

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos Químicos

**ESTUDO DA ESTABILIDADE
DE BICAMADAS LIPÍDICAS
EM PRESENÇA DE TENSOATIVOS**

Alessandro Marra Ribas

Autor

Prof.ª Dra. Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Dissertação submetida à Comissão de Pós Graduação da Faculdade de
Engenharia Química da UNICAMP como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas - SP

Agosto, 1997

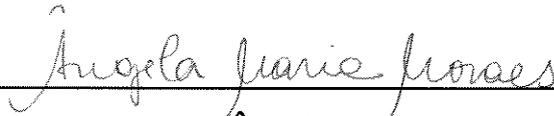


5656145

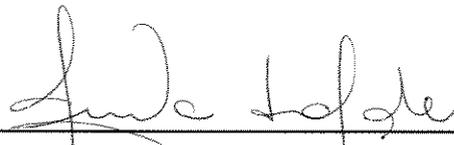
Dissertação defendida e aprovada em 8 de agosto de 1997 pela banca
examinadora constituída pelos professores:



Profª Dra. Maria Helena Andrade Santana

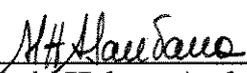


Profª Dra. Ângela Maria Moraes



Profª Dra. Eneida de Paula

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Mestrado defendida por Alessandro Marra Ribas e aprovada pela comissão julgadora em 08/08/97.


Prof^a Dra. Maria Helena Andrade Santana

*Mais ágil que todo o movimento é a sabedoria:
ela atravessa e penetra tudo, graças a sua pureza.
Ela é um sopro do poder de Deus,
uma irradiação límpida da glória do Todo-poderoso;
assim nenhuma mancha pode insinuar-se nela.
Ela é uma efusão da luz eterna,
um espelho sem mancha da atividade de Deus,
e uma imagem de sua bondade.
Embora única, tudo pode
imutável em si mesma, renova todas as coisas*

Salomão

*Com amor, a meus pais
Luiz e
Maria Aparecida
e irmãos
Vinicius e
Andrea*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela amizade, pela orientação segura, pelas sugestões e incentivo em todas as etapas do trabalho.

À Sônia Campos, pela amizade, e apoio fundamental prestado durante a execução do trabalho experimental.

Aos meus familiares, pelo amor, pelo apoio e pela compreensão.

Aos grandes amigos pelo companheirismo e agradável convívio em todos os momentos.

A todos os professores que através das aulas, sugestões e permissão do uso de laboratórios e equipamentos contribuíram para minha aprendizagem e bom andamento do trabalho.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1.0 - INTRODUÇÃO	1
2.0 - REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - Considerações Gerais sobre Lipossomas	4
2.2 - Constituição dos Lipossomas	5
2.3 - Estrutura dos Agregados Anfílicos	7
2.4 - Determinação do Parâmetro de Ordem dos Agregados por Ressonância Paramagnética Eletrônica	10
2.5 - Preparação de Lipossomas	16
2.6 - Estabilidade de Lipossomas em Fluidos Biológicos	18
2.7 - Modificações na Superfície de Lipossomas	20
2.8 - Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativos	24
3.0 - MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 - Síntese do DMPE-PEG	35
3.1.1 - Primeira Etapa - Formação do Intermediário	37
3.1.2 - Segunda Etapa - Preparação do DMPE-PEG	38
3.2 - Purificação do DMPE-PEG	39
3.3 - Caracterização do DMPE-PEG	42

3.3.1 - Cromatografia de Camada Delgada	42
3.3.2 - Medida de Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica	43
3.4 - Preparação de Lipossomas	44
3.5 - Caracterização das Vesículas	47
3.5.1 - Determinação do Teor Total de Fosfato	47
3.5.2 - Determinação do Raio Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho das Vesículas	48
3.6 - Ensaio de Estabilidade de Lipossomas	49
3.7 - Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica	52
4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 - Síntese, Purificação e Caracterização de DMPE-PEG	54
4.2 - Preparação e Caracterização dos Lipossomas	64
4.2.1 - Determinação do Teor Total de Fosfolípidios	64
4.2.2 - Determinação da Pressão de Extrusão	65
4.2.3 - Avaliação de Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Vesículas Multilamelares	70
4.3 - Influência da Porcentagem de DMPE-PEG ₂₀₀₀ na Estabilidade das Vesículas Unilamelares	71
4.4 - Influência do Tamanho da Cadeia de PEG na Estabilidade das Vesículas Unilamelares	77
4.5 - Perfis de Estabilidade dos Lipossomas em Presença dos Tensoativos da Série C _x E _y . Influência do HLB na Estabilidade das Vesículas Unilamelares	79
5.0 - CONCLUSÕES	85

6.0 - SUGESTÕES 88

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática de lipossomas como veículos para encapsulamento de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela), ou ligados a superfície interna/externa (lilás), hidrofóbicos no interior da bicamada (azul) ou de natureza anfifílica (verde) (adaptado de Lasic, 1993). 5
- Figura 2 - Estrutura da molécula de fosfolípido. 7
- Figura 3 - Modelos geométricos de empacotamento (adaptado de Israelachvili, et al.,1980 e Lasic, 1993). 9
- Figura 4 - Representação esquemática do empacotamento da bicamada em diferentes fases (adaptado de New, 1990). 10
- Figura 5: (A) Espectro de absorção RPE de um radical livre nítróxido isolado, mostrando o desdobramento hiperfino devido à interação com o dipolo nuclear ^{14}N ($I=1$). (B) Primeira derivada do espectro de absorção, representando o espectro de um equipamento de detecção de RPE (adaptado de Warren, 1987). 12
- Figura 6. Molécula de marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL). 13
- Figura 7. Estrutura do radical nítróxido (A). Sistema de coordenadas atribuídas ao radical nítróxido (B). 14
- Figura 8. Espectro do marcador 5-SASL em micelas de tensoativo C_{12}E_5 , indicando a medida dos extremos externos e internos ($2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$). 16
- Figura 9. Representação esquemática da interação de lipossomas convencional e Stealth com lipoproteínas e opsoninas (adaptado de Lasic, 1993). 23

- Figura 10. Representação esquemática das pontes de hidrogênio entre moléculas de tensoativo e a água (adaptado de Schick, 1987). 25
- Figura 11 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais (DSPC:DMPE:COL/33:20:47 mol%, 1mM) sonicados em função da concentração de tensoativo $C_{12}E_5$ (Santana, 1993). 27
- Figura 12. Perfil de estabilidade de lipossomas sonicados convencionais e com PEG₂₀₀₀ em função da porcentagem de $C_{12}E_5$ (adaptado de Santana, 1993). 31
- Figura 13. Perfil das configurações de equilíbrio na forma esférica (Pamplona e Santana, 1996). 33
- Figura 14. Rota de síntese do DMPE-PEG 36
- Figura 15 - Esquema da extrusora destacando: entrada (E) e saída (S) da amostra; válvulas de entrada de N_2 (Ve), de conexão (Vc) e de alívio (Va); entrada (Eb) e saída (Sb) do banho termostaticado e suporte da membrana (Su). 46
- Figura 16 - Representação esquemática e disposição das amostras em placa do tipo ELISA. 51
- Figura 17. Espectro original do marcador em membrana (A), espectro do marcador em água (B) e espectro resultante da subtração do espectro original do espectro do marcador em água (C). 53
- Figura 18 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₅₀₀₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 3 (A) e de referência (B). 55
- Figura 19 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₂₀₀₀ e DMPE-PEG₂₀₀₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 1 (A) e de referência (B). 56

- Figura 20 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₇₅₀ e DMPE-PEG₇₅₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 4. 57
- Figura 21 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₅₀₀₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀ sintetizado neste trabalho purificado com gradiente 1 (A) e gradiente 2 (B). 60
- Figura 22 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE-PEG₅₀₀₀. 61
- Figura 23 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE -PEG₂₀₀₀. 62
- Figura 24 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE-PEG₇₅₀. 62
- Figura 25 - Curva de calibração típica do ensaio fosfato. 65
- Figura 26 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesículas convencionais extrudadas à pressão de 10 Kgf/cm² à concentração de 2,5 mM. 67
- Figura 27 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesículas convencionais extrudadas à pressão de 20 Kgf/cm² à concentração de 2,5 mM. 68
- Figura 28 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais (1mM) extrudados 15 vezes à pressão de 10 e 20 Kgf/cm² em presença de C₁₂E₅. 69
- Figura 29. Espectros típicos do marcador 5-SASL em água (A), em micela (100% de tensoativo C₁₂E₅, 24 mM) (B) e em bicamada lipídica (1 mM) (C). 72
- Figura 30. Variação de A// em misturas de vesículas - tensoativo em função da porcentagem de C₁₂E₅. 73

- Figura 31 - Perfis de estabilidade de lipossomas convencional e contendo PEG₂₀₀₀ (1mM), em função da concentração do tensoativo C₁₂E₅, para lipossomas com 3, 6 e 9 % de PEG na superfície. 76
- Figura 32. Perfis de estabilidade de lipossomas convencional e com PEG₂₀₀₀ na superfície (1mM) contendo 1% de marcador de membrana 5-SASL. 77
- Figura 33 - Efeito do tamanho da cadeia de PEG na estabilidade de lipossomas (1mM). Teor de 3% de PEG. 79
- Figura 34 - Perfis de estabilidade de lipossomas convencionais (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos. 81
- Figura 35 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 3% de PEG₂₀₀₀ (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos. 82
- Figura 36 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 6% de PEG₂₀₀₀ (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos. 83
- Figura 37 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 9% de PEG₂₀₀₀ (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG ₂₀₀₀ (gradiente 1).	39
Tabela 2 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG ₅₀₀₀ (gradiente 2).	40
Tabela 3 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG ₅₀₀₀ (gradiente 3).	40
Tabela 4 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG ₇₅₀ (gradiente 4).	41
Tabela 5 - Composição dos lipossomas.	44
Tabela 6 - Tensoativos da série C _X E _Y e suas propriedades	50
Tabela 7 - Alturas relativas médias de eluição em placas de cromatografia de camada delgada em fase reversa do DMPE-PEG.	58
Tabela 8 - Resultados quantitativos das derivatizações do DMPE com PEG de pesos moleculares 750, 2000 e 5000.	61
Tabela 9 - CMC dos fosfolipídios derivatizados com PEG	64
Tabela 10. Valores de A paralelo ($A//$) de vesículas multilamelares.	71
Tabela 11. Parâmetros de ordem (S) e desdobramento hiperfino externo ($A//$) da mistura de vesículas e tensoativo.	74

LISTA DE ABREVIACÕES

5-SASL: ácido 5-doxil esteárico
C₁₂E₅: polioxietileno 5 lauril éter
C₁₂E₈: polioxietileno 8 lauril éter
C₁₄E₈: polioxietileno 8 miristil éter
C₁₆E₈: polioxietileno 8 palmitil éter
C_XE_Y: surfatantes não-iônicos do tipo polioxietileno
CD: 1,1 - carbonil diimidazol
CMC: concentração micelar crítica
COL: colesterol
Da: dalton
DMPE: dimiristoil fosfatidil etanolamina
DMPE-PEG: dimiristoil fosfatidil etanolamina - polietilenoglicol
DSPC: distearoil fosfatidil colina
G: gauss
GM1: monossianogangliosídeo
HEPES: N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2- ácido etanosulfônico]
HLB: balanço hidrofílico-hidrofóbico
HSPI: fosfatidil inositol hidrogenado de soja
PC: fosfatidil colina
PEG: polietilenoglicol metil éter
POE: polioxietileno
RPE: ressonância paramagnética eletrônica
SRE: sistema reticuloendotelial
Tc: temperatura de transição de fases
TEA: trietilamina
TLC: cromatografia de camada delgada
VUP: vesículas unilamelares pequenas

NOMENCLATURA

- α : área transversal da porção hidrofílica do lipídio
 A_x : absorvância média em $x\%$ de tensoativo subtraído o efeito do branco
 A_0 : absorvância média em 0% de tensoativo subtraído o efeito do branco
 \bar{A} : tensor de desdobramento hiperfino
 $A//$: desdobramento hiperfino referente a orientação do eixo longo molecular do marcador paralelo ao campo magnético externo.
 $A\perp$: desdobramento hiperfino referente a orientação do eixo longo molecular do marcador perpendicular ao campo magnético externo.
 br_0 : branco em 0% de tensoativo
 br_x : branco em 0% de tensoativo
 β_e : magnéton eletrônico
 β_N : magnéton nuclear
 D : coeficiente de difusão das partículas
 $\%Ey$: porcentagem do peso molecular da porção hidrofílica
 \bar{g} : fator de desdobramento eletrônico
 \bar{g}_N : fator Zeeman de desdobramento nuclear
 γ : ângulo do cone dentro do qual o eixo longo molecular executa um caminho aleatório
 H_0 : campo magnético externo
 \hat{H}_{roca} : interações spin eletrônico - spin eletrônico
 \hat{H}_{dipolar} : interações spin intermoleculares
 I : spin nuclear
 \hat{I} : operador de momento angular de spin nuclear
 k : constante de Boltzmann
 l : comprimento da cadeia polimérica do lipídio
 mH : massa molecular da porção hidrofílica da molécula de tensoativo
 mL : massa molecular da porção lipofílica da molécula de tensoativo
 p^* : pressão osmótica adimensional
 P : parâmetro de empacotamento
 R : raio da vesícula
 R_0 : raio inicial da vesícula
 R^* : raio da vesícula normalizado
 Rd : altura relativa
 R_h : raio hidrodinâmico
 S : parâmetro de ordem
 \hat{S} : operador de momento angular de spin do elétron
 T : temperatura absoluta
 u : viscosidade do solvente
 v : volume da molécula de lipídio

RESUMO

Lipossomas ou vesículas lipídicas, são estruturas nas quais os fosfolipídios agregam-se em bicamadas, formando partículas capazes de encapsular compostos de natureza tanto hidrofílica quanto hidrofóbica. Essas características fazem dos lipossomas um sistema muito atrativo para diversas aplicações, dentre as quais o encapsulamento e liberação controlada de medicamentos.

Um dos principais problemas associados com as aplicações de lipossomas “*in vivo*” é a perda de estabilidade da bicamada lipídica em presença de fluidos biológicos. As interações com proteínas ou com outras substâncias que apresentam atividade de superfície desestruturam a bicamada, provocando a liberação indesejável do composto encapsulado.

Neste trabalho, estudou-se a estabilidade de lipossomas convencionais e com a superfície modificada com polietilenoglicol (PEG) na presença de tensoativos. A estabilidade das vesículas foi avaliada em função do balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB) da molécula de tensoativo, e do tamanho da cadeia de PEG. Foram usados tensoativos não iônicos do tipo polioxietileno (POE, série C_xE_y) com HLB na faixa de 11,67 a 13,71, e PEG com pesos moleculares de 750, 2000 e 5000 Da.

Os resultados obtidos mostram que a estabilidade dos lipossomas decresce quando o HLB do tensoativo varia de 12,42 para 11,67, sofrendo poucas alterações na faixa de 12,42 a 13,71. A estabilidade cresce com o aumento da concentração de PEG na superfície das vesículas, e com o aumento do seu peso molecular de 750 a 2000 Da. Polietilenoglicol de peso molecular 5000 Da produz uma estabilidade nas vesículas semelhante à obtida com 750 Da.

Os perfis de estabilidade obtidos caracterizam as interações entre lipossomas e tensoativos, e delineiam regiões operacionais em função da concentração de tensoativo, que são informações úteis para aplicações que envolvem o uso de lipossomas *in vivo*, e o estudo de solubilização e reconstituição de membranas funcionais.

ABSTRACT

Liposomes or lipids vesicles, are structures in which the phospholipids aggregate in bilayers, forming particles able to encapsulate compounds with both hydrophilic and hydrophobic character. This feature make liposomes a very attractive system for several applications, such as drug encapsulation for controlled delivery.

One of the main problems associated with liposomes applications “in vivo” is the lack of lipid bilayer stability in presence of biological fluids. The interaction with proteins or other substances which have surface activity desestructure the bilayer, causing the undesirable delivery of the encapsulated compound.

In this work, studies were performed for the stability of conventional and surface modified liposomes containing polyethyleneglicol in the presence of surfactants. Vesicle stability was evaluated in function of surfactant molecule hidrophilic lipofilic balance (HLB), and of the PEG chain lenght. The non-ionic surfactants polyoxyethylenes (POE, C_xE_y series) with HLB ranging from 11.67 to 13.71 were used, as well as PEG with the molecular weights 750, 2000 and 5000 Da.

Our results shows that liposomes stability decreases when surfactant HLB changes from 12.42 to 11.67, showing few variations in the range of 12.42 to 13.71. The stability grows with the increase of PEG concentration on vesicles surface, and with increase of the molecular weight of PEG from 750 to 2000 Da. The use of polyethyleneglycols of 5000 and 750 Da resulted in similar vesicle stability.

The stability profiles observed characterizes the interation between liposomes and surfactants, and show operational regions in function of surfactant concentration. This information is very useful for applications involving the use of liposomes *in vivo*, and for the study of solubilization and reconstitution of functional membranes.

1.0 - INTRODUÇÃO

Os lipossomas, ao lado de outros veículos usados para o encapsulamento de medicamentos, tais como emulsões e géis, fazem parte dos dispositivos para administração controlada de medicamentos na medicina moderna, de grande importância especialmente para terapias nas quais um alvo específico para a liberação da droga deve ser atingido (Kreuter, 1994).

Os avanços obtidos na pesquisa com lipossomas tornam disponíveis um grande número de dados experimentais na literatura, com a aplicação dos lipossomas nos mais diversos campos. Resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* demonstram a eficácia dos lipossomas na terapia de várias doenças, e também apresentam as limitações envolvidas em suas aplicações. Os maiores problemas associados com a veiculação de drogas em lipossomas para uso *in vivo*, estão associados com a estabilidade das vesículas em fluidos biológicos, ao lado da esterilização e do aumento de escala. Esses problemas são referidos na literatura como “Triple S” (Stability, Sterility and Scale-up) (Lasic, 1993).

