Averaged Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Averaged Particle Size Distributions. 1. Theoretical Development. Langmuir, v.15, n.9, p.3091-3100. 1999.
- Hermoso, A., Jiménez, I.A., Mamani, Z.A., Bazzocchi, I.L., Piñero, J.E., Ravelo, A.G. & Valladares, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from piper elongatum and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.11, n.18, p.3975-3980. 2003.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Arenja, S. & Bouwstra, J.A. Skin Penetration and Mechanisms of Action in the Delivery of the D2-Agonist Rotigotine from Surfactant-Based Elastic Vesicle Formulations. Pharmaceutical Research, v.20, n.10, p.1619-1625. 2003a.
- Honeywell-Nguyen, P.L. & Bouwstra, J.A. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: a suggested mechanism of action. Journal of Controlled Release, v.86, n.1, p.145-156. 2003.
- Honeywell-Nguyen, P.L. & Bouwstra, J.A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. Drug Discovery Today: Technologies, v.2, n.1, p.67-74. 2005.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Frederik, P.M., Bomans, P.H.H., Junginger, H.E. & Bouwstra, J.A. Transdermal Delivery of Pergolide from Surfactant-Based Elastic and Rigid Vesicles: Characterization and in Vitro Transport Studies. Pharmaceutical Research, v.19, n.7, p.991-997. 2002.

- Honeywell-Nguyen, P.L., Groenink, H.W.W. & Bouwstra, J.A. Elastic Vesicles as a Tool for Dermal and Transdermal Delivery. Journal of Liposome Research, v.16, n.3, p.273 - 280. 2006.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Wouter Groenink, H.W., De Graaff, A.M. & Bouwstra, J.A. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. Journal of Controlled Release, v.90, n.2, p.243-255. 2003b.
- Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. & Cullis, P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochimica et biophysica acta, v.812, n.1, p.55-65. 1985.
- Hunter, D.G. & Frisken, B.J. Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles. Biophysical Journal, v.74, n.6, p.2996-3002. 1998.
- Idson, B. Percutaneous absorption. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.64, n.6, p.901-924. 1975.
- Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces. London. 1991.
- Jain, S., Jain, P., Umamaheshwari, R.B. & N.K., J. Transfersomes - a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. Drug Development and Industrial Pharmacy, v.29, n.9, p.1013-26. 2003.
- Jost, P.C. & Griffith, H. Lipid-protein interactions. New York: John Wiley Sons, v.2. 1982.
- Kato, A., Ishibashi, Y. & Miyake, Y. Effect of egg yolk lecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.39, n.5, p.399-400. 1987.
- Kerker, M. The Scattering of Light and other Electromagnetic Radiation. New York 1969.

- Kim, C., Shim, J., Han, S. & Chang, I. The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. Journal of Cosmetic Science, v.53, n.6, p.363-374 2002.
- Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., Suhonen, T.M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J. & Mönkkönen, J. Interaction of liposomes with human skin in vitro -- the influence of lipid composition and structure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, v.1304, n.3, p.179-189. 1996.
- Kydonieus, A.F. & Berner, B. Transdermal Delivery of Drugs. Boca Raton: CRC Press Inc, v.2. 1987. 29-42 p.
- Lasic, D.D. The mechanism of vesicle formation. Journal Biochemistry, v.256, p.1-11. 1988.
- Lasic, D.D. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1993.
- Lasic, D. & Martin, F. Stealth Liposomes. London: CRC Press. 1995.
- Lee, E.H., Kim, A., Oh, Y.K. & Kim, C.K. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. Biomaterials, v.26, p.205-210. 2005.
- Lima, E.B., Porto, C., Motta, J.O.C. & Sampaio, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.82, n.2, p.111-124. 2007.
- Liu, H., Pan, W.-S., Tang, R. & Luo, S.-D. Topical delivery of different acyclovir palmitate liposome formulations through rat skin in vitro. Pharmazie, v.59, n.3, p.203-206. 2004.
- Magdassi, S. Delivery systems in cosmetics. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.123-124, p.671-679. 1997.
- Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R. & Janoff, A.S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.817, n.1, p.193-196. 1985.

- Merino, G., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Potts, R.O. & Guy, R.H. Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. Journal of Controlled Release, v.88, n.1, p.85-94. 2003.
- Mezei, M. & Gulasekharam, V. Liposomes: a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.34, n.7, p.473-474. 1982.
- Michaels, A.S., Chandrasekaran, S.K. & Shaw, J.E. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. AICHE Journal, v.21, n.5, p.985-996. 1975.
- Moser, K., Kriwet, K., Kalia, Y.N. & Guy, R.H. Enhanced skin permeation of a lipophilic drug using supersaturated formulations. Journal of Controlled Release, v.73, n.2-3, p.245-253. 2001.
- Mosqueira, V.C.F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F. & Barratt, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. Journal of Pharmaceutical Sciences, v.89, n.5, p.614-626. 2000.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry: W.H. Freeman. 2004.
- New, R.R.C. Liposomes: a Practical Approach. New York. 1990.
- Oh, Y.K., Kim, M.Y., Shin, J.Y., Kim, T.W., Yun, M.O., Yang, S.J., Choi, S.S., Jung, W.W., Kim, J.A. & Choi, H.G. Skin permeation of retinol in Tween 20-based deformable liposomes: in-vitro evaluation in human skin and keratinocyte models. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.58, n.2, p.161-166. 2006.
- Oliveira, L.L. Reologia e Transição de Formas de Lipossomas Elásticos em Membranas de Nanoporos. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2007

- Olliaro, P., Lazdins, J. & Guhl, F. Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. Expert Opinion on Emerging Drugs, v.7, n.1, p.61. 2002.
- Oms. Organização Mundial de Saúde. Disponível em:
http://www.who.int/whr/2002/whr2002_annex2.pdf. 25 de setembro de 2005, as 14:00h.
- Oms. Ciclo de Transmissão da Leishmaniose. Disponível em:
<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>. Acesso em 5 outubro de 2005, as 16:00h.
- Opas. Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em:
<http://www.opas.org.br>. Acesso em: 20 de setembro de 2005, as 10:00h.
- Ouellette, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. Tropical Medicine & International Health, v.6, n.11, p.874-882. 2001.
- Paul, A., Cevc, G. & Bachhawat, B.K. Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. European Journal of Immunology, v.25, n.12, p.3521 - 3524. 1995.
- Pecora, R. Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions. The journal of chemical physics, v.40, n.6, p.1604-1614. 1964.
- Planas, M.E., Gonzalez, P., Rodriguez, L., Sanchez, S. & Cevc, G. Noninvasive Percutaneous Induction of Topical Analgesia by a New Type of Drug Carrier, and Prolongation of Local Pain Insensitivity by Anesthetic Liposomes. Anesthesia Analgesia, v.75, n.4, October 1, 1992, p.615-621. 1992.
- Provder, T.J. Particle Size Distribution Assessment and Characterization. Washington: American Chemical Society. 1987.
- Puglisi, G., Fresta, M., Mazzone, G., Furneri, P.M. & Tempera, G. Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in vitro antimicrobial activity. International Journal of Pharmaceutics, v.118, n.1, p.65-76. 1995.

- Puisieux, F., Couvreur, P., Delattre, J. & Devisaguet, J.P. Liposomes, new systems and new trends in their applications. 1995.
- Rath, S., Augusto Trivelin, L., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., De Jesús, M.N., Calvo Marzal, P., De Andrade Jr., H.F. & Gustavo Tempone, A. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova, v.26, n.4. 2003.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. & Saraf, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v.29, n.9, p.1790-1978. 2006.
- Rodas, A.C.D., Lopes, P.S. & Higa, O.Z. Genotoxicity by micronucleus assay for medical devices development: in Press. 2009.
- Rodriguez, N., Bailey, Brianâ n., Martin, Michaelâ b., Oldfield, E., Urbina, Julioâ a. & Docampo, R. Radical Cure of Experimental Cutaneous Leishmaniasis by the Bisphosphonate Pamidronate. The Journal of Infectious Diseases, v.186, n.1, p.138-140. 2002.
- Rongen, H.A.H., Bult, A. & Van Bennekom, W.P. Liposomes and immunoassays. Journal of Immunological Methods, v.204, n.2, p.105-133. 1997.
- Rossi-Bergmann, B., Torres-Santos, E.C., Yunes, R., Cechinel-Filho, V. & Boeck, P. Síntese e uso de chalconas para tratamento de doenças parasitárias. Patente Brasil. BR nº PI 0204079-4. 2002.
- Rossi-Bergmann, B., Torres-Santos, E.C., Yunes, R.A.C.F., V. & Boeck, P. Síntese e uso de chalconas para tratamento de doenças parasitárias. RPI 1760. Janeiro, U.F.D.R.D. & Catarina, U.F.D.S. PI 0204079-4 2004.
- Rossi-Bergmann, B., Falcão, C.A.B., Zanchetta, B. & Santana, M.H.A. Composições Farmacêuticas antiparasitárias contendo chalconas encapsuladas em lipossomas. Ufrj/Unicamp. Brasil. protocolo de depósito: 020090011246 2009.
- Rotenberg, Y., Boruvka, L. & Neumann, A.W. Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. Journal of Colloid and Interface Science, v.93, n.1, p.169-183. 1983.

- Ruppert, E.E. & Barnes, R.D. Invertebrates Zoology. New York, USA: Harcourt College Publishing. 1994.
- Sampaio, R.N.R. & Marsden, P.D. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisomeTM. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.91, n.1, p.77-77. 1997.
- Sandhiya, S., Dkhar, S.A. & Surendiran, A. Emerging trends of nanomedicine – an overview. Fundamental & Clinical Pharmacology, v.23, n.3, p.263-269. 2009.
- Schaller, M. & Korting, H.C. Interaction of liposomes with human skin: the role of the stratum corneum. Advanced Drug Delivery Reviews, v.18, n.3, p.303-309. 1996.
- Scheerlinck, J.-P.Y. & Greenwood, D.L.V. Particulate delivery systems for animal vaccines. Methods, v.40, n.1, p.118-124. 2006.
- Scheuplein, R.J. & Blank, I.H. Permeability of the skin. Physiological Reviews, v.51, n.4, p.702-47. 1971.
- Schmid, M.H. & Korting, H.C. Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease Advanced Drug Delivery Reviews, v.18, n.3, p.335-342. 1996.
- Schramlová, J., Blažek K., BartáČ Ková M., Otová, B., Mardesř lČOvá L., ZřKovský V. & Hulínská, D. Electron microscopic demonstration of the penetration of liposomes through skin. Folia Biologica, v.43, n.4, p.165-169. 1997.
- Slattery, J.C. Momentum, Energy and Mass Transfer in Continua. New York. 1972.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Journal of Controlled Release, v.70, n.1-2, p.1-20. 2001.
- Soto, J., Arana, B.Â a., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.Â c., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.Â d., Junge, K., Engel, J. & Sindermann, H. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases, v.38, n.9, p.1266-1272. 2004.