No metabolismo de compostos exógenos, a partícula estranha ao organismo humano é desestabilizada e rapidamente eliminada da circulação. A desestabilização de grandes partículas como lipossomas resulta principalmente da adsorção de lipoproteínas, que fragilizam a membrana, e de opsoninas, um tipo de proteína cuja função é a de acionar os macrófagos do sistema imunológico (Woodle e Lasic, 1992). No entanto, não somente as moléculas grandes como as de proteínas são responsáveis pela desestabilização das vesículas (Lasic, 1993). Moléculas pequenas, principalmente as de tensoativos, também interagem com a bicamada lipídica, e em certas condições solubilizam as vesículas em micelas. O grau de

desestruturação depende do tamanho, carga e do balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB), que expressa a porcentagem de grupos hidrofílicos na molécula de tensoativo. A resistência oferecida pelas vesículas à penetração do tensoativo é uma função do empacotamento da bicamada e das modificações na sua superfície.

O estudo da estabilidade de lipossomas em presença de tensoativos é de particular interesse para aplicações que envolvem o uso de lipossomas *in vivo*, tais como a obtenção de imagens por ressonância magnética nuclear, a terapia de captura de nêutrons e o tratamento de neoplasias, bem como aplicações *in vitro* como imunodiagnóstico e estudos de solubilização e reconstituição de membranas funcionais. Os perfis de estabilidade em função da concentração de tensoativo determinam regiões operacionais úteis para cada aplicação.

A busca de preparações mais estáveis levou ao desenvolvimento de lipossomas com a superfície modificada através da conjugação covalente de cadeias de polietilenoglicol (PEG), denominados lipossomas “Stealth” ou PEG-lipossomas. “Stealth”, é uma marca registrada da “Liposome Technology Inc., CA”, para designar este tipo de lipossoma. Lipossomas modificados com PEG são capazes de evitar a captura pelo sistema reticuloendotelial, e permanecerem na circulação por períodos de tempo maiores, comparados aos lipossomas convencionais (Allen et al., 1991; Blume e Cevc, 1990, 1992). Essa característica trouxe grandes benefícios, e vários estudos realizados *in vitro* e *in vivo* comprovam a estabilidade dessas vesículas em presença de macromoléculas.

Os mecanismos responsáveis por essa estabilização ainda não são bem conhecidos. Modelos qualitativos atribuem-na ao efeito estérico produzido pela mobilidade das cadeias de PEG na superfície das vesículas (Blume e Cevc, 1993; Lasic, 1991). A estabilidade de lipossomas em presença de tensoativos não tem sido muito estudada na literatura, principalmente para lipossomas com a superfície modificada com PEG.

Neste trabalho, fizemos um estudo da estabilidade de lipossomas convencionais e com a superfície modificada com PEG em presença de tensoativos não iônicos do tipo polioxietileno (POE) da série C_xE_y . Inicialmente foi feita a derivatização e purificação do fosfolípido dimiristoil fosfatidil etanolamina, DMPE, com PEG de pesos moleculares 750, 2000 e 5000. Os fosfolípidos derivatizados, DMPE-PEG, foram caracterizados por cromatografia de camada delgada e pela determinação da sua concentração micelar crítica, CMC. Lipossomas convencionais e com PEG, na forma de vesículas unilamelares pequenas obtidas por extrusão, foram preparados, caracterizados e tiveram sua estabilidade avaliada em presença dos tensoativos. Através dos perfis de estabilidade obtidos em toda a gama de concentrações de tensoativos, foram determinados os efeitos do comprimento da cadeia de PEG, da concentração de PEG nas vesículas, bem como a influência do balanço hidrofílico-hidrofóbico da molécula de tensoativo na estabilidade dos lipossomas.

2.0 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Considerações Gerais sobre Lipossomas

Lipossomas ou vesículas são estruturas esféricas formadas por bicamadas lipídicas que encapsulam parte do solvente em seu interior. Os lipossomas geralmente são biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e não provocam resposta imune pois na maioria das vezes são constituídos de compostos semelhantes aos das membranas celulares. Estas características, fazem dos lipossomas veículos muito importantes para encapsulamento e liberação controlada de medicamentos. Os lipossomas são também úteis para os casos em que a droga na forma livre é altamente tóxica e deve ter sua atividade direcionada para órgãos específicos, reduzindo os efeitos colaterais (Lasic, 1993).

O caráter anfifílico das moléculas da bicamada lipídica que constituem a estrutura esférica dos lipossomas permite o encapsulamento de substâncias hidrofílicas no interior do cerne aquoso, ou ligadas quimicamente nas partes internas ou externas da superfície da bicamada. Substâncias com caráter hidrofóbico localizam-se no interior da bicamada, e substâncias com caráter misto situam-se na interface das regiões polar e apolar, intercaladas entre os lipídios da bicamada (Figura 1).

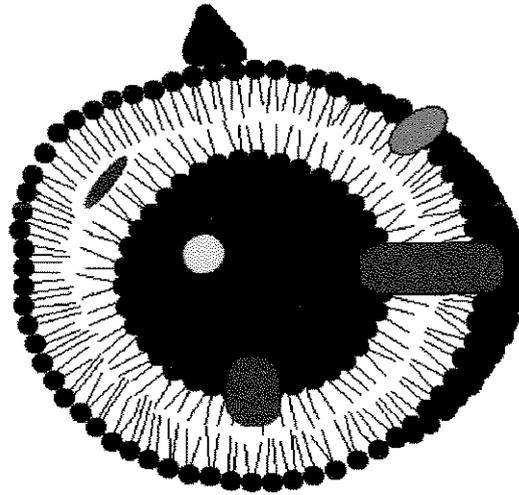


Figura 1: Representação esquemática de lipossomas como veículos para encapsulamento de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela), ou ligados a superfície interna/externa (lilás), hidrofóbicos no interior da bicamada (azul) ou de natureza anfifílica (verde) (adaptado de Lasic, 1993).

2.2 - Constituição dos Lipossomas

Lipossomas são constituídos basicamente de moléculas anfifílicas que se caracterizam pela presença, de um grupamento hidrofílico (cabeça polar) e outro grupamento hidrofóbico (cauda apolar), em uma mesma molécula. Dentre esta classe de substâncias estão os lipídios polares, mais especificamente os fosfolipídios, que se encontram presentes na membrana citoplasmática da maioria das células animais e vegetais (Lasic, 1993).

As cabeças polares podem conter cargas positiva, negativa, possuírem caráter zwitteriônico ou serem neutras. O caráter polar é dado pelo grupo hidroxila, carboxila, amina ou fosfato. A parte hidrofóbica é constituída de uma ou duas cadeias de ácidos graxos que freqüentemente possuem de 14 a 18 carbonos e podem ser saturadas ou insaturadas. As cadeias completamente saturadas podem adquirir diversas conformações devido à liberdade de

rotação das ligações simples. Esta liberdade de rotação é restringida para o caso de cadeias insaturadas sendo a conformação trans raramente encontrada entre os lipídios naturais. Estas características estruturais dos lipídios conferem aos lipossomas diferenças nos parâmetros físicos tais como estabilidade, permeabilidade da bicamada e temperatura de transição de fases (Lasic, 1993).

As cadeias de hidrocarbonetos podem estar ligadas diretamente à cabeça hidrofílica como no caso dos lipídios polares de cadeia única ou ligados a uma molécula de glicerol ou esfingosina que atuam como uma espécie de espinha dorsal para os lipídios de uma ou duas cadeias. Os lipídios de cadeia dupla encontrados na natureza podem ser classificados em quatro principais categorias, segundo os grupos de cabeça polar (fosfato ou glicosídeos) e componente de ligação entre a cabeça e a cauda (glicerol ou esfingosina). Assim tem-se os esfingoglicolipídios, esfingofosfolipídios, gliceroglicolipídios e os glicerofosfolipídios. Os glicerofosfolipídios, mais comumente chamados de fosfolipídios, são os mais amplamente usados na preparação de lipossomas (Lasic, 1993).

Na Figura 2 é apresentada a estrutura da molécula de fosfolipídio onde R1 e R2 são ácidos graxos, saturados ou não, enquanto o grupamento R3 distingue os diversos fosfolipídios, como por exemplo fosfatidil colina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), fosfatidil etanolamina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), fosfatidil serina ($-\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+\text{COO}^-$) fosfatidil glicerol ($-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), etc.

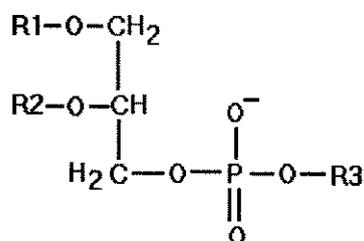


Figura 2 - Estrutura da molécula de fosfolípido.

A presença de colesterol na composição da membrana lipídica aumenta sua estabilidade, decresce a mobilidade interna de suas moléculas e reduz a permeabilidade na bicamada, em temperaturas abaixo da temperatura de transição (T_c), melhorando assim as propriedades da vesícula. Na fase líquido cristalina, a interação do colesterol com as cadeias de hidrocarbonetos fluidos aumenta a ordem e a densidade de empacotamento dentro da membrana. Devido à esta interação, a presença de colesterol suprime a transição de fases e a membrana pode existir em uma ampla faixa de temperatura na fase líquida (Lasic, 1993).

2.3 - Estrutura dos Agregados Anfílicos

Os lipossomas pertencem a uma classe especial de cristais líquidos, que são assim designados por possuírem características tanto do estado líquido, como fluidez e tendência em formar bolhas, quanto do estado sólido, como anisotropia mecânica, óptica e elétrica. Nos lipossomas, as moléculas de fosfolípidios agregam-se com diferentes tipos de ordem orientacional e posicional formando fases, as quais variam principalmente em função do tipo de molécula, da solubilidade, concentração, temperatura e ainda pH e força iônica para o caso de anfílicos iônicos (Lasic, 1993).

A agregação das moléculas anfífilas começa a partir de uma concentração micelar crítica (CMC) que é definida como a concentração mínima necessária para formar um agregado. Na CMC os monômeros e os agregados se encontram em equilíbrio. Com o aumento da concentração de moléculas anfífilas há a formação de agregados nas formas hexagonal, lamelar, cúbica ou de micelas. Os lipídios de cadeia dupla, em geral, não formam micelas devido ao grande volume das suas cadeias, agregando-se preferencialmente em bicamadas, formando estruturas lamelares (Lasic, 1993).

Para se prever a forma do agregado, foi definido o parâmetro de empacotamento P (equação 1), que considera a forma do agregado em função da geometria do monômero (Israelachvili, 1994). Assim,

$$P = \frac{v}{a \cdot l} \quad (1)$$

onde v é o volume da molécula, a é a área transversal do grupo da cabeça polar e l é o comprimento das cadeias de hidrocarbonetos. Modelos geométricos de empacotamento para vários valores de P são apresentados na Figura 3. Para o caso de misturas, o cálculo de P deve levar em conta a contribuição de cada fração presente.

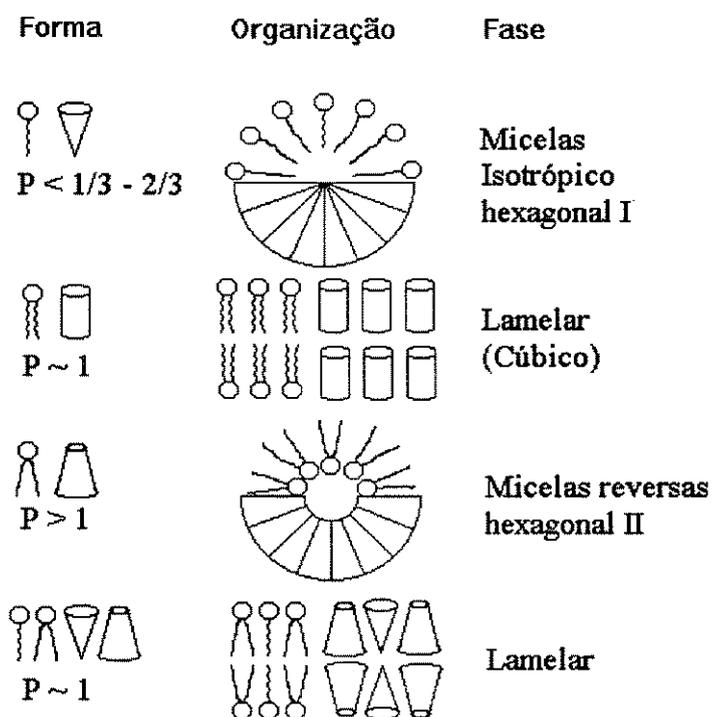


Figura 3 - Modelos geométricos de empacotamento (adaptado de Israelachvili, et al.,1980 e Lasic, 1993).

Com o aumento da temperatura, as cadeias de hidrocarbonetos tendem a mudar de conformação e expandir a sua área ocupada, provocando a transição da fase gel, mais ordenada, para a fase de líquido cristalina, menos ordenada (New, 1990). A temperatura de transição (T_c) caracteriza a mudança de fases. Uma representação, do empacotamento da bicamada nas fases gel e líquido cristalino é apresentada na Figura 4.

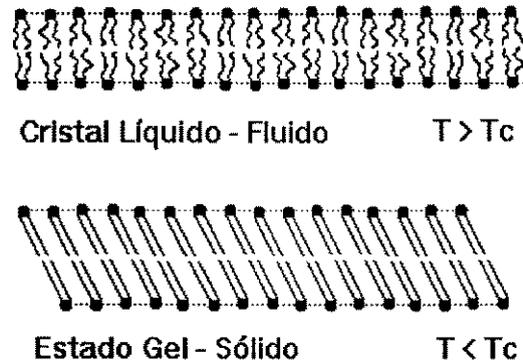


Figura 4 - Representação esquemática do empacotamento da bicamada em diferentes fases (adaptado de New, 1990).

2.4 - Determinação do Parâmetro de Ordem dos Agregados por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os diferentes tipos de estruturas formadas pelas moléculas anfifílicas possuem graus variados de organização, que são característicos de cada estrutura agregada e portanto podem ser úteis em sua identificação. O parâmetro de ordem, designado por S , caracteriza o grau de organização de um agregado e seu valor varia de 0 (sistemas isotrópicos) a 1 (sistemas perfeitamente orientados). Em membranas, o grau de organização determina propriedades importantes tais como fluidez e estabilidade da estrutura. A determinação do parâmetro de ordem é portanto, de fundamental importância no estudo de interações entre lipossomas e tensoativos, para o entendimento dos mecanismos de transformação envolvidos, através da caracterização das estruturas agregadas formadas (Inoue et al., 1994).

A Ressonância Paramagnética Eletrônica é um dos métodos mais usados para a determinação do parâmetro de ordem de agregados. Os fundamentos desse método são descritos abaixo.

Na maioria dos materiais, os elétrons dos átomos constituintes estão emparelhados e o momento magnético resultante é nulo. No entanto, há certas substâncias na qual os átomos possuem elétrons desemparelhados, os quais apresentam um momento magnético intrínseco. Na presença de um campo externo o alinhamento do vetor de momento magnético produz um aumento do campo, que caracteriza o fenômeno conhecido como paramagnetismo (Warren, 1987).

Um elétron desemparelhado pode sofrer ressonância magnética com uma frequência ressonante na região de microondas do espectro eletromagnético a qual produz transições de estados de spin eletrônico. A energia correspondente a estas transições é da ordem de grandeza daquela envolvida em movimentos translacionais, rotacionais e segmentares das moléculas, o que permite a análise destes movimentos através dos espectros de ressonância magnética. Esse fenômeno é usualmente conhecido como ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Desvios da frequência ressonante causados pelo campo magnético local ocorrem primariamente devido ao núcleo do átomo de origem, o qual por si só apresenta características magnéticas. No átomo de nitrogênio a fonte mais comum de radical livre paramagnético é o núcleo ^{14}N que possui spin nuclear, $I = 1$, e pode existir em três estados de spin. Como resultado os elétrons desemparelhados dos átomos, apresentam três ambientes magnéticos possíveis, nos quais o campo nuclear atua reforçando, se opondo ou não afetando o campo externo H_0 . Desta forma três picos de ressonância são

observados na qual a separação é independente da intensidade do campo externo, um fenômeno conhecido como desdobramento hiperfino (Figura 5 (A)). Espectros de RPE são geralmente apresentados na forma derivada pois isto permite a determinação mais precisa dos parâmetros espectrais (Figura 5 (B)).

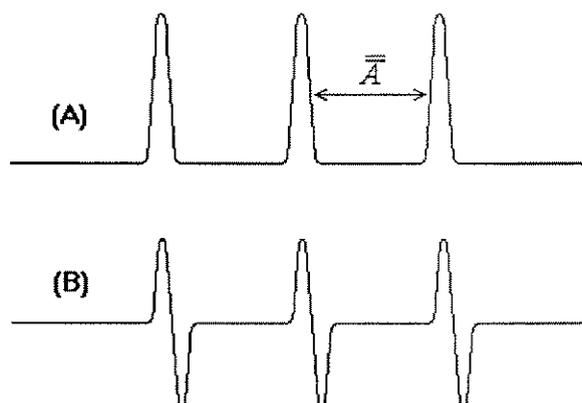


Figura 5: (A) Espectro de absorção RPE de um radical livre nitróxido isolado, mostrando o desdobramento hiperfino devido à interação com o dipolo nuclear ^{14}N ($I=1$). (B) Primeira derivada do espectro de absorção, representando o espectro de um equipamento de detecção de RPE (adaptado de Warren, 1987).

O paramagnetismo natural de materiais biológicos é muito baixo, por isto é comum a introdução física de marcadores de spin intercalados entre as moléculas da membrana ou entre as moléculas de tensoativo das micelas. Os marcadores são geralmente compostos contendo radicais livres de nitróxido, um grupo quimicamente estável, relativamente não-reativo devido à proteção dos grupos metila. Na Figura 6 é apresentado o marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL).