- Soto, J., Grogl, M., Berman, J. & Olliaro, P. Limited efficacy of injectable aminosidine as single-agent therapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene v.88, n.6, p.695-698. 1994.
- Sucen. Fundação Nacional da Saúde – FNS Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br>. Acesso em: 23 de setembro de 2005, as 16:30h.
- Suzuki, K. & Sakon, K. The application of liposomes to cosmetics. Cosmetics and Toiletries, v.105, n.5, p.65-78. 1990.
- Takahashi, M., Inafuku, K.-I., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T. & Kitamoto, D. Efficient Preparation of Liposomes Encapsulating Food Materials Using Lecithins by a Mechanochemical Method. Journal of Oleo Science, v.56, n.1, p.1 35-42. 2007.
- Talsma, H., Gooris, G., Steenbergen, M.J.V., Salomons, M.A., Bouwstra, J. & Crommelin, D.J.A. The influence of the molar ratio of cholesteryl hemisuccinate/dipalmitoylphosphatidylcholine on liposome formation after lipid film hydration. Chemistry and physics of lipids, v.62, n.2, p.105-112. 1992.
- Tanner, T. & Marks, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. Skin Research and Technology, v.14, n.3, p.249-260. 2008.
- Tokudome, Y. & Sugibayashi, K. The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the in vitro skin permeation of calcein. Journal of Controlled Release, v.92, n.1-2, p.93-101. 2003.
- Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov, v.4, n.2, p.145-160. 2005.
- Torres-Santos, E.C., Da Silva, S.A.G., Costa, S.S., Santos, A.P.P.T., Almeida, A.P. & Rossi-Bergmann, B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. Phytotherapy Research, v.17, n.7, p.801-803. 2003.

- 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. Antimicrob. Agents Chemother., v.43, n.7, July 1, 1999, p.1776-1778. 1999.
- Torrus, D., Boix, V., Massa, B., Portilla, J. & Perez-Mateo, M. Fluconazole plus allopurinol in treatment of visceral leishmaniasis. J. Antimicrob. Chemother., v.37, n.5, May 1, 1996, p.1042-1043. 1996.
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F. & Gallarate, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. International Journal of Pharmaceutics, v.241, n.2, p.319-327. 2002.
- Trotta, M., Gallarate, M., Carlotti, M.E. & Morel, S. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. International Journal of Pharmaceutics, v.254, n.2, p.235-242. 2003.
- Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E. & Gallarate, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. International journal of pharmaceutics, v.270, n.1-2, p.119-125. 2004.
- 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, n.3, p.367-379. 1999.
- Van De Hulst, H.C. Light Scattering by Small Particles. New York, Wiley. 1957.
- Van Der Meeren, P.P.A., Vanderdeelen, J. & Baert, L.E. Particle Size Analysis. New York. 1988. 101 p.
- Van Kuijk-Meuwissen, M.E.M.J., Junginger, H.E. & Bouwstra, J.A. Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v.1371, n.1, p.31-39. 1998.
- Williams, A.C. Transdermal and Topical Drug Delivery. London: 1 st ed. 2003.
- Yardley, V., Khan, A.A., Martin, M.B., Slifer, T.R., Araujo, F.G., Moreno, S.N.J., Docampo, R., Croft, S.L. & Oldfield, E. In Vivo Activities of Farnesyl

- Pyrophosphate Synthase Inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother., v.46, n.3, March 1, 2002, p.929-931. 2002.
- Yokomizo, Y. & Sagitani, H. The effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pig in vitro. 2. The effects of the hydrophobic group in phospholipids and a comparison with general enhancers. Journal of Controlled Release, v.42, n.1, p.37-46. 1996.
- Yu, H.-Y. & Liao, H.-M. Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro. International Journal of Pharmaceutics, v.127, n.1, p.1-7. 1996.
- 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, 2006. Chalcones as new drugs leads against Leishmaniasis, p.47 - 56
- Zatz, J. Skin permeation fundamentals and application. Washington: Allured Publishing Corp. 1993. 113-125 p.
- Zhang, X.-M., Patel, A.B., De Graaf, R.A. & Behar, K.L. Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy. Chemistry and physics of lipids, v.127, n.1, p.113-120. 2004.