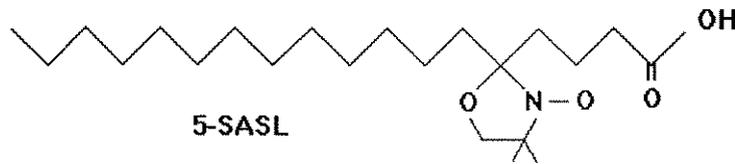


Figura 6. Molécula de marcador de spin ácido 5-doxil esteárico (5-SASL).

O elétron desemparelhado do grupo nitróxido está associado ao átomo de nitrogênio, e sua órbita é altamente anisotrópica, promovendo uma forte dependência entre a sua orientação e o espectro de RPE.

A função Hamiltoniana de spin, \hat{H} , descrevendo a energética das transições de spin, pode ser representada por (Carrington e McLauchlan, 1967):

$$\hat{H} = \beta_e \cdot \bar{H}_0 \bar{g} \hat{S} + \hat{S} \bar{A} \cdot \hat{I} + \beta_N \bar{H}_0 \cdot \bar{g}_N \cdot I + \hat{H}_{\text{troca}} + \hat{H}_{\text{dipolar}} \quad (2)$$

onde β_e e β_N são os magnêtons eletrônico e nuclear, respectivamente, \bar{g}_N é o fator Zeeman de desdobramento nuclear, \hat{S} é o operador de momento angular de spin do elétron, \hat{I} é o operador de momento angular do spin do núcleo e \bar{A} o tensor de desdobramento hiperfino. Nessa equação o primeiro termo representa as interações eletrônicas de Zeeman, o segundo termo as interações hiperfinas (entre spin eletrônico e spin nuclear), e o terceiro termo representa a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (termo nuclear de Zeeman), que é desprezível nas condições usuais de uso de marcador de spins em RPE (Schreier et al., 1978). Os termos \hat{H}_{troca} e \hat{H}_{dipolar} referem-se às interações spin eletrônico - spin eletrônico intermoleculares, que ocorrem em altas concentrações de radicais ou poliradicaís respectivamente, que neste caso são desprezíveis pois os marcadores de spin são incorporados em baixa

concentração em membranas (1 - 2 mol%). Quando as interações \hat{H}_{roca} e \hat{H}_{dipolar} estão ausentes o espectro resultante mostra três transições possíveis separadas pela constante de desdobramento hiperfino (\bar{A}).

O desdobramento hiperfino, \bar{A} , e o fator \bar{g} do elétron são propriedades tensoriais e, portanto, anisotrópicas, dependentes da orientação da amostra em relação ao campo H_0 . Assim, os espectros de RPE dependem da orientação dos eixos principais da molécula em relação ao campo magnético externo. Pode-se estabelecer coordenadas cartesianas onde a direção x é paralela à ligação N-O, a direção y é perpendicular à ligação N-O e se estende no plano da estrutura do anel, e a direção z é perpendicular à estrutura do anel (vide Figura 7). Esse sistema coincide com a direção dos principais componentes dos tensores \bar{g} e \bar{A} (\bar{g}_{xx} , \bar{g}_{yy} , \bar{g}_{zz} e \bar{A}_{xx} , \bar{A}_{yy} e \bar{A}_{zz}) (Wertz e Bolton, 1972). Para a maioria dos radicais nitróxidos, os valores de \bar{g} e \bar{A} variam em torno de : $\bar{g}_{xx} \approx 2,0009$, $\bar{g}_{yy} \approx 2,006$, $\bar{g}_{zz} \approx 2,002$; $\bar{A}_{xx} \approx \bar{A}_{yy} \approx 6\text{G}$ e $\bar{A}_{zz} \approx 32\text{G}$ (Griffith et al., 1965; Schreier et al., 1978). O marcador de spin, ao ser intercalado na bicamada, orienta-se perfeitamente. Os marcadores do tipo 5-SASL orientam-se com o eixo z aproximadamente paralelo à normal da bicamada.

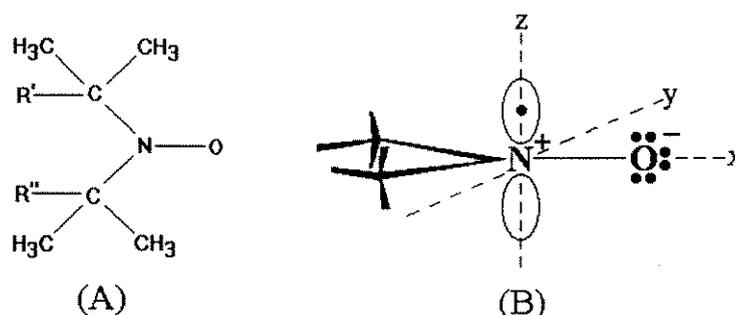


Figura 7. Estrutura do radical nitróxido (A). Sistema de coordenadas atribuídas ao radical nitróxido (B).

O parâmetro de ordem em membranas, tem como base de cálculo a anisotropia dos fatores \bar{g} e \bar{A} e é definido pela equação 3 (Jost et al., 1971):

$$S = \frac{1}{2}(\cos \gamma + \cos^2 \gamma) \quad (3)$$

onde γ é o ângulo do cone dentro do qual o eixo longo molecular executa um caminho aleatório. O parâmetro de ordem, reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula pois é uma medida da orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada). O seu valor varia de 0 (sistemas isotrópicos) até 1 (sistemas perfeitamente orientados).

O parâmetro de ordem, pode ser experimentalmente determinado para marcadores cujo eixo longo molecular coincide com a direção do componente principal do tensor hiperfino \bar{A}_{zz} pela equação:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2} \quad (4)$$

onde $A_{//}$, e A_{\perp} referem-se aos desdobramentos hiperfinos correspondentes aos marcadores orientados com seus eixos longos moleculares dispostos de forma paralela e perpendicular, em relação ao campo magnético. Considerando-se uma simetria cilíndrica ao redor do eixo longo molecular, esses valores representam as médias do movimento em relação a este eixo. Nestes casos onde o eixo z é paralelo ao eixo longo molecular o espectro apresenta extremos internos e extremos externos que podem ser usados para a determinação de $A_{//}$ e A_{\perp} (Hubbel e McConnell, 1971). A Figura 8 mostra as medidas dos extremos internos e externos ($2A_{//}$ e $2A_{\perp}$), no espectro do

marcador 5-SASL em micelas de tensoativo $C_{12}E_5$ usados para o cálculo de S segundo a equação 4. Quando a ordem do ambiente no qual o marcador está inserido é pequena, os extremos internos não são resolvidos e o parâmetro de ordem não pode ser determinado diretamente. O parâmetro $2A_{||}$ é definido como a amplitude do campo magnético entre os dois picos que aparecem do movimento altamente anisotrópico do marcador de spin. Esse parâmetro é aproximadamente proporcional ao parâmetro de ordem S , de acordo com a equação 4, e é usado como uma medida convencional para avaliação da ordem do meio na qual o marcador está imerso. Quanto maior o valor de $2A_{||}$ maior é a ordem da membrana, e conseqüentemente menor é a fluidez do meio (Inoue et al., 1994 a).

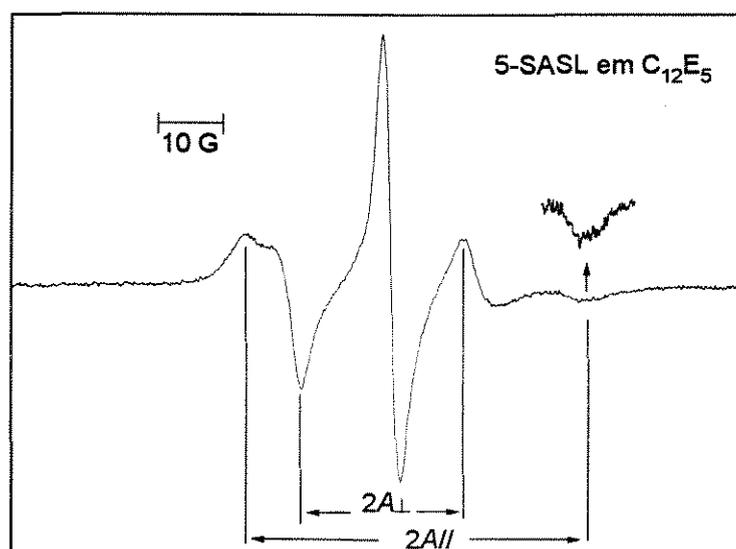


Figura 8. Espectro do marcador 5-SASL em micelas de tensoativo $C_{12}E_5$, indicando a medida dos extremos externos e internos ($2A_{||}$ e $2A_{\perp}$).

2.5 - Preparação de Lipossomas

Existem diversos métodos de preparação de lipossomas, os quais produzem vesículas com características específicas adequadas às diferentes

aplicações (Lasic, 1993). De uma maneira geral, os lipossomas são formados mediante a introdução dos lipídios em meio aquoso, e adição de energia ao sistema. Para que a hidratação seja eficiente é necessário aumentar a área superficial ocupada pelos lipídios. Isto pode ser feito através da obtenção de um filme seco de lipídios, pela dissolução e evaporação de solvente orgânico, por liofilização dos lipídios, ou ainda pela obtenção de pó fino de lipídios obtidos por pulverização por atomização de suas soluções em solventes orgânicos. Uma outra alternativa para introduzir os lipídios em ambiente aquoso, é fazê-lo diretamente de uma fase orgânica através de emulsificação, injeção, diálise do solvente e extração, que dependem da miscibilidade do solvente orgânico em água.

As vesículas preparadas assim são multilamelares e heterogêneas. A transformação em vesículas unilamelares e aproximadamente homogêneas em tamanho, é feita por via mecânica, eletrostática ou química. Dentre os tratamentos mecânicos estão a extrusão, prensa francesa, microfluidização e sonicação. O método da extrusão é baseado em forçar a dispersão de vesículas multilamelares através de filtros com diâmetro de poros bem definidos sob pressão, exercida por um gás inerte. As células de extrusão podem ser encamisadas para extrusão à temperatura controlada e usadas com membranas de diferentes diâmetros e tamanho de poros comercialmente disponíveis. Dentre as vantagens de se usar a extrusão estão a ausência de solventes orgânicos ou detergentes, as altas concentrações de lipídios que podem ser empregadas, alta eficiência de encapsulamento que pode ser alcançada, facilidade e rapidez de preparação, e a obtenção de vesículas com distribuição de tamanho homogêneas a partir de dez extrusões e com boa reprodutibilidade (Hope et al., 1985). A unilamelaridade e eficiência de encapsulamento podem ser significativamente aumentadas por sucessivas

etapas de congelamento e descongelamento das vesículas multilamelares antes da extrusão, que também tem a função de homogeneizar o conteúdo interno dos lipossomas (Mayer et al.; 1985, 1986). No entanto, Hope e colaboradores (1985), concluíram que a grande maioria das vesículas produzidas por repetidas extrusões de vesículas multilamelares grandes através de membranas com diâmetro de poro de 100 nm na ausência de congelamento/descongelamento são unilamelares e portanto podem ser obtidas diretamente.

2.6 - Estabilidade de Lipossomas em Fluidos Biológicos

Lipossomas usados na administração controlada de medicamentos interagem com os vários componentes presentes nos fluidos biológicos, principalmente com proteínas. Estas interações podem ser do tipo carga-carga e/ou hidrofóbicas, que levam à adesão ou adsorção das proteínas na superfície das vesículas (Lasic, 1993). A adsorção juntamente com a troca de lipídios principalmente com lipoproteínas de alta densidade pode resultar na perda do material encapsulado, e também na desintegração dos lipossomas (Woodle e Lasic, 1992).

Quando os lipossomas entram no fluxo sanguíneo há predominantemente duas interações: com as lipoproteínas do sangue e com as opsoninas, proteínas cuja função é a de acionar os macrófagos do sistema imunológico (Woodle e Lasic, 1992). Diversos fatores tais como densidade de empacotamento da bicamada, hidrofílicidade e rede de cargas na superfície, bem como a própria proteína influenciam na interação entre as macromoléculas derivadas do plasma e as vesículas (Blume e Cevc, 1993). A interação com lipoproteínas envolve a troca de lipídios e conseqüentemente a desintegração dos lipossomas enquanto a adsorção das opsoninas, produz

intercalação ou ligação eletrostática de macromoléculas marcadoras tais como imunoglobulinas, na superfície dos lipossomas, os quais ligando-se a receptores situados nos macrófagos produzem a eliminação dos lipossomas da corrente sanguínea.

A origem molecular da troca de lipídios e penetração na bicamada depende do estado físico dos lipossomas. A presença de impurezas, surfatantes de cadeia simples, defeitos estruturais e alto raio de curvatura facilitam a desestruturação da bicamada. A adição de colesterol em concentrações na faixa de 30 a 50% elimina a transição de fases, aumenta a fluidez e a estabilidade dos lipossomas (Woodle e Lasic, 1992; Lasic, 1993). No entanto a presença de colesterol na bicamada lipídica pode interferir significativamente na incorporação de grandes quantidades de drogas lipofílicas dentro da bicamada. Isto ocorre devido a competição entre as moléculas lipossolúveis e colesterol pelo posicionamento no interior da membrana hidrofóbica (Blume e Cevc, 1993).

Os macrófagos são células especializadas que representam os principais componentes do sistema imunológico dos seres vivos. Sua função mais simples é a de capturar partículas estranhas presentes na circulação sanguínea através do reconhecimento por meio de ligantes seletivos contidos em sua superfície. Células deste tipo são comumente referidas como componentes do sistema reticuloendotelial (SRE), e existem nas membranas receptoras do plasma no fígado, baço, intestino, pulmão, pele ou podem circular no sangue como monócitos (Lasic, 1993).

As interações de lipossomas com as células ocorrem por troca de lipídios ou proteínas com as membranas celulares, por adsorção ou ligação

com as células, por endocitose ou fagocitose e por fusão com as membranas celulares (Lasic, 1993).

Estas considerações mostram que o sistema imunológico é alvo passivo e que os lipossomas podem ser excelentes veículos de compostos terapêuticos para doenças associadas ao SRE. O direcionamento para outros órgãos ou alvos ativos é feito através da modificação da superfície dos lipossomas com compostos que impedem a adsorção de macromoléculas e do reconhecimento molecular através da ligação de anticorpos na superfície das vesículas.

2.7 - Modificações na Superfície de Lipossomas

As primeiras abordagens para a modificação da superfície de lipossomas para aumentar a sua estabilidade, foram feitas por métodos de recobrimento. Lipossomas foram cobertos através de ligações covalentes, com produtos naturais tais como proteínas, polissacarídeos e polímeros anfipáticos (Woodle e Lasic, 1992; Lasic, 1993). Apesar da proteção da superfície proporcionada por estes materiais, os lipossomas não apresentaram melhoramentos com relação à estabilidade biológica e tiveram a sua estabilidade física diminuída, o que não atendia às necessidades do seu uso para a liberação controlada de medicamentos (Lasic, 1993). Métodos envolvendo a co-mistura de moléculas anfipáticas com grupos especiais de cabeça polar tais como as de gangliosídios ou fosfatidil inositol hidrogenado de soja (HSPI), presentes a baixas razões molares na bicamada lipídica, representaram uma evolução em termos de estabilidade biológica. Particularmente, o uso do monossianogangliosídio GM1, produziu lipossomas capazes de permanecer por um tempo mais prolongado na corrente sanguínea (Allen et al., 1985; 1987; 1989; Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). Uma

limitação específica para o uso do gangliosídeo GM1 é principalmente o seu custo. Na forma natural, é extraído em pequenas quantidades da massa cinzenta do cérebro, enquanto que a sua síntese é feita em várias etapas, com baixo rendimento. No caso do HSPI este lipídio tem uma solubilidade reduzida em diversos solventes dificultando a formação de lipossomas uniformes (Wodlle et al., 1992 a).

A alternativa mais bem sucedida até agora para melhorar a estabilidade biológica de lipossomas *in vivo* é a modificação da superfície das vesículas com polietilenoglicol, PEG. Uma das vantagens da utilização de PEG é o seu baixo custo comparado ao GM1 e o fato de que seus derivados fosfolipídicos podem ser preparados facilmente com elevado grau de pureza, e bons rendimentos. Trabalhos recentes mostram que o uso de PEG melhora sensivelmente a estabilidade de lipossomas no sangue (Allen et al., 1991; Papahadjopoulos et al., 1991; Klibanov et al., 1990; 1991; Litzinger e Huang, 1992; Blume e Cevc, 1990; 1992). A presença de PEG na superfície das vesículas tem grande influência em sua distribuição nos tecidos, bem como um aumento na eficácia farmacológica de drogas antitumorais. Este efeito é muito superior comparado ao dos lipossomas convencionais, prolongando o tempo de circulação em mais de cinco vezes, reduzindo a captura em tecidos de órgãos tais como o fígado e o baço e um correspondente aumento de acúmulo ao redor de tumores implantados (Papahadjopoulos et al., 1991). O prolongamento da permanência na circulação dos lipossomas modificados com PEG só é efetivamente observado para vesículas de diâmetros inferiores a 200 nm (Klibanov, 1991) tendo como valor ótimo 100 nm (Lasic, 1993). Woodle e Lasic (1992) abordaram em publicação o estado da arte dos lipossomas com a superfície modificada com PEG.

Woodle e colaboradores (1992 a) ao estudarem a influência do comprimento da cadeia de PEG verificaram que para vesículas contendo 5 % de PEG na superfície é necessário um peso molecular mínimo de 750 daltons, para que haja uma maior permanência dos lipossomas na circulação sanguínea e diminuição de captura pelo sistema reticuloendotelial. Os melhores resultados foram obtidos com PEG de peso molecular 2000 Da, não sendo observadas diferenças significativas com o aumento da cadeia de PEG para 5000 Da.

A estabilidade *in vivo* dos lipossomas derivatizados com PEG é independente da presença de colesterol, grau de saturação e carga dos lipídios, bem como a sua farmacocinética é independente da dose inicial aplicada, o que não ocorre para lipossomas convencionais que demonstram estreita dependência de captura pelo sistema mononuclear em função da dose lipídica ou presença de colesterol (Woodle et al., 1992 a; Blume e Cevc 1993).