Anexo

ANEXO I

Ficha técnica LIPOID E80

Lipoid

LIPOID E 80

Description

Fatfree egg lecithin with 80 % phosphatidyl choline

Art. - No.	103
EINECS - No.	297-639-2
CAS - No.	93685-90-6

Chemical Composition

Phospholipids [g/100]	
Phosphatidyl choline (+ LPC)	80.0 – 85.0
Phosphatidyl ethanolamine	7.0 – 9.5
Lysophosphatidyl choline	n.m.t. 3.0
Lysophosphatidyl ethanolamine	n.m.t. 0.5
Sphingomyelin	2.0 – 3.0

Non-polar lipids [g/100 g]	
Triglycerides	n.m.t. 3.0
Cholesterol	n.m.t. 1.0
Free fatty acids	n.m.t. 0.05
DL- α -Tocopherol	0.05 – 0.1

Typical fatty acid composition in % to total fatty acids	
Palmitic acid	28 – 34
Stearic acid	12 – 15
Oleic acid	26 – 30
Linoleic acid	13 – 18
Linolenic acid	n.m.t. 1.0
Polyunsaturated fatty acids C 20 and higher	6 – 10

Analytical Data

Phosphorus	[g/100 g]	3.7 – 4.0
Water	[g/100 g]	n.m.t. 2.0
Ethanol	[g/100 g]	n.m.t. 0.2
Peroxide value	[meq O ₂ /kg]	n.m.t. 3
Iodine value		65 – 69
Acid value		7 – 10
Heavy metals	[ppm]	n.m.t. 10

Physical Data

Consistency	coarse agglomerates
Colour	yellowish – yellow

Solubility (5 % Solution)	
Water	dispersible 20°C
Fat	soluble 60°C
Chlorinated hydrocarbons	soluble 20°C
Ethanol	soluble 20°C

Document D-103 of 01.02.2006
Supersedes 07.02.2003

page 1 of 2

Lipoid

Bacteriological Data

C.F.U.	[/g]	n.m.t. 100
Yeasts	[/g]	n.m.t. 10
Moulds	[/g]	n.m.t. 10
Escherichia coli	[/10 g]	negative
Salmonellae	[/10 g]	negative
Staphylococcus aureus	[/10 g]	negative
Pseudomonas aeruginosa	[/10 g]	negative

Endotoxins

Endotoxins	[EU/g]	n.m.t. 6
------------	--------	----------

Aflatoxins

Aflatoxin B1	[ppb]	n.m.t. 2
Aflatoxins B1, B2, G1, G2	[ppb]	n.m.t. 4

Particle Test

Particle test	complies with method PM 1
---------------	---------------------------

Packaging

Standard packaging 5 kg in double PE-bag

Storage Conditions

Recommended storage: in closed containers at -20 ± 5 °C
Close opened containers immediately.

n.m.t. = not more than

All data and recommendations as well as formulations made herein are based on our present state of knowledge. We disclaim all liability on risks or formulae that may result from the use of our products, including improper and illicit use.

ANEXO II

Curva analítica de fosfato

A curva analítica de fosfato, exemplificada na Figura 59, foi realizada para análise das amostras em relação ao rendimento das preparações.

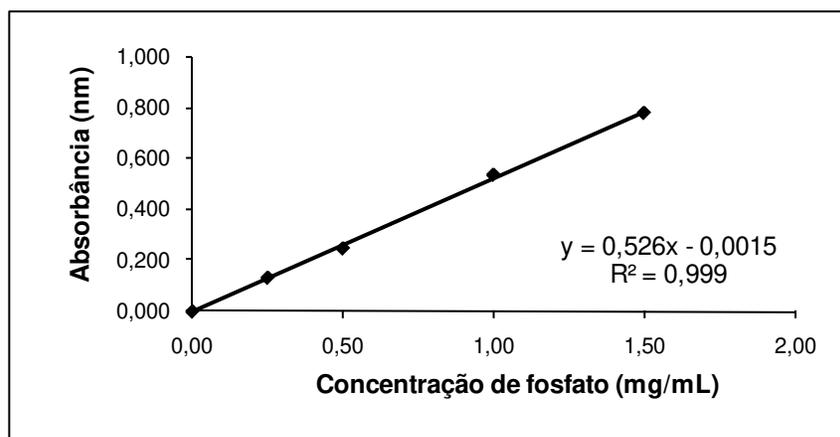


Figura 59 – Curva analítica de fosfato. $y = ax + b$; onde $a = 0,5797$; $b = -0,0043$ e $R = 0,997$; onde: y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em mg/mL), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta e r = coeficiente de correlação.

As curvas foram realizadas simultaneamente com as amostras, compostas por 5 pontos de concentração de padrões fosfato no comprimento de onda $\lambda = 830$ nm. Todas as curvas realizadas apresentaram um coeficiente de regressão linear entre 0,98 e 0,99.

ANEXO III

Curva analítica da chalcona CH8

A curva analítica da chalcona CH8, exemplificada na Figura 60, foi realizada para quantificação da CH8 encapsulada em lipossomas e permeada.