De fato, a versatilidade obtida com essas novas formulações tem mostrado benefícios terapêuticos substanciais, e com isso as aplicações médicas dos lipossomas contendo PEG têm se tornado importantes. Apesar dos vários estudos, os mecanismos responsáveis pela estabilização desses lipossomas não estão ainda totalmente explicados. O potencial para a estabilização estérica de colóides através da proteção com PEG foi proposto como a origem molecular da estabilidade de lipossomas em plasma. Nesse contexto, a estabilização resulta da concentração local de grupos altamente hidratados na superfície das vesículas, que estericamente inibem as interações eletrostáticas e hidrofóbicas de componentes do plasma (Figura 9) (Lasic, 1991; 1993). Algumas evidências desse efeito foram obtidas através de medidas do potencial de superfície e mobilidade eletroforética (Woodle et al.,

1992 b), e das forças de repulsão na bicamada (Needham et al., 1992), indicando que as cadeias de PEG acomodam-se em conformação estendida sobre a superfície das vesículas.

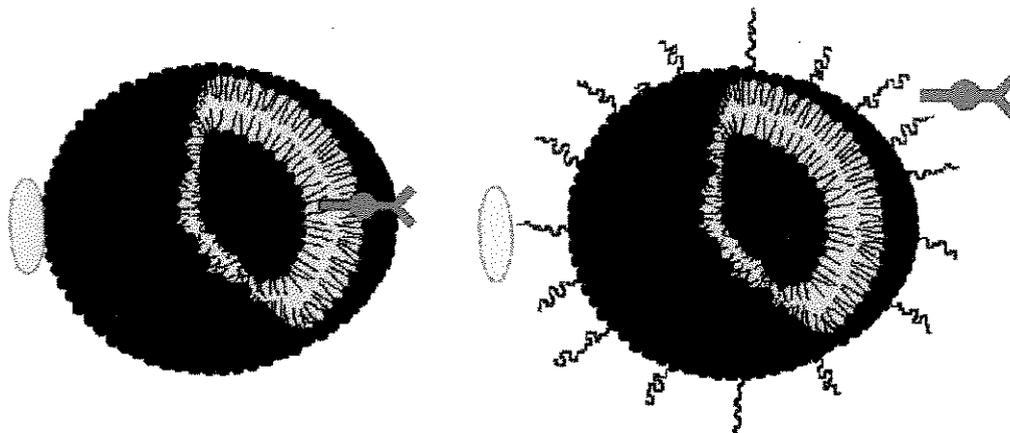


Figura 9. Representação esquemática da interação de lipossomas convencional e Stealth com lipoproteínas e opsoninas (adaptado de Lasic, 1993).

Blume e Cevc (1993) observaram que nem a hidrofiliicidade da superfície das vesículas de lipídio nem o empacotamento compacto das cadeias de hidrocarbonetos são suficientes para prolongar o tempo de circulação dos lipossomas “in vivo”. A presença de grupos que apresentam mobilidade significativa na superfície das vesículas, impedem a adsorção prolongada devido à permanente ruptura das ligações proteína lipídio pelas excitações térmicas da superfície. Portanto mobilidade, tamanho e concentração dos grupamentos ligados à superfície das vesículas, são de fundamental importância para a prevenção da adsorção de macromoléculas na superfície da bicamada.

Uma característica importante do PEG é que, quando utilizado na forma livre, este composto atua como agente fusogênico. A adição de concentrações relativamente baixas de PEG (P.M. 1000 e 6000) a soluções inicialmente claras de lipossomas sonicados produz um considerável aumento

na turbidez da solução. Análises por microscopia eletrônica destas soluções revelaram que o PEG induz primeiro uma agregação e posteriormente uma aparente fusão das vesículas, levando à formação de estruturas multilamelares grandes (Goñi e Alonso, 1986).

2.8 - Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativos

Tensoativos ou surfatantes são substâncias com atividade de superfície que possuem uma porção apolar de hidrocarbonetos ligados a um grupamento polar ou iônico, formando tensoativos não-iônicos e iônicos respectivamente. O grau de atividade superficial dos tensoativos é resultante dos efeitos destas porções polar (hidrofílica) e apolar (hidrofóbica). A hidrofílicidade pode ser quantificada através do parâmetro HLB da molécula e para tensoativos da série C_xE_y é calculado pela seguinte equação de definição (Schick, 1987):

$$HLB = \frac{\%E_Y}{5} = \frac{20 \cdot mH}{mH + mL} \quad (5)$$

onde $\%E_Y$ é a porcentagem do peso molecular da porção hidrofílica (polioxietileno), mH é a massa molecular da porção hidrofílica da molécula de tensoativo e mL a massa da porção lipofílica da molécula de tensoativo. O valor do HLB clássico de surfatantes não iônicos baseado na estrutura molecular original não leva em conta diversos fatores que afetam o desempenho do surfatante, tais como o efeito da temperatura e de substâncias presentes no meio (Schick, 1987). De acordo com a equação 5, o valor do HLB varia de zero a vinte, aumentando com a hidrofílicidade do tensoativo.

Um parâmetro importante de sistemas aquosos de tensoativos não iônicos e especialmente dos polioxietileno, é a temperatura na qual soluções micelares quando aquecidas se separam em duas fases, tornando a mistura turva. Esta temperatura é comumente conhecida como ponto de turvação “cloud point”, e possui uma leve dependência com a variação da concentração. Abaixo do ponto de turvação o surfatante está completamente dissolvido na água enquanto que acima desse ponto, há uma redução de solubilidade, resultando em um aumento de turbidez da mistura devido a formação de grandes agregados. A solubilidade dos tensoativos do tipo polioxietilenos é atribuída as pontes de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio do solvente e os átomos de oxigênio do tensoativo, um processo que pode ser descrito pela Figura 10. A hidratação de uma unidade de oxietileno é um processo exotérmico. Com o aumento da temperatura uma solução de tensoativo recebe energia suficiente para quebrar estas ligações relativamente fracas causando a separação em duas fases. Quando isto ocorre a solução se torna turva e a temperatura na qual isto acontece é chamada de ponto de turvação (Schick, 1987).

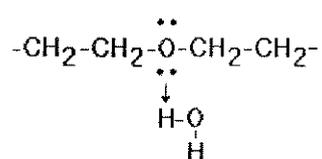


Figura 10. Representação esquemática das pontes de hidrogênio entre moléculas de tensoativo e a água (adaptado de Schick, 1987).

A investigação do mecanismo de desestabilização dos lipossomas em presença de diferentes tensoativos permite a obtenção de informações que podem auxiliar no uso potencial das vesículas de fosfolipídios na administração controlada de medicamentos, uma vez que nestas aplicações, as vesículas entram em contato com tensoativos naturais que podem agir de

forma semelhante aos tensoativos sintéticos. A interação de lipossomas com tensoativos é importante também em estudos que envolvem a reconstituição de membranas protéicas ou preparação de proteolipossomas. A reconstituição é um processo de incorporação de proteínas em uma bicamada lipídica para estudar a sua função nas membranas celulares.

Vários grupos de pesquisadores empregando as técnicas de medidas de turbidez de soluções (Urbaneja et al., 1988; Edwards et al., 1989; Alonso et al., 1987; 1992; Edwards e Almgren, 1990; 1991; 1992; Lash et al., 1990; Goñi e Alonso, 1986), de espalhamento quase-elástico de luz e liberação de agentes fluorescentes encapsulados (Maza et al., 1991; 1992 a, b; 1993, 1994), e de ressonância paramagnética eletrônica (Inoue et al., 1994 a, b) estudaram as interações entre tensoativos e lipossomas.

De uma maneira geral, os perfis de estabilidade de lipossomas sonificados em presença de tensoativos não-iônicos, determinados através de medidas da variação da turbidez das soluções, possuem a forma mostrada na Figura 11. Esse modelo tem sido observado para várias combinações de lipídios e surfatantes (Santana, 1993; Edwards e Almgren, 1990; 1991; 1992; Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 1983; Urbaneja et al., 1988).

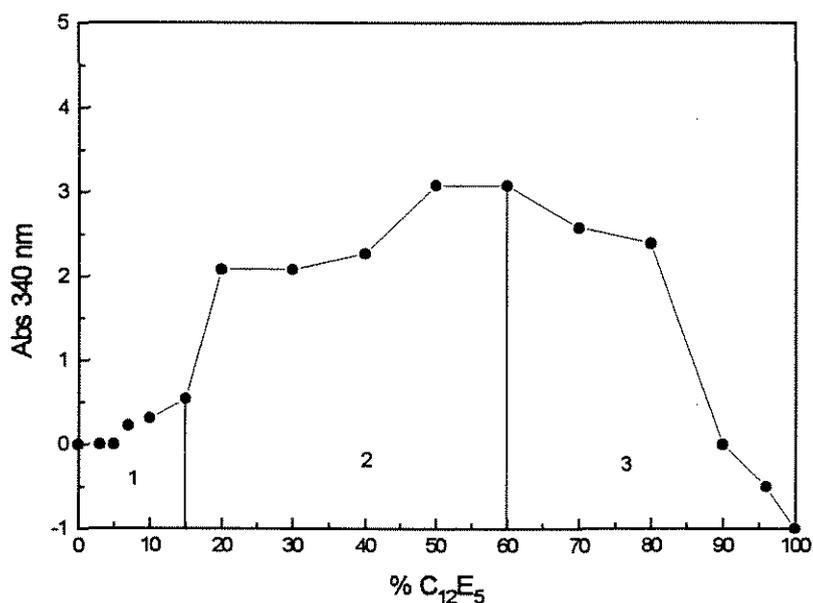


Figura 11 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais (DSPC:DMPE:COL / 33:20:47 mol%, 1mM) sonicados em função da concentração de tensoativo C₁₂E₅ (Santana, 1993).

O efeito da concentração de tensoativo sobre a absorvância das soluções é caracterizado pela presença de 3 regiões distintas. A primeira, na qual o tamanho das vesículas permanece aproximadamente igual ao inicial, é marcada pela pequena variação da absorvância das soluções. A segunda, representativa do início da desestabilização, é caracterizada pelo crescimento, seguido de fusão, e prolonga-se até a completa solubilização das vesículas com a formação de micelas na região 3 (Edwards e Almgren, 1990; 1992; Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 1983).

Urbaneja e colaboradores (1988) observaram que na interação de lipossomas sonicados com o tensoativo Triton X-100, o início do crescimento das vesículas e da liberação do marcador encapsulado (glicose) ocorrem concomitantemente, indicando que as vesículas são abertas no processo de

crecimento e que com o aumento da concentração de tensoativo há o aparecimento de vesículas multilamelares antes da completa solubilização. A estabilidade das vesículas de lecitina mostrou-se fortemente influenciada pelo tamanho do grupo polar do tensoativo (Edwards e Almgren, 1990; 1991; Alonso et al, 1987). Estudos cinéticos sobre as interações de lipossomas constituídos de fosfatidilcolina com Triton X-100 mostraram que a mudança de turbidez das soluções ocorre em duas etapas: a primeira muito rápida, associada com a incorporação do tensoativo na bicamada, e a segunda etapa muito mais lenta, envolvendo a fusão das vesículas (Edwards e Almgren, 1990; Alonso et al., 1987). A etapa de fusão ocorre apenas para concentrações de tensoativo acima da concentração micelar crítica.

Edwards e Almgren (1992) usando a técnica de medida de turbidez de soluções analisaram a estabilidade de vesículas compostas de fosfatidil colina em presença de tensoativos da série C_xE_y . Verificaram que, com o aumento da cabeça polar de E_5 para E_8 na molécula de tensoativo, há um deslocamento do ponto de máxima turbidez para menores porcentagens de tensoativo, bem como um aumento na permeabilidade da bicamada. Este efeito é atribuído ao fato de que para menores grupamentos polares, mais moléculas de surfatante devem ser adicionados antes que as micelas mistas se formem. Para vesículas sonicadas de PC em concentrações 1,2 mM em presença dos tensoativos $C_{12}E_5$, $C_{12}E_6$ e $C_{12}E_8$ à temperatura de 20 °C o maior aumento de turbidez foi observado a 82% de $C_{12}E_5$, em segundo a 70% de $C_{12}E_6$ e a 40% de $C_{12}E_8$. Portanto com o aumento da cabeça polar o ponto de máxima absorvância ocorre a menores porcentagens de tensoativo, mas no entanto menores crescimentos de vesículas são observados.

Apesar das várias caracterizações das interações entre lipossomas e tensoativos em solução, o mecanismo molecular de solubilização das vesículas em tensoativos não-iônicos ainda não pode ser generalizado. Evidências mostram que a geometria, a fração e posição das porções hidrofílica e hidrofóbica na molécula de tensoativos são parâmetros importantes na estabilidade de lipossomas (Lash et al., 1990).

Maza e colaboradores (1991; 1992a; 1992b; 1993; 1994) estudaram as mudanças de permeabilidade de vesículas de fosfolipídios causadas por tensoativos. Os autores definiram um coeficiente de partição, como a razão entre a quantidade de tensoativo presente na bicamada e em solução, e determinaram a permeabilidade da membrana através da liberação de carboxifluoresceína encapsulada nos lipossomas. Foi observada uma boa correlação entre o coeficiente de partição e a habilidade de diferentes tensoativos para modificar a permeabilidade dos lipossomas. Os resultados sugerem que interações hidrofóbicas são as principais forças envolvidas na alteração da permeabilidade das bicamadas lipídicas, embora as forças eletrostáticas tenham um papel importante na modificação desse parâmetro. Para tensoativos não iônicos, as mudanças de permeabilidade mostraram uma forte correlação com o HLB dos tensoativos. Uma região de máxima mudança da permeabilidade foi observada quando o HLB da série octilfenol polietoxilato situou-se próximo à 13,7.

Goñi e Alonso (1986) observaram que a adição de quantidades crescentes de tensoativos tais como Triton X-100, dodecilsulfato de sódio e octilglucosídeo em lipossomas multilamelares de fosfatidil colina provoca uma redução da turbidez das soluções que é geralmente interpretada como um decréscimo no número destas vesículas multilamelares pela ação destes

tensoativos. A situação é completamente diferente quando preparações de lipossomas sonicados são tratados com estes tensoativos. A turbidez da solução aumenta e alcança um máximo (na razão equimolar de surfatante/fosfolipídio para o Triton X-100). Atribui-se este aumento de turbidez na solução de lipossomas à provável agregação de vesículas, fusão ou aumento do tamanho devido à reorganização dos lipídios em estruturas maiores. Após este ponto máximo, há um rápido decréscimo de turbidez, até a solução se tornar opticamente transparente. Neste estudo, para todos os tensoativos e lipídios utilizados, os autores observaram o crescimento das vesículas apenas quando estas eram misturadas com os anfílicos a temperaturas acima da T_c do lipídio puro.

A estabilidade de lipossomas sonicados contendo PEG em presença de tensoativos foi estudada por Santana (1993) e usada como parâmetro de caracterização da integridade da bicamada lipídica de lipossomas encapsulando compostos de boro (Moraes, 1996). Os perfis obtidos por medidas de turbidez das soluções mostram um decréscimo de absorvância à concentrações menores que 25% de $C_{12}E_5$ e que a presença de PEG nas vesículas aumenta a sua estabilidade em relação aos lipossomas convencionais (vide Figura 12). A estabilidade aumenta com o aumento da concentração de PEG na superfície das vesículas como pode ser observado pelo menor crescimento das vesículas com o aumento da porcentagem de PEG.

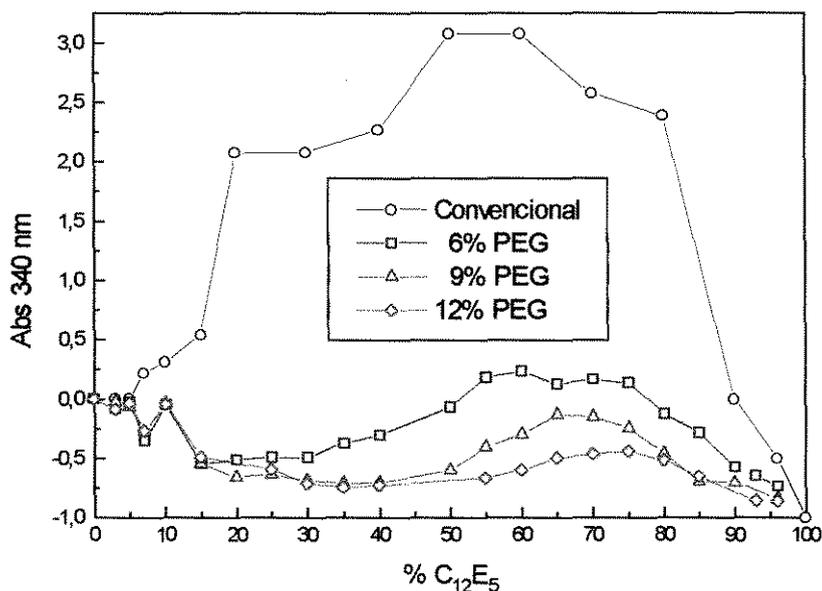


Figura 12. Perfil de estabilidade de lipossomas sonificados convencionais e com PEG₂₀₀₀ em função da porcentagem de C₁₂E₅ (adaptado de Santana, 1993).

Inoue e colaboradores (1994 a,b) utilizaram técnicas de fluorescência e marcador de spin (RPE) para obtenção de informações mais detalhadas dos agregados moleculares formados entre vesículas de fosfatidilcolina e surfatantes não-iônicos do tipo polioxietileno (C_XE_Y). Estes autores demonstraram que para quantidades relativamente baixas do tensoativo C₁₀E₇ componentes da bicamada lipídica foram parcialmente retidos dentro das micelas mistas. O espectro de RPE sugeriu também que os grandes agregados são compostos de fragmentos lamelares resultantes da destruição das vesículas. No ambiente interno dos grandes agregados é mantida a estrutura da bicamada lipídica enquanto que o ambiente interno das micelas mistas é semelhante ao das micelas puras. Propuseram então um mecanismo provável para a transformação induzida pela temperatura entre as micelas mistas e vesículas, o qual baseou-se nas mesmas características observadas nas

misturas aquosas de POE/PC: Os surfatantes adicionados às preparações de lipossomas são intercalados a membrana da vesícula. À altas temperaturas, onde as membranas da vesícula estão em um estado líquido cristalino, as moléculas de surfatante encontram-se misturadas mais aleatoriamente com as moléculas de lipídio, e desta forma a membrana da vesícula pode acomodar uma quantidade relativamente maior de moléculas de surfatante. Quando a concentração de surfatantes excede um nível de saturação, a membrana é quebrada para produzir vários fragmentos lamelares os quais por sua vez formam grandes agregados com distribuição ampla de tamanho.