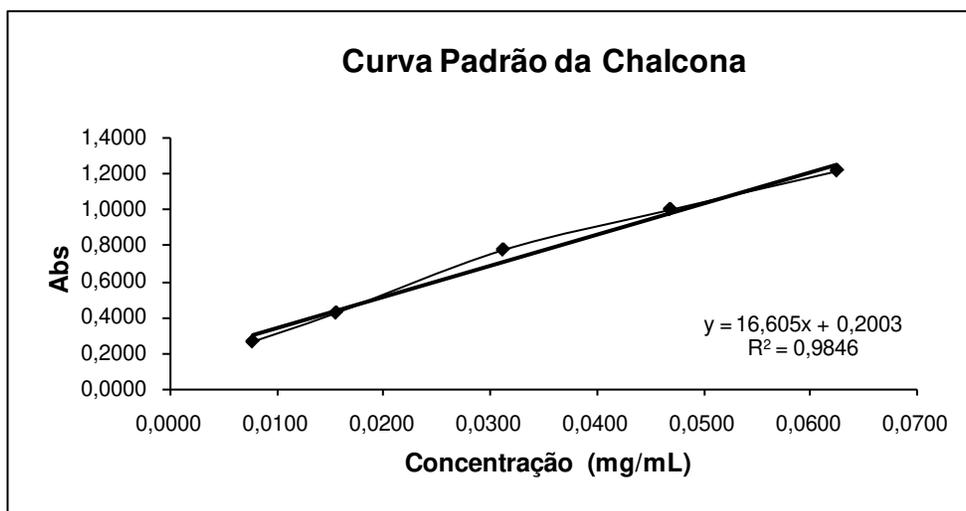


Figura 60 – Curva analítica da chalcona CH8.

As curvas foram realizadas periodicamente, compostas por 5 pontos de concentração de CH8, que apresentaram sempre um coeficiente de regressão linear entre 0,98 e 0,99.

ANEXO IV

Encapsulação da Chalcona CH8 – influência da concentração lipídica

A CH8 na forma líquida foi adicionada aos lipossomas convencionais pré-formados, nesta etapa foi avaliada a influência da concentração lipídica dos lipossomas na encapsulação da CH8. Os resultados do diâmetro médio e da distribuição de tamanhos dos LC vazios nas concentrações lipídicas de $1,0 \cdot 10^{-2}$; $2,0 \cdot 10^{-2}$; $3,0 \cdot 10^{-2}$; $4,0 \cdot 10^{-2}$ e $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e dos LC contendo CH8 encapsulada, estão apresentados separadamente para cada concentração lipídica nas Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

Tabela 13 – Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de EPC.

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	46 – 203	100	$104,1 \pm 12,6$	46 – 153	100	$60,5 \pm 2,3$
0,078	66 – 181	99,7	$109,0 \pm 4,9$	60 – 164	100	$88,2 \pm 2,5$
	330 – 365	0,3	$353,8 \pm 25,6$			
0,149	76 – 120	99,0	$98,1 \pm 2,2$	60 – 151	100	$93,0 \pm 1,7$
	1819 – 1956	1,0	$1913,2 \pm 8,6$			
0,215	71 – 106	70,3	$87,5 \pm 2,9$	61 – 96	100	$88,4 \pm 2,1$
	290 – 355	29,7	$312,6 \pm 5,4$			
0,274	68 – 109	96,2	$86,6 \pm 3,8$	54 – 137	100	$76,9 \pm 1,7$
	3223 – 3682	3,8	$3454,0 \pm 44,8$			
0,329	64 – 101	97,5	$86,5 \pm 2,4$	50 – 127	100	$76,3 \pm 2,0$
	2345 – 2592	2,5	$2555,0 \pm 9,7$			

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Tabela 14 – Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC.

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	45 – 60	48,8	$53,2 \pm 1,6$	39 – 69	99,5	$50,3 \pm 1,8$
	106 – 161	51,2	$136,3 \pm 12,4$	106 – 140	0,5	$122,7 \pm 4,6$
0,078	47 – 157	100	$116,9 \pm 11,9$	40 – 186	100	$62,3 \pm 3,5$
0,149	52 – 242	100	$111,0 \pm 12,2$	44 – 172	100	$69,5 \pm 2,7$
0,215	65 – 231	100	$112,1 \pm 4,3$	49 – 175	100	$77,8 \pm 2,6$
0,274	54 – 251	100	$115,5 \pm 8,8$	45 – 178	100	$70,2 \pm 3,7$
0,329	55 – 228	100	$111,2 \pm 3,4$	45 – 164	100	$74,9 \pm 2,9$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Tabela 15 – Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $3,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC.

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	55 – 59	21,5	$57,2 \pm 2,6$	51 – 63	97,4	$56,8 \pm 1,3$
	128 – 137	78,5	$128,8 \pm 9,4$	119 – 137	2,6	$128,7 \pm 6,5$
0,078	53 – 61	23,6	$58,0 \pm 2,1$	49 – 66	96,7	$57,3 \pm 3,3$
	115 – 142	76,4	$127,1 \pm 7,6$	107 – 142	3,3	$124,8 \pm 9,5$
0,149	37 – 55	8,6	$45,3 \pm 1,2$	37 – 55	96,5	$45,7 \pm 1,7$
	100 – 123	91,4	$121,3 \pm 5,5$	82 – 150	3,5	$119,4 \pm 6,9$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Tabela 16 – Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $4,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC.