A quantidade de tensoativo que uma bicamada de fosfolipídio pode acomodar depende do empacotamento das moléculas de fosfolipídios dentro da bicamada, da natureza do tensoativo e das suas interações com o fosfolipídio dentro da bicamada (Lichtenberg et al., 1983).

Uma modelagem matemática da mecânica e estabilidade de lipossomas em presença de surfatantes foi feita por Pamplona e Santana (1996), que efetuaram uma análise da primeira região do perfil de estabilidade das vesículas. A estabilidade foi equacionada e calculada através da análise da função energia potencial total. A Figura 13 mostra o perfil das configurações de equilíbrio, que corresponde aos pontos nas curvas de energia com tangentes horizontais, ou seja, pontos onde a curva de energia tem um máximo, mínimo ou inflexão horizontal.

O mínimo das curvas corresponde a configurações de equilíbrio estável, o máximo corresponde a configurações de equilíbrio instável e os pontos de inflexão correspondem a configurações de equilíbrio neutro. Para pressão osmótica adimensional (p^*) pertencente ao intervalo $0 < p^* < p^1$ o

lipossoma é sempre estável. Dois estados de equilíbrio são possíveis: a posição estável com R^* aproximadamente igual a 1, e a estabilidade neutra a R^* igual a 2, onde R^* é o raio corrente da vesícula (R) dividido pelo raio inicial (R_0). Para $p^1 < p^* < p^2$, há três estados de equilíbrio, dois estáveis e um instável. O sistema tem também que superar a barreira de energia para ser capaz de se deslocar do primeiro para o segundo estado estável. Para sistemas que exibem modificações bruscas de morfologia “snap-through buckling”, é possível determinar uma carga de energia de proteção da bicamada, p^m . Na Figura 13, p^m é muito próximo do ponto p^1 , como é de se esperar pela teoria da morfologia das cascas (Pamplona e Santana 1996).

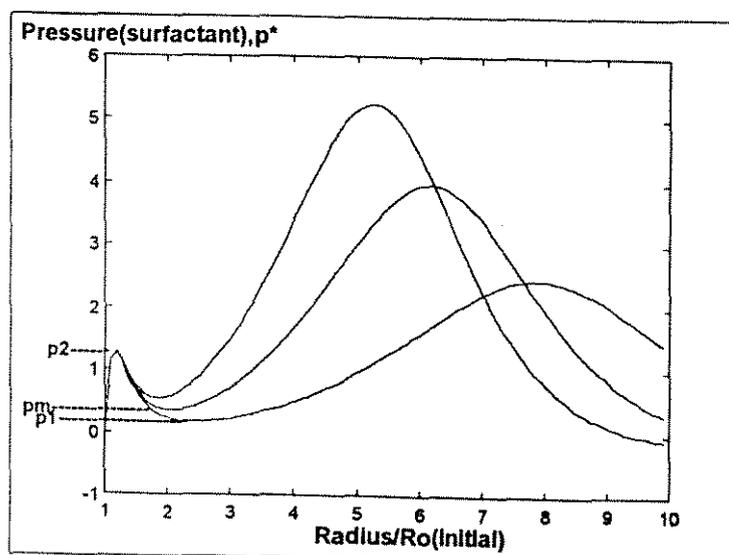


Figura 13. Perfil das configurações de equilíbrio na forma esférica (Pamplona e Santana, 1996).

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

O material usado neste trabalho, incluiu em linhas gerais os reagentes para a derivatização do fosfolipídio DMPE com PEG, outros lipídios, tensoativos e solução tampão. Abaixo encontra-se a especificação desse material, obtido da Sigma, St. Louis MO EUA; Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee WI EUA; Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster AL e Analar - Merse Campinas SP Brasil:

- Dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE), P.M. 635,9 g/mol (Sigma).
- Distearoil fosfatidil colina (DSPC), P.M. 790,2 (Sigma).
- Colesterol (COL) P.M. 402,7 (Sigma).
- Polietilenoglicol metil éter (PEG) P.M. 750, 2000 e 5000 (Aldrich).
- 1,1-Carbonil diimidazol (CD), P.M. 162 (Sigma).
- Trietilamina (TEA), P.M. 101,19 (Analar).
- Dimiristoil fosfatidil etanolamina - Polietilenoglicol 750 (DMPE-PEG₇₅₀), P.M. 1385,9 (Avanti).
- Dimiristoil fosfatidil etanolamina - Polietilenoglicol 2000 (DMPE-PEG₂₀₀₀), P.M. 2635,86 (Avanti).
- Dimiristoil fosfatidil etanolamina - Polietilenoglicol 5000 (DMPE-PEG₅₀₀₀), P.M. 5635,86 (Avanti).
- N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2- ácido etanosulfônico] (C₈H₁₈N₂O₄S, HEPES), P.M. 238,3 (Sigma).
- Ácido 5-doxil esteárico (5-SASL) (Sigma).

Tensoativos da série C_XE_Y ($CH_3(CH_2)_{X-1}(OC_2H_4)_YOH$) (Sigma):

- Polioxietileno 5 Lauril Éter ($C_{12}E_5$), P.M. 406,6.
- Polioxietileno 8 Lauril Éter ($C_{12}E_8$), P.M. 538,8.
- Polioxietileno 8 Miristil Éter ($C_{14}E_8$), P.M. 566,8.
- Polioxietileno 8 Palmitil Éter ($C_{16}E_8$), P.M. 594,9.

3.1 - Síntese do DMPE-PEG

A síntese dos lipídios derivatizados com PEG foi feita a partir da metodologia da patente americana 5.013.556 de 7 de maio de 1991, utilizando a rota química via carbonil diimidazol, CD. Toda a vidraria utilizada foi lavada com detergente isento de fosfato (solução 2% de Extran), para não interferir na quantificação dos fosfolipídios através do grupo fosfato, e usada completamente seca, uma vez que a água desativa o carbonil diimidazol. Inicialmente foi sintetizado o lipídio DMPE-PEG₂₀₀₀, ao qual a patente se refere, e posteriormente por meio de algumas modificações nos parâmetros experimentais da síntese e purificação, foram obtidos o DMPE-PEG₅₀₀₀ e DMPE-PEG₇₅₀.

Todos os reagentes líquidos foram previamente desidratados por contato com partículas de peneira molecular com diâmetro de poro de 3 Å. A desidratação em peneira molecular foi feita com uma concentração de partículas de 0,1 g/ml. Estas peneiras foram previamente ativadas em mufla a 300 °C durante 2 horas e resfriadas em dessecador antes de serem colocadas em contato com os solventes, sendo necessário o contato por no mínimo 12 horas antes do uso.

A Figura 14 apresenta a rota catalítica de preparação do DMPE-PEG usando o carbonil diimidazol como agente de ligação, e trietilamina como catalisador.

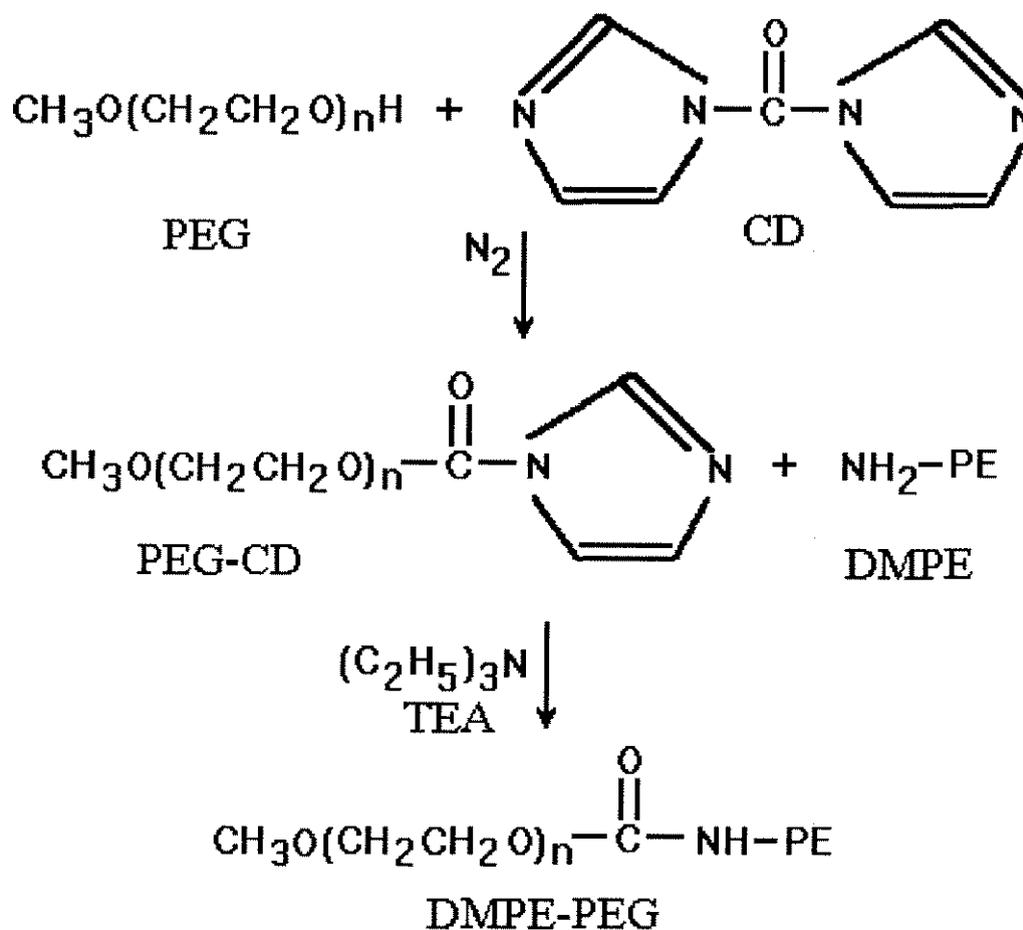


Figura 14. Rota de síntese do DMPE-PEG

Esta preparação é dividida em duas etapas: na primeira, é feito o acoplamento do PEG ao CD obtendo-se o composto intermediário carbonil diimidazol - polietilenoglicol metil éter, PEG-CD. Na segunda etapa, o PEG-CD é acoplado ao DMPE, através da perda de um dos hidrogênios do grupo

amina da molécula de DMPE, formando o composto desejado, dimiristoil fosfatidil etanolamina de polietilenoglicol, designado como DMPE-PEG.

3.1.1 - Primeira Etapa - Formação do Intermediário

Inicialmente o polietilenoglicol (PEG₂₀₀₀) foi pesado em erlenmeyer com tampa esmerilhada em quantidade correspondente a 0,5 mmol, purgando-se em seguida o frasco com nitrogênio para diminuir o contato com o ar atmosférico, visto que o ar desativa o carbonildiimidazole. No caso do PEG₇₅₀, a pesagem foi feita de maneira aproximada, por tratar-se um fluido viscoso e higroscópico cuja pesagem tem que ser feita rapidamente.

Para a reação, dissolveu-se o PEG₂₀₀₀ em benzeno a uma concentração de cerca de 100 $\mu\text{mol/ml}$. Quando necessário, aqueceu-se a 50 °C para uma dissolução mais efetiva, sendo o mesmo procedimento adotado para o PEG₇₅₀. Para o caso de PEG₅₀₀₀ foi necessário um maior volume de benzeno para a solubilização, resultando em uma solução de aproximadamente 80 $\mu\text{mol/ml}$.

O CD foi pesado em frasco com tampa (0,0445g; 0,275 mmol), e previamente purgado com nitrogênio para evitar o contato com o ar atmosférico, pelas razões acima expostas. Em seguida foi adicionado à solução de PEG em benzeno, e o recipiente contendo a mistura foi em seguida purgado com nitrogênio procedendo-se o aquecimento a 50 °C para completa solubilização do CD.

Esta mistura, na proporção molar de 1,1:1 de PEG:CD, foi em seguida transferida para microrreatores de vidro de parede grossa, com um volume útil de aproximadamente 1,5 ml por frasco. Os reatores foram purgados com

nitrogênio e levados a uma placa de aquecimento à 75 °C por 16 horas, dispostos em um suporte metálico para uniformizar a distribuição de calor. Após 12 horas de reação, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, e estocada em refrigerador como solução do intermediário PEG-CD.

3.1.2 - Segunda Etapa - Preparação do DMPE-PEG

Na segunda etapa da reação, transferiu-se a quantidade de intermediário correspondente a 0,5 mmol para um balão de fundo redondo de 50 ml acoplado a um evaporador rotatório, para a remoção do solvente. Em seguida, adicionou-se a quantidade desejada de DMPE, dissolvido previamente em clorofórmio (50 µmol/ml), na proporção molar de 2:1 de intermediário e DMPE, respectivamente. O clorofórmio foi removido sob vácuo em evaporador rotatório, sendo em seguida adicionados 2 ml de benzeno desidratado e trietilamina (TEA) na proporção molar 1:1 de TEA:DMPE. No caso do PEG₅₀₀₀ foi necessário o triplo do volume do benzeno para a solubilização da mistura. A solução resultante foi homogeneizada e transferida para reatores de parede grossa para que fosse efetuada a segunda etapa da reação na placa térmica à 95 °C por 6 horas.

Após o tempo de reação, transferiu-se a mistura reacional para um balão de fundo redondo e removeu-se o solvente sob vácuo, adicionando-se em seguida 10 ml de diclorometano. No caso da síntese do DMPE-PEG₅₀₀₀ foram necessários 40 ml de diclorometano. A solução resultante, contendo o DMPE-PEG juntamente com o PEG e DMPE que não reagiram, foi submetida ao processo de purificação.

3.2 - Purificação do DMPE-PEG

A purificação do DMPE-PEG foi feita por cromatografia em coluna de vidro com dimensões de 51 cm de comprimento e 1,4 cm de diâmetro. A coluna foi empacotada com sílica-gel 60 com tamanho de partícula de 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM); e inicialmente lavada com diclorometano.

Devido às pequenas dimensões das partículas de sílica, procedeu-se o empacotamento adicionando-se lentamente a sílica na coluna preenchida com diclorometano para não haver a formação de bolhas ou caminhos preferenciais na coluna. A coluna foi usada somente doze horas depois, para garantir a boa qualidade do empacotamento.

Para iniciar a purificação, aplicou-se lentamente a solução de DMPE-PEG em diclorometano no topo da coluna, de modo a permitir a formação de uma banda bem definida, e em seguida iniciou-se a passagem das seqüências de solventes listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG₂₀₀₀ (gradiente 1).

Volume (ml)	Volume % de dicloro metano	Volume % de metanol com 2% de ácido acético
100	100 %	0 %
200	95 %	5 %
200	90 %	10 %
200	85 %	15 %
200	60 %	40 %

No caso do DMPE-PEG₅₀₀₀ a purificação do produto foi conseguida modificando-se o gradiente da Tabela 1 no sentido de aumentar a

hidrofilicidade da solução de solventes, pelo aumento da concentração de metanol e ácido acético. Essas modificações deram origem aos gradientes 2 e 3 apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. O gradiente 3 produziu a melhor purificação, obtendo-se uma quantidade de lipídio derivatizado suficiente para a realização dos experimentos subseqüentes.

Tabela 2 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG₅₀₀₀ (gradiente 2).

Volume (ml)	Volume % de dicloro metano	Volume % de metanol com 2% de ácido acético
100	100 %	0 %
200	90 %	10 %
200	88 %	12 %
200	80 %	20 %
200	60 %	40 %

Tabela 3 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG₅₀₀₀ (gradiente 3).

Volume (ml)	Volume % de dicloro metano	Volume % de metanol com 2% de ácido acético
100	90 %	10 %
200	88 %	12 %
200	85 %	15 %
200	80 %	20 %
200	60 %	40 %

Com os conhecimentos adquiridos nas mudanças de gradiente para o DMPE-PEG₅₀₀₀ fez-se uma única modificação no gradiente para o DMPE-PEG₇₅₀, no sentido de obter uma redução mais gradativa da hidrofilicidade da solução, resultando em uma boa separação do produto. Na Tabela 4 é apresentado o gradiente de solventes usado nessa separação.

Tabela 4 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG₇₅₀ (gradiente 4).

Volume (ml)	Volume % de dicloro metano	Volume % de metanol com 2% de ácido acético
100	100 %	0 %
100	97,5 %	2,5%
100	95 %	5 %
100	92,5 %	7,5%
100	90 %	10 %
100	88 %	12 %
100	85 %	15 %
200	60 %	40 %

Durante a passagem dos solventes pela coluna cromatográfica foram coletadas frações eluídas de aproximadamente 50 ml, as quais foram concentradas em evaporador rotatório até um volume de aproximadamente 5 ml. As frações concentradas foram guardadas em frascos com tampa para serem analisadas por cromatografia de camada delgada para a identificação das frações contendo o DMPE-PEG purificado.

As frações contendo o DMPE-PEG purificado foram então misturadas em um balão e levadas ao evaporador rotatório, onde todo o solvente foi removido sob vácuo. Adicionou-se 5 ml de benzeno no balão obtendo-se neste ponto uma solução de DMPE-PEG em benzeno a qual foi posteriormente liofilizada e estocada. No caso do DMPE-PEG₇₅₀, o produto tem um aspecto gelatinoso e é higroscópico por isso foi guardado sob a forma de solução em tampão HEPES, 10 mM pH 7,4 a uma concentração de 5,3 mM.

3.3 - Caracterização do DMPE-PEG

A caracterização do DMPE-PEG foi feita através de cromatografia de camada delgada em fase reversa e através de curvas de tensão superficial, comparando-se com as respectivas análises dos lipídios tomados como padrão, obtidos da Avanti Polar-Lipids Inc. A comparação do DMPE-PEG₇₅₀ sintetizado em laboratório com seu padrão não foi possível, pois este lipídio não se encontra comercialmente disponível.

3.3.1 - Cromatografia de Camada Delgada

A cromatografia de camada delgada faz uso do fato de que o soluto na fase líquida orgânica (fase móvel) tem diferenças de afinidade pela fase sólida hidrofílica (fase estacionária). Diferentes lipídios percorrem diferentes distâncias com a passagem da fase móvel através do gel sólido (New, 1990). Sua identificação é baseada nas diferenças de velocidade com que eles percorrem a placa, que é expressa em termos da altura relativa alcançada pelo lipídio, ou seja, a razão entre a distância percorrida pelo fosfolipídio e a distância percorrida pela fase móvel *R_d*.

As placas de cromatografia de camada delgada “Thin Layer Chromatography” (TLC) em fase reversa, usadas neste trabalho, foram obtidas da Whatman (KC18 sílica gel 60 Å), no tamanho 10 x 10 cm, com 200 µm de espessura da camada.

A eluição dos compostos na placa foi feita em cuba de vidro, com uma solução de 8 ml de etanol e 2 ml de água. A câmara foi inicialmente saturada através do embebedimento de papel de filtro com a referida solução, deixando-a

tampada por 15 minutos. Inicialmente procedeu-se a limpeza da placa, com a eluição somente do solvente até 1 cm do topo da placa. Em seguida a placa foi retirada e deixada em capela com exaustor ligado por 15 minutos para secar.

As amostras foram aplicadas na base da placa, em posições previamente marcadas a lápis, através de micro capilares (0,5; 1; e 2 μ l). A placa foi novamente inserida na câmara para eluição das amostras com os solventes. Terminada a eluição, a placa foi colocada para secar na capela por 15 minutos, sendo depois borrifada com iodo metálico diluído em álcool etílico PA para a revelação das amostras.

3.3.2 - Medida de Tensão Superficial e Determinação da Concentração Micelar Crítica

Para a medida das tensões superficiais, utilizou-se um tensiômetro do tipo Krüss K12 e as determinações foram feitas pelo método de Wilhelmy ou método da placa (Schick, 1987). Amostras de 20 ml de volume foram colocadas em cubeta de vidro de 4,5 cm de diâmetro e 2,3 cm de altura à temperatura ambiente (25 °C). Para garantir o equilíbrio da solução, cada amostra permaneceu por 5 minutos em repouso na cubeta, antes de cada medida. Testes preliminares mostraram que o tempo de repouso de 5 minutos é suficiente para obtenção de resultados reprodutíveis.

As amostras foram preparadas a partir de uma solução-mãe com concentração conhecida, da qual foram feitas diluições sucessivas até que a tensão superficial atingisse o valor de aproximadamente 72 mN/m, que é a tensão superficial da solução tampão. Para cada ponto de diluição o aparelho foi ajustado para fazer 10 medidas sucessivas de tensão superficial,

fornecendo os valores juntamente com a sua média aritmética. A determinação da CMC foi feita através da construção de curvas de tensão superficial média em função do logaritmo da concentração molar do lipídio e foi determinada graficamente pela intersecção das duas retas traçadas nas regiões de baixa e alta concentração de lipídios.

3.4 - Preparação dos Lipossomas

A preparação de lipossomas com diferentes composições foi feita pelo método da hidratação do filme seco de lipídios. A homogeneização do tamanho das vesículas foi feita por extrusão em membranas de policarbonato (Lasic, 1993).

Os lipossomas foram preparados nas composições apresentadas na Tabela 5. A utilização de colesterol e DMPE na composição das vesículas teve por objetivo promover um aumento de estabilidade dos lipossomas.

Tabela 5 - Composição dos lipossomas.

Lipídio	Fração molar lipídica			
	Convencional	3 % molar DMPE-PEG	6 % molar DMPE-PEG	9 % molar DMPE-PEG
DSPC	34	34	34	34
DMPE	20	20	20	20
Colesterol	46	43	40	37
DMPE-PEG	0	3	6	9

Os lipídios foram pesados em balança analítica, na composição desejada de forma a se obter 10 ml de uma solução a 7,5 mM. Em seguida transferiu-se para um balão de fundo redondo de 50 ml, no qual adicionou-se 10 ml de uma solução de clorofórmio/metanol (9:1 v/v) para a solubilização

dos lipídios. A solução foi levada ao evaporador rotatório com apenas a rotação ligada para homogeneizar a mistura por 5 minutos. Nos casos onde se utilizou DMPE-PEG₅₀₀₀, empregou-se 18 ml de uma solução de clorofórmio/metanol (9:9 v/v). A solução foi então submetida à evaporação à vácuo com o balão imerso em banho termostaticado inicialmente à temperatura ambiente por 15 minutos e depois à 65 - 70 °C por mais 15 minutos. Desta forma, todo o solvente foi evaporado, havendo a formação de um filme seco de lipídios sobre as paredes do balão. Na etapa subsequente, o filme foi hidratado com 10 ml de solução tampão Hepes, 10 mM pH 7,4 por 30 minutos imerso em banho a 65 - 70 °C com o balão à uma velocidade de rotação de aproximadamente 120 rpm. A água usada na preparação da solução tampão, foi de qualidade Milli-Q, obtida por ultrapurificação em equipamento Milli-Q plus da Millipore. No caso da preparação de lipossomas contendo DMPE-PEG₇₅₀, este lipídio foi inserido sob a forma de solução estoque após a remoção do solvente orgânico, no momento inicial da hidratação. Como já mencionado anteriormente o DMPE-PEG₇₅₀ após a síntese foi armazenado sob a forma de solução estoque 5,3 mM dissolvido em solução tampão Hepes, 10 mM pH 7,4 pois diferentemente dos outros lipídios derivatizados neste trabalho o DMPE-PEG₇₅₀ não teve o aspecto de um pó branco finamente dividido e sim um aspecto gelatinoso com propriedades higroscópicas.

Por este processo foram obtidas vesículas multilamelares de vários diâmetros, sendo necessário um tratamento posterior para torná-las unilamelares e com distribuição de tamanhos mais homogênea. As vesículas foram deixadas em repouso por 30 minutos para atingirem o equilíbrio sendo em seguida submetidas à extrusão em membranas de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro.

A extrusão foi feita em extrusor de aço inox de 10 ml de volume, com camisa térmica para circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc. Foram utilizados um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato. O extrusor foi conectado a um redutor/regulador de pressão e a um cilindro de nitrogênio, para se trabalhar a pressões constantes. Após um estudo inicial com duas pressões diferentes (10 e 20 Kgf/cm²), optou-se por trabalhar a uma pressão de 10 Kgf/cm² por produzir lipossomas estáveis e de tamanho satisfatório. Foram extrudadas apenas amostras com volume de 5 ml com 15 passagens pela membrana, à temperatura de 75 °C, sendo que para cada nova passagem a amostra permanecia em repouso no extrusor por no mínimo 3,5 minutos para que atingisse o equilíbrio térmico. O controle da pressão de extrusão foi de fundamental importância para a reprodutibilidade dos resultados. A Figura 15 mostra a representação esquemática da célula de extrusão T.001 da Lipex Biomembranes Inc.

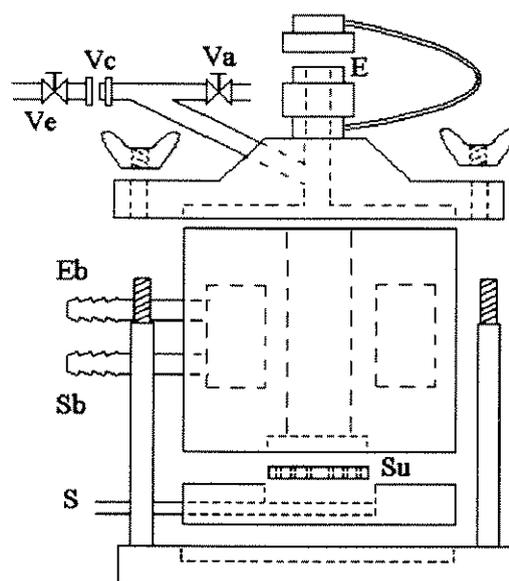


Figura 15 - Esquema da extrusora destacando: entrada (E) e saída (S) da amostra; válvulas de entrada de N₂ (Ve), de conexão (Vc) e de alívio (Va); entrada (Eb) e saída (Sb) do banho termostatizado e suporte da membrana (Su).

3.5 - Caracterização das Vesículas

3.5.1 - Determinação do Teor Total de Fosfato

Após a preparação dos lipossomas, a quantidade de fosfolipídios nas vesículas foi quantificada através do teor total de fosfato (PO_4^{3-}) nas amostras. A maioria dos fosfolipídios utilizados na preparação de lipossomas possui apenas um átomo de fósforo por molécula, possibilitando a determinação do teor de fosfolipídios pela quantidade de fosfato. O ensaio baseia-se no método de Chen et al. (1956) e consiste na oxidação com ácido sulfúrico (H_2SO_4) dos compostos de carbono (a porção lipídica do fosfolipídio) a carbono elementar, que é transformado em dióxido de carbono (CO_2) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) livre de fosfato. O fósforo é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com o molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra. O mesmo procedimento é feito para soluções padrão com concentração conhecida de fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 2,68; 1,07; 0,54; 0,27 mM), de lipídio (DSPC a 1,95; 0,78; 0,39 mM) e para solução isenta de fosfato (branco). Em seguida plota-se os valores de absorbância versus concentração e esta curva é usada para a quantificação do fosfato nas amostras. A solução mãe de fosfolipídio padrão foi previamente sonicada por 30 minutos para que o lipídio estivesse completamente solubilizado.

O experimento foi conduzido da seguinte forma: inicialmente toda a vidraria foi lavada com detergente livre de fosfato. Pipetou-se 100 μl de solução em cada tubo de ensaio (amostras, padrões e branco) juntamente com 500 μl de solução de ácido sulfúrico 10 N. Adicionou-se duas esferas de vidro

nos tubos de ensaio para melhorar a distribuição de calor durante aquecimento. Os tubos foram colocados em suporte metálico e aquecidos em placa térmica à 200 °C por 30 minutos. Retirou-se os tubos do aquecimento e após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165 µl de peróxido de hidrogênio isento de fosfato, em cada um dos tubos, para serem aquecidos novamente à 200 °C por mais 30 minutos. A placa de aquecimento foi posicionada no interior de uma capela pois nesta etapa há a formação de dióxido de carbono que deve ser retirado pelo exaustor. Após o aquecimento os tubos foram retirados e após atingirem a temperatura ambiente adicionou-se 4 ml de tampão Hepes 10 mM, pH 7,4, 500 µl de uma solução de molibdato ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O) e 500 µl de uma solução 8% de ácido ascórbico (C₈H₈O₆). Os tubos foram aquecidos em água fervente por 7 minutos, promovendo o aparecimento da cor azul, em seguida foram resfriados, e a intensidade da cor medida espectrofotometricamente à 830 nm.

3.5.2 - Determinação do Raio Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho das Vesículas

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos das vesículas foram determinados por espalhamento quase elástico de luz “quasi-elastic light scattering” em equipamento de detecção de espectro Malven Autosizer modelo 4700. Esta técnica baseia-se na dependência das flutuações de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo, devido ao movimento Browniano das partículas em solução/suspensão. Partículas menores difundem mais rápido do que partículas grandes, a taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão (New, 1990). O coeficiente de difusão médio translacional dos lipossomas em solução diluída pode ser medido. Para partículas em movimento Browniano, o

raio hidrodinâmico médio, R_h , pode ser calculado pela equação de Stokes-Einstein (Pecora, 1964).

$$R_h = \frac{(kT)}{6Du} \quad (6)$$

onde k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, D o coeficiente de difusão das partículas e u a viscosidade do solvente.

3.6 - Ensaio de Estabilidade de Lipossomas

A estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativos não-iônicos foi monitorada através de medidas de turbidez total das soluções, expressando os dados em termos de absorvância. As vesículas de lipídio sujeitas a interação com os tensoativos em diferentes concentrações sofrem modificações conformacionais, que provocam variações na turbidez da solução (Steffen, 1993). Esta variação na turbidez é o reflexo de mudanças nas formas e tamanhos das vesículas devido ao crescimento, fusão e formação de micelas mistas pela ação do tensoativo. Neste trabalho, a ação dos tensoativos sobre as vesículas foi estudada em função da concentração e do seu HLB. Na Tabela 6 são apresentados os tensoativos da série C_xE_y utilizados neste trabalho, com seus característicos pontos de turvação. O ponto de turvação deve estar acima da temperatura na qual o ensaio de estabilidade é conduzido, pois à temperaturas maiores que o ponto de turvação o tensoativo tem solubilidade limitada.

Tabela 6 - Tensoativos da série C_xE_y e suas propriedades

Tensoativos	H L B	C M C* (mM)	Ponto de Turvação* (°C)
C ₁₂ E ₅	11,67	0,058	30,7
C ₁₂ E ₈	13,71	0,083	76,5
C ₁₄ E ₈	13,04	0,0076	71,2
C ₁₆ E ₈	12,42	0,00051	66,2

* Dados de Hinze e Pramauro (1993).

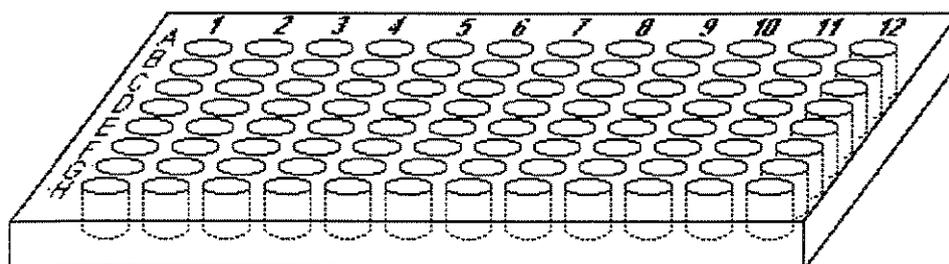
As medidas de turbidez total das soluções foram feitas em placas de microtitulação de poliestireno (Corning Incorporation), com 96 poços (200 µl) de fundo redondo (Figura 16) a 405 nm usando leitora de placas do tipo Elisa “Microtiter plate reader”, modelo EL312e, da Bio-Tek Instruments Inc. A aquisição dos dados foi feita à temperatura ambiente em estado de pseudo-equilíbrio, 2 horas após o início da ação do tensoativo sobre as vesículas, com agitação branda de três segundos para homogeneização antes da leitura. A cada um dos poços da placa, foram adicionados 120 µl de soluções estoque de tensoativo de diferentes concentrações dissolvidos em tampão Hepes 10 mM, pH 7,4 com 80 µl de lipossomas a 2,5 mM, de forma que após a mistura a concentração final de lipídio foi de 1 mM em 200 µl para todas as porcentagens. As soluções estoque de tensoativo foram preparadas de forma que após a mistura fossem obtidas as porcentagens de tensoativos, na faixa de 3 a 96%. A porcentagem de tensoativo nas soluções foi definida como sendo a razão entre o número de moles de tensoativo e o número de moles total da solução, conforme a Equação 7:

$$\%Tens\text{oativo} = \frac{\text{molesTens\text{oativo}}}{\text{molesTens\text{oativo}} + \text{molesLip\text{idio}}} \times 100 \quad (7)$$

As amostras foram preparadas em triplicata e distribuídas na placa conforme indica a Figura 16. Os valores médios de absorbâncias foram

subtraídos das soluções de mesma concentração de tensoativo, isenta de lipossomas (brancos). Os brancos (br) foram constituídos por 120 µl de tensoativo na concentração desejada e 80 µl de solução tampão em substituição aos 80 µl de solução de lipossomas.

Para melhor comparação entre os diferentes perfis de estabilidade graficou-se a absorbância em equilíbrio normalizada em função da porcentagem de tensoativo. A absorbância normalizada é definida como $(A_x - A_0)/A_0$, onde A_x é a média da absorbância em qualquer porcentagem subtraído o efeito do branco (absorbância em $x\%$ médio - br_x) e A_0 é a média da absorbância em 0% subtraído o efeito do branco (absorbância em 0% médio - br_0).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	br0	0 %	0 %	0 %	br3	3 %	3 %	3 %	br5	5 %	5 %	5 %
B	br7	7 %	7 %	7 %	br10	10%	10%	10%	br15	15%	15%	15%
C	br20	20%	20%	20%	br25	25%	25%	25%	br30	30%	30%	30%
D	br35	35%	35%	35%	br40	40%	40%	40%	br45	45%	45%	45%
E	br50	50%	50%	50%	br55	55%	55%	55%	br60	60%	60%	60%
F	br65	65%	65%	65%	br70	70%	70%	70%	br75	75%	75%	75%
G	br80	80%	80%	80%	br85	85%	85%	85%	br90	90%	90%	90%
H	br93	93%	93%	93%	br96	96%	96%	96%	-	-	-	-

Figura 16 - Representação esquemática e disposição das amostras em placa do tipo ELISA.

3.7 - Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Vesículas contendo o marcador de spin 5-SASL em uma fração molar de 1% com relação aos lipídios totais (incluindo o colesterol) foram utilizadas neste teste. Estas vesículas foram preparadas pela adição do marcador durante a homogeneização dos lipídios em solução de clorofórmio metanol, para formação do filme seco e posterior hidratação e extrusão, conforme metodologia descrita no item 3.4. Os espectros de RPE das vesículas foram obtidos em espectrofotômetro Bruker ER-200D-SRC, pertencente ao laboratório da Dra. Shirley Schreier IQ/USP à temperatura ambiente (25 °C) em célula plana de quartzo da James Scanlon, Costa Mesa, CA. As medidas foram feitas após duas horas de contato das vesículas marcadas com o tensoativo C₁₂E₅. O parâmetro de ordem (S) das misturas foi determinado a partir das medidas dos valores de *A* paralelo (*A*//) e *A* perpendicular (*A*⊥) do espectro do marcador 5-SASL na membrana (Figura 8) sob ação do tensoativo e calculado pela Equação 4.