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	42 – 266	100	118,7 ± 11,9	33 – 168	100	56,3 ± 2,2
0,078	55 – 60	32,5	56,1 ± 2,3	55 – 64	98,6	57,1 ± 1,4
	120 – 149	67,5	134,1 ± 8,2	112 – 149	1,4	131,9 ± 7,2
0,149	48 – 53	9,2	49,9 ± 1,1	43 – 58	96,5	49,7 ± 0,7
	118 – 130	90,8	129,7 ± 6,4	107 – 144	3,5	129,4 ± 4,9
0,215	74 – 79	52,7	75,6 ± 3,2	69 – 85	98,7	71,6 ± 2,5
	149 – 160	47,3	158,0 ± 8,9	139 – 171	1,3	149,5 ± 7,3

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

Tabela 17 – Influência da encapsulação da CH8 no diâmetro médio dos lipossomas convencionais vazios a $5,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC.

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	48 – 64	40,0	54,2 ± 2,1	43 – 71	99,6	52,1 ± 1,7
	118 – 176	60,0	151,5 ± 6,9	130 – 159	0,4	144,9 ± 4,4
0,078	63 – 73	23,6	58,0 ± 2,1	55 – 82	94,6	58,6 ± 2,1
	138 – 148	76,4	127,1 ± 7,6	117 – 132	5,4	126,8 ± 5,5
0,149	54 – 71	17,8	68,5 ± 1,9	61 – 75	98,5	68,6 ± 2,6
	127 – 163	82,2	147,9 ± 3,7	138 – 158	1,5	148,1 ± 6,1

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

ANEXO V

Encapsulação da Chalcona CH8 – influência das condições de mistura

A CH8 na forma líquida foi adicionada aos lipossomas convencionais pré-formados na concentração lipídica de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, nesta etapa foi avaliada a influência das condições de mistura na encapsulação da CH8. Os resultados do diâmetro médio e da distribuição de tamanhos dos LC vazios e dos LC contendo CH8 encapsulada através de agitação mecânica de alto cisalhamento com impelidor de pá dentada, agitação mecânica de baixo cisalhamento com impelidor âncora, agitação recíproca com Shacker e agitação rotativa com balão rotatório, estão apresentados separadamente para cada condição de mistura nas Tabelas 18, 19, 20 e 21, respectivamente.

Tabela 18 – Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação mecânica de alto cisalhamento (impelidor de pá dentada).

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	46 – 203	100	$104,1 \pm 12,6$	46 – 153	100	$60,5 \pm 2,3$
0,078	65 – 207	100	$113,2 \pm 7,9$	52 – 147	100	$83,5 \pm 4,6$
0,149	48 – 194	100	$117,0 \pm 10,4$	39 – 194	100	$61,8 \pm 1,9$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.

Tabela 19 – Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação recíproca (Shacker).

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	46 – 203	100	104,1 ± 12,6	46 – 153	100	60,5 ± 2,3
0,078	68 – 226	100	110,8 ± 15,5	58 – 190	100	86,3 ± 3,3
0,149	26 – 33	5,1	32,1 ± 0,6	20 – 41	98,7	30,9 ± 1,1
	82 – 165	94,9	118,5 ± 8,8	65 – 131	1,3	101, ± 4,0
0,215	54 – 216	100	121,3 ± 3,1	43 – 216	100	71,4 ± 1,6
0,274	43 – 172	100	117,9 ± 5,3	34 – 217	100	61,1 ± 2,5

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

Tabela 20 – Variação do diâmetro médio dos lipossomas convencionais a $1,0 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de EPC em função da concentração de CH8 encapsulada nos lipossomas pré-formados, com agitação rotatória (balão rotativo).

CH8 (mg/mL)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Controle (LC vazio)	46 – 203	100	104,1 ± 12,6	46 – 153	100	60,5 ± 2,3
0,078	66 – 181	99,7	109,0 ± 4,9	60 – 164	100	88,2 ± 2,5
	330 – 365	0,3	353,8 ± 25,6			
0,149	76 – 120	99,0	98,1 ± 2,2	60 – 151	100	93,0 ± 1,7
	1819 – 1956	1,0	1913,2 ± 8,6			
0,215	71 – 106	70,3	87,5 ± 2,9	61 – 96	100	88,4 ± 2,1
	290 – 355	29,7	312,6 ± 5,4			
0,274	68 – 109	96,2	86,6 ± 3,8	54 – 137	100	76,9 ± 1,7
	3223 – 3682	3,8	3454,0 ± 44,8			
0,329	64 – 101	97,5	86,5 ± 2,4	50 – 127	100	76,3 ± 2,0
	2345 – 2592	2,5	2555,0 ± 9,7			

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

ANEXO VI

Cinética de Complexação

Para determinar a concentração de vesículas dividiu-se a concentração de fosfolipídios pelo número de agregação. Este número refere-se ao número total (n_t) de moléculas de lipídios por lipossoma. O número de fosfolipídios presente nas vesículas foi calculado a partir da área ocupada pela cabeça polar da molécula de fosfatidilcolina de ovo (A_{pc}). Como o lipossoma é uma vesícula composta por bicamada, o número de moléculas presente na camada externa (n_e) é dado por:

$$n_e = \frac{4\pi R^2}{A_{pc}}$$

R: raio hidrodinâmico

onde,

$$R = \frac{D}{2}$$

D: diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (corresponde à espessura da bicamada lipídica)