Para os casos em que o espectro de membranas obtido sofreu uma interferência significativa do sinal do marcador em água, foi possível suprimir esse efeito através da subtração dos espectros tal como apresentado na Figura 17.

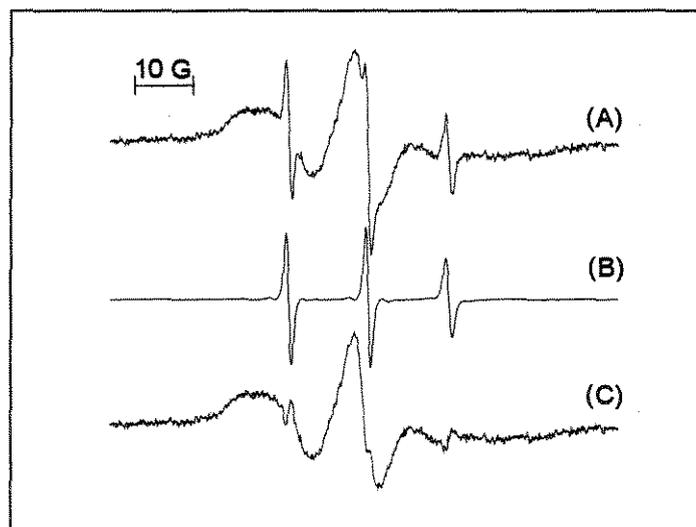


Figura 17. Espectro original do marcador em membrana (A), espectro do marcador em água (B) e espectro resultante da subtração do espectro original do espectro do marcador em água (C).

4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese, Purificação e Caracterização do DMPE-PEG

Os fosfolipídios derivatizados DMPE-PEG, utilizando PEG com pesos moleculares 750, 2000 e 5000 Da., e obtidos segundo metodologia descrita no item 3.1 foram identificados por cromatografia de camada delgada (TLC), e quantificados em termos de rendimento do processo de reação e purificação.

Os resultados obtidos em placas de cromatografia de camada delgada em fase reversa são apresentados nas Figuras 18, 19 e 20, obtidas com os melhores gradientes de solventes usados na purificação. As Figuras mostram tanto os lipídios derivatizados (DMPE-PEG) quanto o PEG remanescente que não reagiu. Tomou-se como referência os resultados obtidos com a mesma técnica usando o fosfolipídio padrão de peso molecular correspondente, obtido da Avanti Polar Lipids bem como o PEG na forma livre utilizado na síntese. A referência para o DMPE-PEG₇₅₀ não é apresentada, uma vez que esse composto não é comercialmente disponível.

As análises por cromatografia de camada delgada permitiram, então, a identificação das frações ricas em DMPE-PEG adequadamente purificadas na coluna de sílica. A partir dos resultados obtidos nas placas de cromatografia, as diferenças de altura relativas alcançadas pelas substâncias presentes nas frações permitiram a identificação das frações que continham o produto sintetizado. Fez-se a comparação dos fosfolipídios obtidos pela determinação da altura relativa média de eluição (*R_d*) dos fosfolipídios derivatizados e dos fosfolipídios padrões. Estes valores são apresentados na Tabela 7.

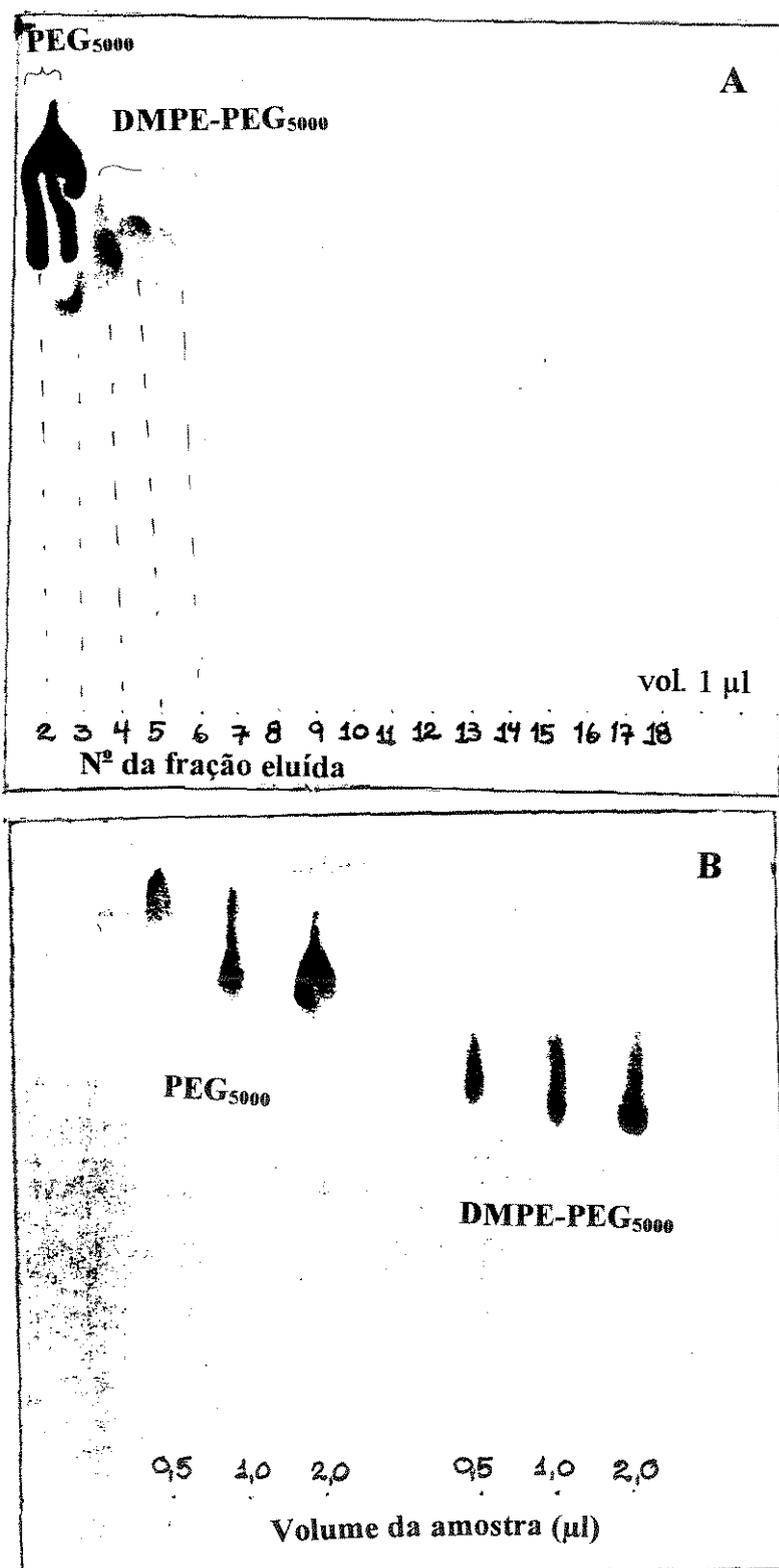


Figura 18 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₅₀₀₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 3 (A) e de referência (B).

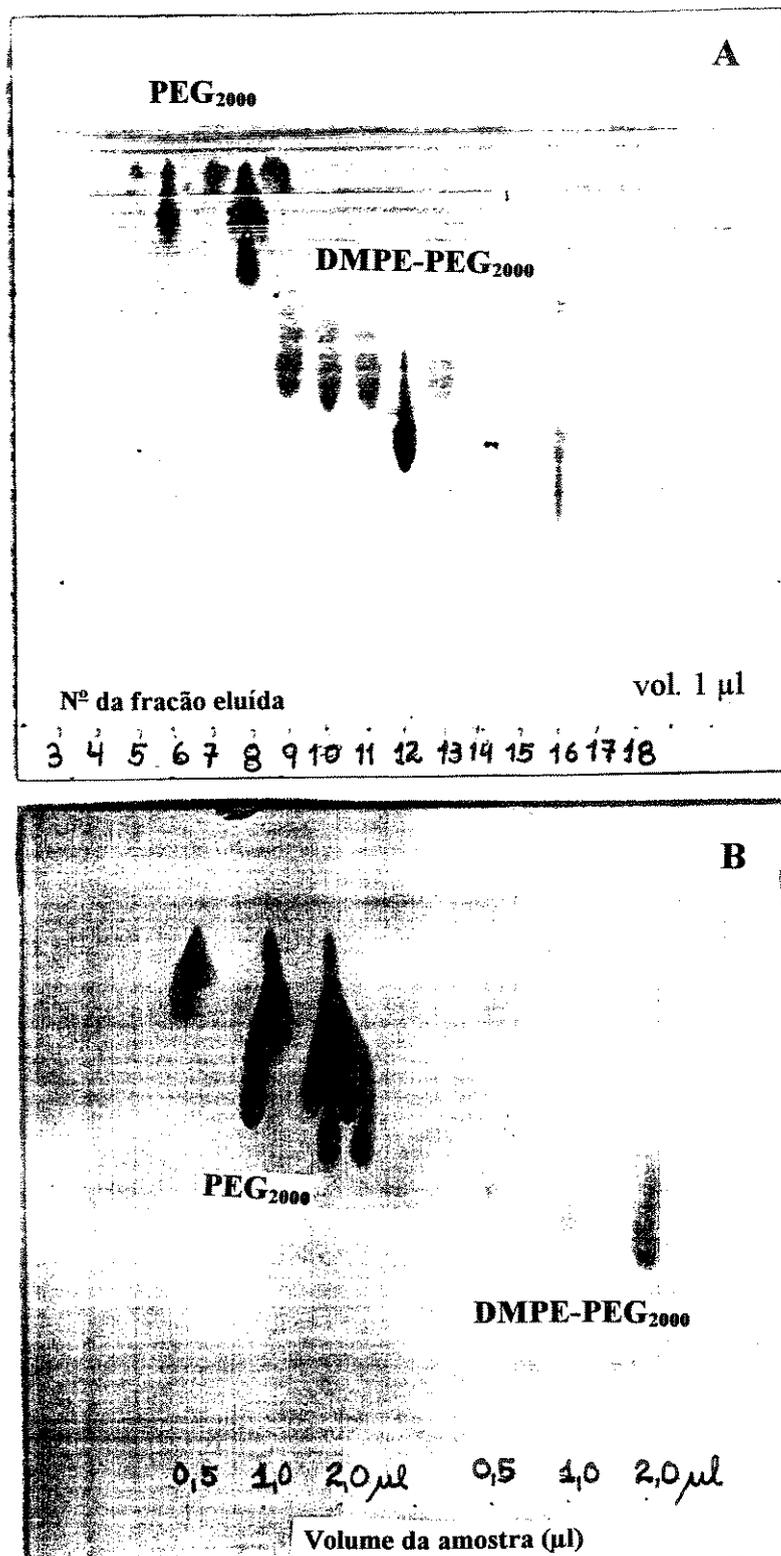


Figura 19 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₂₀₀₀ e DMPE-PEG₂₀₀₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 1 (A) e de referência (B).

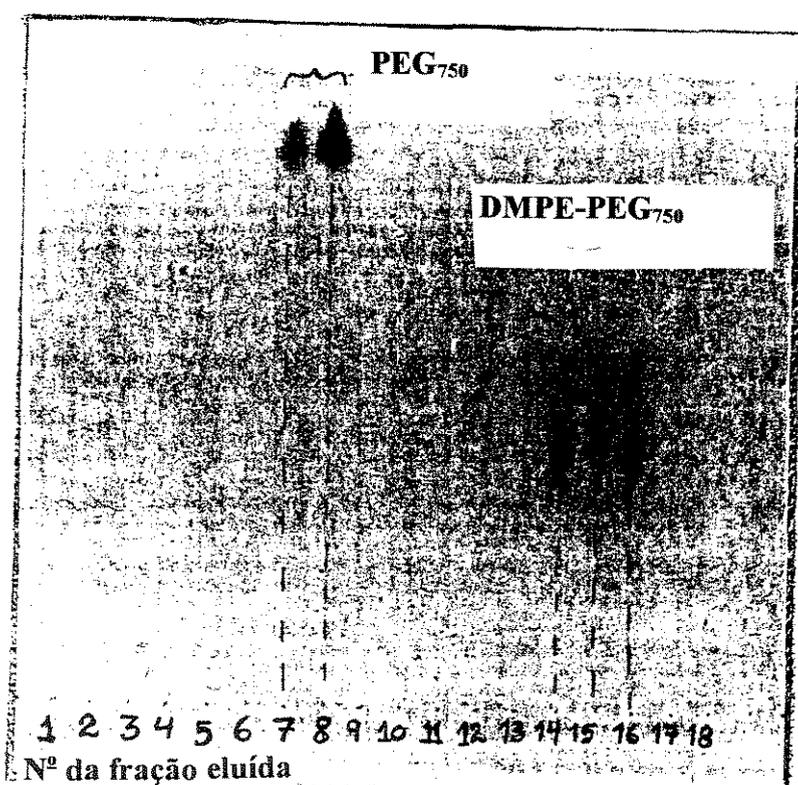


Figura 20 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₇₅₀ DMPE-PEG₇₅₀ sintetizado e purificado neste trabalho utilizando gradiente 4.

Os resultados obtidos mostram que uma boa purificação dos fosfolipídios derivatizados com PEG pode ser obtida usando coluna de sílica e gradientes de solventes compostos de diclorometano, etanol e ácido acético. A variação das concentrações de ácido acético e de etanol na composição do gradiente de solventes, no sentido de aumentar ou reduzir a hidrofiliicidade em função do tamanho da cadeia de polietilenoglicol (tomando-se como base o gradiente usado na patente referida no item 3.1 para o PEG₂₀₀₀) foi de fundamental importância para a purificação do DMPE-PEG₇₅₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀.

Tabela 7 - Alturas relativas médias de eluição em placas de cromatografia de camada delgada em fase reversa do DMPE-PEG.

Fosfolipídio Derivatizado	Altura Relativa de Eluição (<i>R_d</i>)	
	Sintetizado	Padrão
DMPE-PEG ₅₀₀₀	0,79	0,75
DMPE-PEG ₂₀₀₀	0,69	0,59
DMPE-PEG ₇₅₀	0,52	---

Podemos observar na Tabela 7 que as alturas relativas médias alcançadas pelos fosfolipídios derivatizados e seus respectivos padrões têm valores relativamente próximos, o que indica que estes fosfolipídios sintetizados têm características relativamente semelhantes aos fosfolipídios adquiridos da Avanti. Estes resultados comprovam o sucesso na reprodução dos resultados de síntese e purificação do DMPE-PEG₂₀₀₀ da patente americana, bem como, o sucesso nas modificações dos parâmetros para derivatização e purificação de DMPE com PEG de diferentes pesos moleculares. Na cromatografia de camada delgada em fase reversa, as substâncias mais hidrofílicas são arrastadas mais facilmente pela fase móvel (maiores valores de *R_d*), enquanto que as mais hidrofóbicas ficam retidas mais fortemente na fase estacionária. As amostras de PEG na forma livre com

pesos moleculares de 750, 2000 e 5000 Da, devido à elevada hidrofiliçidade, foram arrastadas por toda a distância percorrida pela fase móvel ($R_d = 1$), não sendo possível quantificar diferenças de hidrofiliçidade destas moléculas nestas condições do experimento. No entanto podemos verificar que com o aumento do tamanho das cadeias de PEG nos lipídios derivatizados, há um aumento da hidrofiliçidade da molécula de DMPE-PEG, pois quanto maior a cadeia de PEG, maior é o valor da altura relativa (R_d) alcançada pelo fosfolipídio derivatizado.