Considerando a espessura da bicamada (λ) de 4 nm (Lasic, 1997), o número de lipídios na camada interna (n_i) é calculado pela diferença entre o diâmetro externo e a espessura da bicamada lipídica.

$$n_i = \frac{4\pi(R - \lambda)^2}{A_{pc}}$$

O total estimado de moléculas no lipossoma (n_t) é a soma de n_e e n_i (Lasic, 1997).

$$n_t = n_e + n_i$$
$$n_t = \frac{4\pi R^2}{A_{pc}} + \frac{4\pi(R - \lambda)^2}{A_{pc}}$$

$$n_t = \frac{4\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2}{A_{pc}} + \frac{4\pi \left(\frac{D}{2} - \lambda\right)^2}{A_{pc}}$$

Dado que, o diâmetro médio hidrodinâmico, considerado neste caso, é 60 nm (600 Å) e que a área ocupada pela cabeça polar da molécula de fosfatidilcolina de ovo é 71 Å, tem-se que:

$$n_t = \frac{4\pi \left(\frac{600}{2}\right)^2}{71} + \frac{4\pi \left(\frac{600}{2} - 40\right)^2}{71}$$

$$n_t = \frac{1130400}{71} + \frac{849056}{71} = 15921 + 11959 = 27880$$

Uma vez considerado o diâmetro de 60 nm, obte-se 27880 moléculas.

Se a concentração utilizada nas preparações foi de $1 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, pode-se calcular a quantidade de lipossomas por litro, considerando que 1 mol tem $6,023 \cdot 10^{23}$ moléculas.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ lipossoma} \quad \text{—} \quad 27880 \text{ moléculas} \\ x \quad \quad \quad \text{—} \quad 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 10^{-3} \end{array}$$

$$x = \frac{6,023 \cdot 10^{20}}{27880}$$

$$x = 2,16 \cdot 10^{16}$$

Portanto, em um litro temos $2,16 \cdot 10^{16}$ lipossomas.

A complexação do PEG-8L foi avaliada através da contribuição do PEG-8L incorporado e não incorporado, determinada pela razão (R) entre o PEG incorporado no lipossoma (PEG-L) e o PEG na micela (PEG-M), a seguir:

$$R = \frac{PEG - L}{PEG - M} = \frac{60,00 - 45,14}{45,14 - 34,69} = \frac{14,86}{10,45} = 1,42$$

Assim, a razão do PEG incorporado no lipossoma e na micela, pode ser definido por:

$$\frac{PEG - L}{PEG - M} = y$$

$$PEG - M = y \cdot PEG - L$$

Desta forma, o balanço de PEG pode ser calculado:

$$PEG - L + PEG - M = 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$PEG - L + y \cdot PEG - L = 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$PEG - L(1 + y) = 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$PEG - L = \frac{0,4 \cdot 10^{-3}}{(1 + y)}$$

Razão de PEG incorporado no lipossoma:

$$\frac{PEG - L}{lipossoma} = \frac{PEG - L}{2,16 \cdot 10^{16}}$$

$$\begin{array}{ccc} 1 \text{ mol de PEG} & \text{---} & 6,023 \cdot 10^{23} \\ 0,4 \cdot 10^{-3} & \text{---} & z \end{array}$$

$$z = 6,023 \cdot 10^{23} \times 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$z = 2,41 \cdot 10^{20}$$

Tem-se então $2,41 \cdot 10^{20}$ moléculas em um litro.

$$\frac{\text{moléculas de PEG - L}}{\text{lipossoma}} = \frac{2,41 \cdot 10^{20}}{2,15 \cdot 10^{16}} = 1,12 \cdot 10^4$$

$$\frac{\% \text{ de PEG incorporado}}{\text{PEG total}} = \frac{0,4 \cdot 10^{-3}}{1 + y} = \frac{1}{1 + y} \times 100$$

Razão de PEG na micela:

$$\frac{PEG - M}{PEG - L} = 1,42$$

$$PEG - M = Razão \times PEG - L$$

$$PEG - L + (Razão \times PEG - L) = 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$PEG - L(1 + Razão) = 0,4 \cdot 10^{-3}$$

$$PEG - L = \frac{0,4 \cdot 10^{-3}}{(1 + Razão)} = \frac{0,4 \cdot 10^{-3}}{(1 + 1,42)} = 0,16 \cdot 10^{-3}$$

$$\frac{PEG}{lipossoma} = \frac{0,16 \cdot 10^{-3}}{2,15 \cdot 10^{16}} = 0,74 \cdot 10^{-20}$$

$$1 \text{ mol de PEG} \quad \text{—} \quad 6,023 \cdot 10^{23}$$

$$0,74 \cdot 10^{-20} \quad \text{—} \quad w$$

$$w = 6,023 \cdot 10^{23} \times 0,74 \cdot 10^{-20} = 6,023 \cdot 10^{23} = 4,45 \cdot 10^3$$

Tem-se, portanto, 4450 moléculas de PEG por lipossoma.

ANEXO VII

Permeação *in vitro* – diâmetro médio

A permeação foi realizada para as formulações lipossomais: LC vazios, LC contendo CH8, LP vazios e LP contendo CH8, através de membranas sintéticas de nanoporos de 30 nm de diâmetro, a 37 °C, com pressão variando de 2,5 a 20 atm, os resultados estão apresentados para cada formulação separadamente nas Tabelas 21, 22, 23 e 24, respectivamente.

Tabela 21 – Permeação dos lipossomas convencionais vazios, através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

Pressão (atm)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Antes da permeação	46 – 203	100	104,1 ± 12,6	46 – 153	100	60,5 ± 2,3
2,5	14 – 22	7,0	17,7 ± 1,9	14 – 28	99,9	16,2 ± 1,5
	57 – 360	85,7	135,7 ± 18,6			
	571 – 1436	7,3	919,6 ± 56,9			
5	16 – 19	5,7	17,3 ± 1,2	16 – 22	99,8	17,5 ± 0,7
	44 – 179	89,1	109,9 ± 8,6			
	206 – 414	5,2	329,4 ± 33,3			
12	29 – 31	15,1	30,4 ± 0,9	27 – 33	99,4	30,2 ± 1,1
	89 – 95	84,9	95,0 ± 3,4	89 – 102	0,6	94,6 ± 3,1
20	25 – 193	100	89,9 ± 2,8	21 – 116	100	36,0 ± 1,7

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

Tabela 22 – Permeação dos lipossomas peguados vazios (razão molar 60:40 de EPC:PEG), através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

Intensidade (I)				Número (N)		
Pressão (atm)	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Antes da permeação	50 – 55	51,5	51,1 ± 2,5	45 – 61	99,8	51,0 ± 1,9
	137 – 151	48,5	145,4 ± 6,3	137 – 151	0,2	144,6 ± 26,7
2,5	42 – 46	32,9	43,2 ± 1,9	38 – 51	95,6	42,6 ± 1,8
	126 – 140	67,0	130,4 ± 8,6	114 – 140	0,3	127,1 ± 16,9
5	22 – 168	100	66,9 ± 2,4	22 – 83	100	31,0 ± 0,6
12	38 – 47	92,6	45,2 ± 1,4	31 – 57	100	43,3 ± 1,6
	287 – 428	7,4	351,1 ± 24,4			
20	46 – 62	53,4	54,2 ± 2,3	42 – 69	99,5	52,8 ± 1,9
	114 – 140	46,6	129,6 ± 5,2	114 – 140	0,4	127,1 ± 3,8

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

Tabela 23 – Permeação dos lipossomas convencionais contendo CH8 encapsulada, através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

Intensidade (I)				Número (N)		
Pressão (atm)	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Antes da permeação	64 – 101	97,5	86,5 ± 6,6	50 – 127	100	76,3 ± 5,6
	2480 – 2615	2,5	2550,0 ± 88,9			
2,5	43 – 108	68,4	65,8 ± 5,3	43 – 108	100	50,8 ± 3,3
	543 – 1085	27,1	812,9 ± 66,7			
	6854 – 8530	4,6	8037,6 ± 96,3			
5	56 – 60	35,1	57,6 ± 3,6	56 – 65	99,1	58,1 ± 2,9
	130 – 161	64,9	145,8 ± 6,2	122 – 161	0,9	140,8 ± 6,9
12	50 – 57	36,1	54,4 ± 3,9	26 – 61	99,0	53,8 ± 2,7
	116 – 143	63,9	131,4 ± 8,1	116 – 143	1,0	130,0 ± 5,8
20	48 – 59	39,5	53,4 ± 2,9	44- 63	98,6	52,4 ± 2,5
	103 – 137	60,5	120,0 ± 4,5	103 – 137	1,4	117,0 ± 6,0

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm±s), s – desvio padrão.

Tabela 24 – Permeação dos lipossomas peguilados contendo CH8 encapsulada (razão molar 60:40 de EPC:PEG), através de membranas nas pressões de 2,5; 5; 12 e 20 atm.

Pressão (atm)	Intensidade (I)			Número (N)		
	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$	Faixa	%	$\bar{D} \pm s$
Antes da permeação	48 – 59	29,3	$58,0 \pm 4,3$	48 – 66	99,4	$57,3 \pm 3,9$
	162 – 179	70,7	$173,2 \pm 9,0$	147 – 198	0,6	$171,8 \pm 15,8$
2,5	55 – 67	34,6	$62,3 \pm 3,1$	51 – 67	98,1	$61,1 \pm 5,2$
	118 – 157	65,3	$138,6 \pm 6,5$	110 – 157	1,9	$133,1 \pm 11,5$
5	62 – 83	62,4	$70,2 \pm 3,9$	56 – 92	99,5	$67,5 \pm 3,9$
	138 – 206	37,5	$165,3 \pm 13,3$	138 – 186	0,5	$160,0 \pm 11,9$
12	41 – 47	24,7	$43,5 \pm 4,6$	38 – 50	97,2	$43,0 \pm 2,1$
	88 – 101	75,3	$95,9 \pm 7,9$	82 – 109	2,8	$94,7 \pm 4,8$
20	32 – 39	26,3	$37,0 \pm 1,3$	29 – 43	98,2	$36,4 \pm 1,0$
	71 – 96	73,6	$87,2 \pm 4,1$	71 – 106	1,8	$85,5 \pm 6,3$

Faixa de distribuição de tamanhos (nm), % de ocorrência da população, \bar{D} - diâmetro médio (nm \pm s), s – desvio padrão.