A Tabela 8 mostra os resultados quantitativos da síntese dos lipídios derivatizados com PEG. Comparando-se o rendimento experimental do PEG₂₀₀₀ obtido neste trabalho com aquele obtido na patente, observa-se que os resultados da patente foram por nós reproduzidos, e a diferença deve-se provavelmente à combinação de um maior número de frações após a etapa de purificação. Para o DMPE-PEG₇₅₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀, não foram encontrados dados na literatura para a comparação dos rendimentos. Obteve-se um rendimento baixo para o DMPE-PEG₅₀₀₀, provavelmente devido ao elevado peso molecular do DMPE-PEG₅₀₀₀, uma vez que foram mantidas as proporções molares da patente. Isto resultou em modificações no meio reacional tais como aumento de viscosidade, diminuição da solubilidade em benzeno, aumento do volume reacional, modificações na pressão interna dos microrreatores de parede grossa durante as etapas de aquecimento. No entanto o fator mais importante nesta diminuição do rendimento foi provavelmente a purificação que teve que ser conduzida utilizando alíquotas mais diluídas devido a dificuldades de solubilização do produto em diclorometano. A Figura 21 mostra os resultados obtidos com os outros gradientes de concentração dos solventes testados para o DMPE-PEG₅₀₀₀:

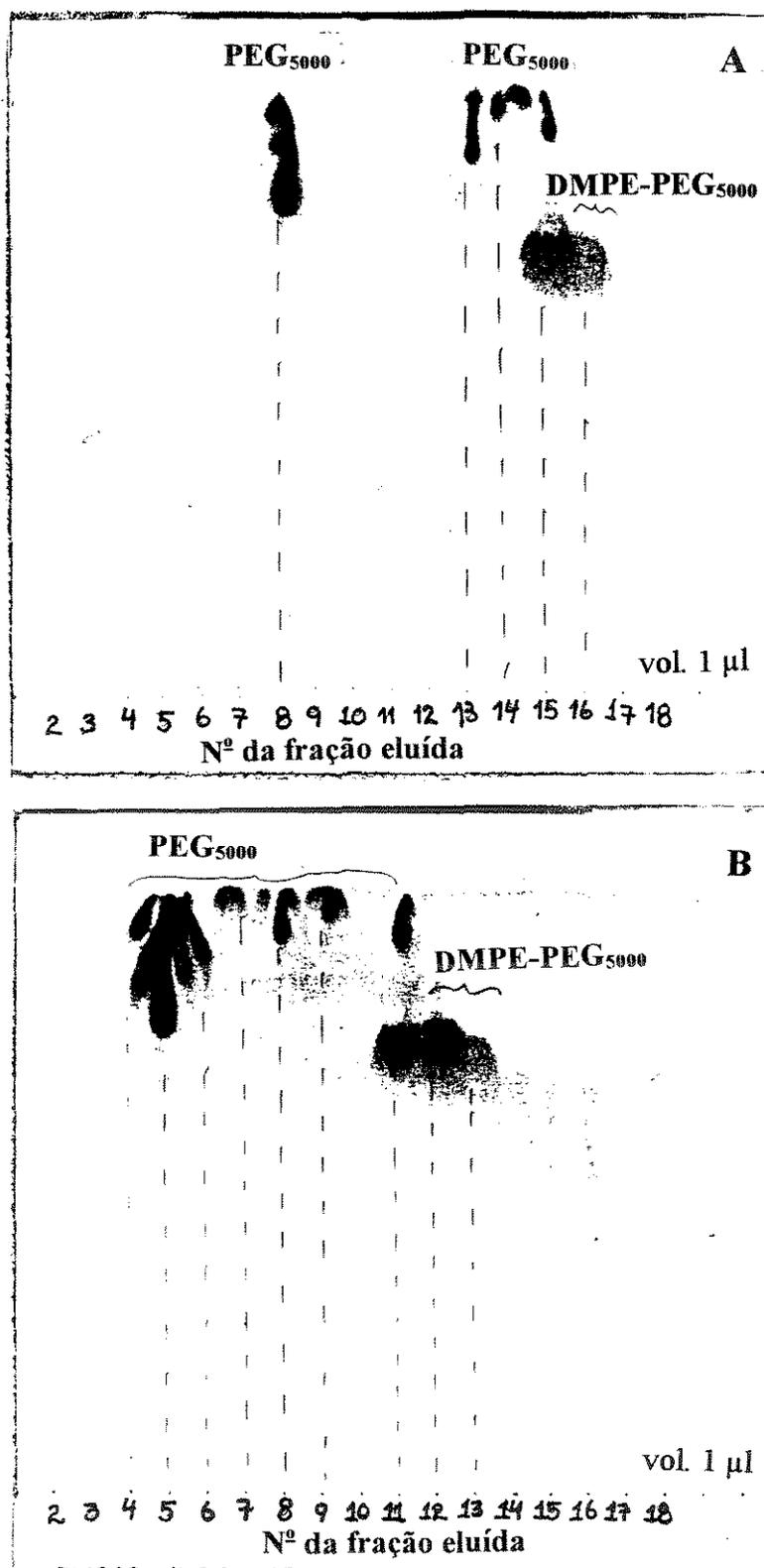


Figura 21 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG₅₀₀₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀ sintetizado neste trabalho purificado com gradiente 1 (A) e gradiente 2 (B).

Tabela 8 - Resultados quantitativos das derivatizações do DMPE com PEG de pesos moleculares 750, 2000 e 5000.

Fosfolípido Derivatizado	Massa Final (g)	Rendimento da patente (%)	Rendimento experimental (%)
DMPE-PEG ₇₅₀	0,1905	---	55,0 %
DMPE-PEG ₂₀₀₀	0,5886	52,6 %	63,4 %
DMPE-PEG ₅₀₀₀	0,2460	---	23,2 %

Os resultados obtidos na caracterização dos fosfolípidios derivatizados através da curva de variação da tensão superficial versus concentração da solução, com a determinação das concentrações micelares críticas (CMC) correspondentes, são apresentados nas Figuras 22, 23 e 24, tanto para os lípidios padrões DMPE-PEG₂₀₀₀ e DMPE-PEG₅₀₀₀, como para as amostras obtidas neste trabalho.

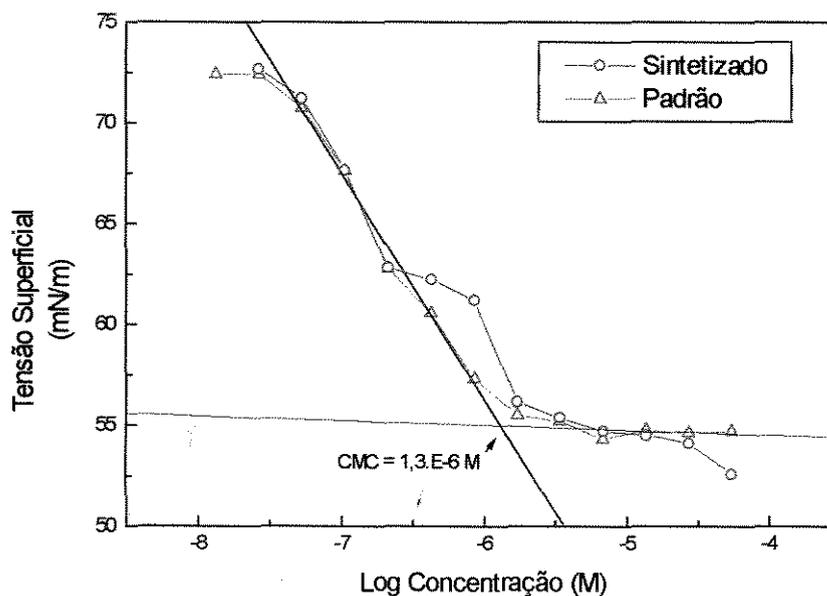


Figura 22 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE-PEG₅₀₀₀.

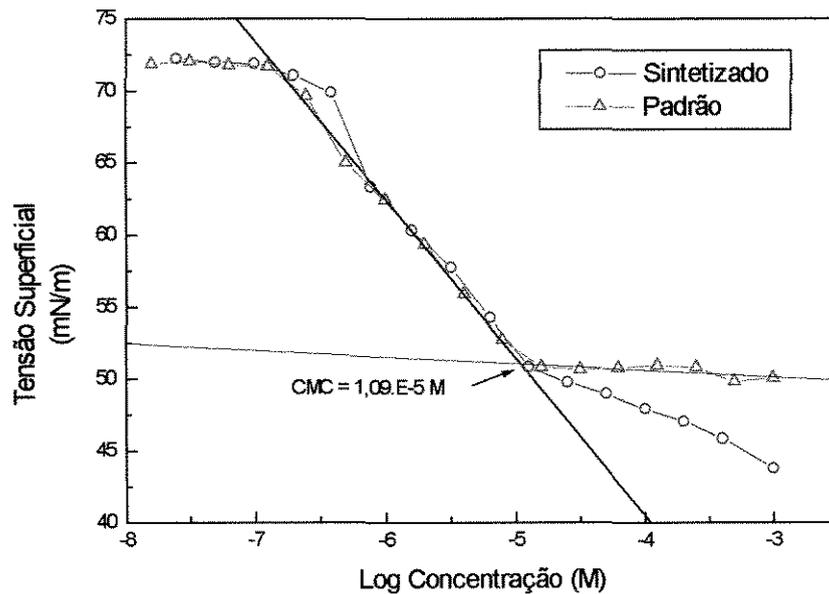


Figura 23 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE-PEG₂₀₀₀.

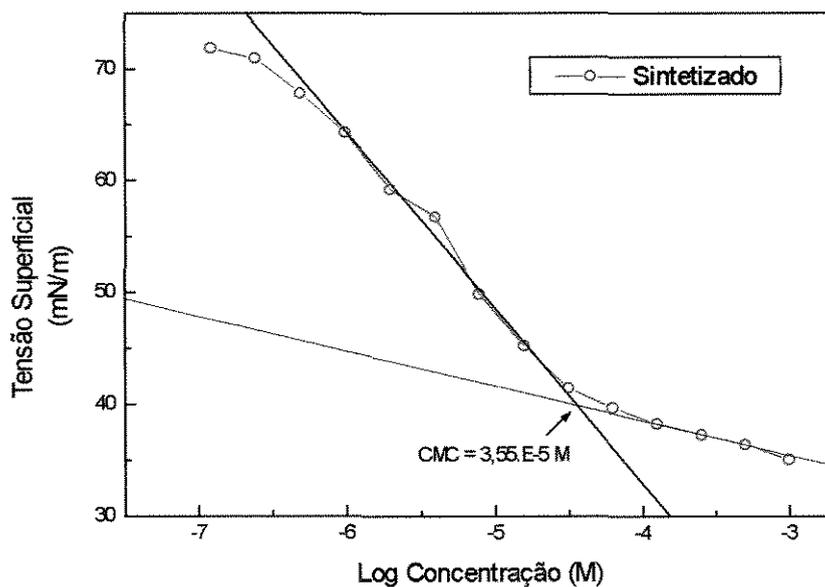


Figura 24 - Curvas de determinação de CMC pela medida da tensão superficial para o DMPE-PEG₇₅₀.

Comparando-se as curvas de tensão superficial versus concentração obtidas verifica-se uma boa concordância entre as curvas feitas com DMPE-PEG sintetizados e aqueles tomados como referência, pois em ampla faixa de concentrações as tensões superficiais obtidas tiveram valores próximos, o que é muito significativo levando-se em consideração a precisão nas medidas obtidas por este método. Somente nas regiões de alta concentração é que as medidas de tensão superficial diferem significativamente daquelas obtidas com a solução do padrão. Sabe-se que a presença de impurezas com atividade de superfície pode ter um pronunciado efeito nas propriedades das soluções, tais como concentração micelar crítica e tensão superficial (Rosen, 1981). Atribui-se portanto o ligeiro decaimento observado nos valores de tensão superficial a altas concentrações de lipídios à prováveis impurezas remanescentes, que não foram totalmente eliminadas no processo de purificação, embora a cromatografia em camada delgada não as tenha evidenciado. Outra razão pode ser a dispersão do peso molecular do PEG utilizado na síntese, a qual pode ter influenciado o peso molecular do produto final obtido, produzindo DMPE-PEG's com diferentes pesos moleculares. A tensão superficial do DMPE-PEG em altas concentrações depende do tamanho da cadeia de PEG ligada ao lipídio, e portanto a dispersão de tamanhos do DMPE-PEG sintetizado pode ter refletido nos resultados de tensão superficial. Verificou-se que a passagem dos lipídios derivatizados na coluna de sílica-gel por uma segunda vez não altera os resultados obtidos na curva de tensão superficial.

A repetição das medidas mostrou que os resultados são reprodutíveis. Como nas placas de TLC é obtida uma boa concordância com os compostos de referência, o mesmo sendo observado para as curvas de tensão superficial, admitiu-se que estas prováveis impurezas deveriam estar em níveis muito

baixos de modo que não interfeririam nos experimentos de estabilidade em presença de tensoativos. No entanto, seria apropriado, em trabalhos futuros, a avaliação dos tipos e níveis destas prováveis impurezas.

A Tabela 9 resume os valores da CMC obtidos para os lipídios derivatizados com PEG e a tensão superficial nestes pontos. Verifica-se que com o aumento da cadeia de PEG e conseqüentemente o aumento da hidrofiliçidade da molécula há uma diminuição na CMC e um aumento no valor da tensão superficial na CMC. Esta redução na CMC deve-se provavelmente ao fato de que a área superficial ocupada pela molécula na interface líquido ar cresce com o aumento da cadeia de PEG, fazendo com que um número menor de moléculas cubram a mesma área interfacial, e portanto formem agregados em concentrações menores. Os valores de tensão superficial obtidos na CMC reforçam essa hipótese.

Tabela 9 - CMC dos fosfolipídios derivatizados com PEG

Lipídio Derivatizado	CMC (M)	Tensão Superficial da Solução na CMC (mN/m)
DMPE-PEG ₇₅₀	$3,55 \times 10^{-5}$	40
DMPE-PEG ₂₀₀₀	$1,09 \times 10^{-5}$	50
DMPE-PEG ₅₀₀₀	$0,13 \times 10^{-5}$	55

4.2 - Preparação e Caracterização dos Lipossomas

4.2.1 - Determinação do Teor Total de Fosfolipídios

A determinação do teor total de fosfolipídios nos lipossomas foi feita para todas as vesículas preparadas neste trabalho. Os lipossomas preparados pelo método da hidratação do filme seco de lipídios seguidos de extrusão apresentaram bons rendimentos, quantificados pela dosagem do teor de

fósforo presente nos lipossomas. As perdas do processo de preparação foram, no máximo de 10 %, tanto para os lipossomas convencionais como com PEG.

No gráfico da Figura 25 é apresentada uma curva de calibração típica obtida através do ensaio fosfato descrito no item 3.5.1. Para que bons resultados sejam obtidos (coeficiente de correlação da reta próximo a 1), é necessário que a cada ensaio seja construída uma nova curva de calibração.

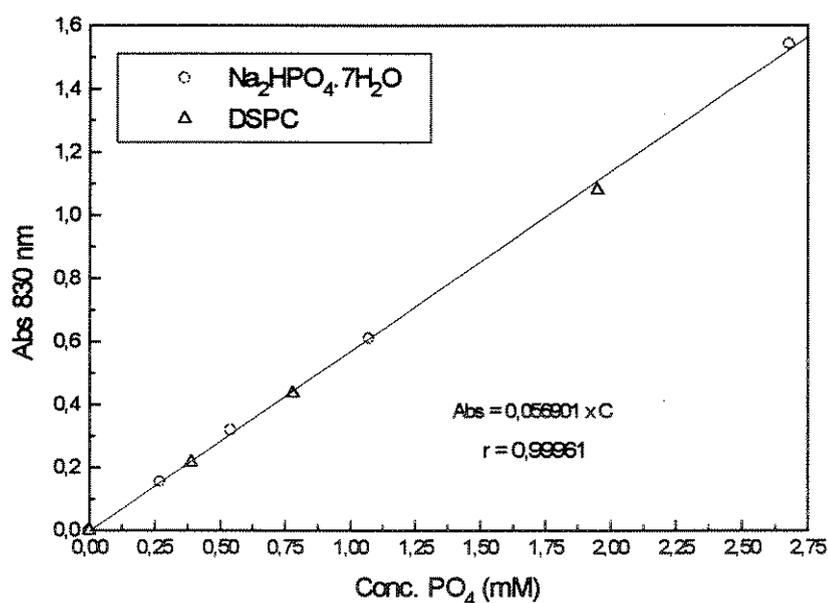


Figura 25 - Curva de calibração típica do ensaio fosfato.

4.2.2 - Determinação da Pressão de Extrusão

Com o objetivo de se escolher a pressão de extrusão as vesículas fez-se um estudo inicial para lipossomas convencionais extrudados com 15 passagens pela membrana de policarbonato com diâmetro de poro de 100 nm à 10 e 20 Kgf/cm² onde foram avaliadas a distribuição de tamanhos por

espalhamento quase elástico de luz e a estabilidade em presença do tensoativo C₁₂E₅, por medidas de turbidez total das soluções.

Nas Figuras 26 e 27 são apresentados o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das vesículas convencionais extrudadas a 10 e 20 Kgf/cm². Pode-se observar que não há uma diferença significativa entre os valores obtidos na análise do tamanho das vesículas. Para as vesículas extrudadas a 10 Kgf/cm² foi obtido um diâmetro médio de 116,4 nm com polidispersividade de 0,075 enquanto que para as vesículas extrudadas a 20 Kgf/cm² foi obtido um diâmetro médio de 109,3 nm e polidispersividade de 0,090. Os diâmetros médios foram próximos, diferiram em apenas 7,1 nm, e as distribuições de tamanho foram similares. A polidispersividade maior para as vesículas extrudadas a 20 Kgf/cm² expressa uma distribuição de tamanho mais ampla em comparação com as vesículas extrudadas a 10 Kgf/cm². Os diâmetros médios das duas populações de lipossomas, são próximos ao diâmetro de poro da membrana (100 nm) o que indica que a extrusão com 15 passagens à pressão de 10 Kgf/cm² já seria suficiente para a obtenção de vesículas unilamelares de tamanho uniforme.

Os resultados de estabilidade em presença de tensoativos, obtidos preliminarmente com lipossomas convencionais extrudados às pressões de 10 e 20 Kgf/cm² e 15 passagens na membrana, conforme metodologia do item 3.4, é apresentado na Figura 28.

MALVERN ANALYSIS REPORT

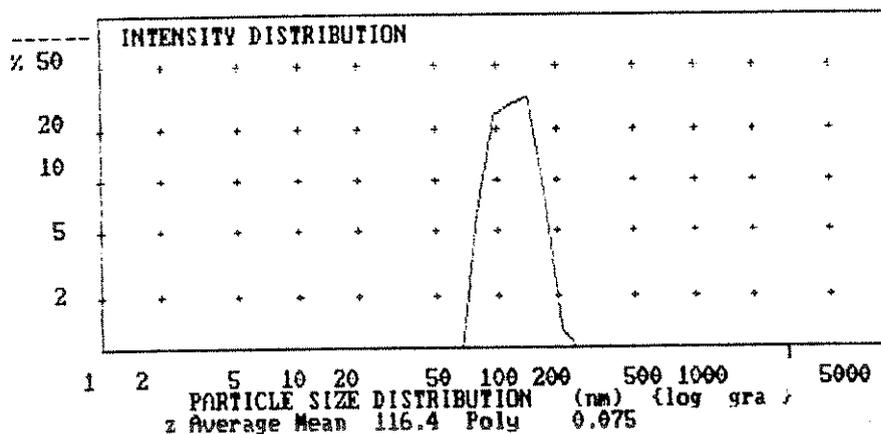
Amostra P10

Calculated from Data from accumulation file

Data File in : c:\data\analises.dat Record No. 1
 Result Filed in : d:\data\analises.dat Record No. 1

Data Taken at 09:38:33 on 12:11:1996

Temperature 25.0 Viscosity 0.8905 Refractive Index (Liquid) 1.330 Angle 90.0
 Particle Refractive Index (real) 0.000 (imag) 0.000
 Count rate 31.8 (1000's /sec)



PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (nm)				PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (nm)			
Class	amount	%	below	Class	amount	%	below
10.6	0.0	0.0	0.0	105.7	28.0	30.6	100.0
12.8	0.0	0.0	0.0	128.1	31.0	58.6	100.0
15.5	0.0	0.0	0.0	155.2	0.3	98.4	100.0
18.8	0.0	0.0	0.0	188.0	1.3	98.7	100.0
22.8	0.0	0.0	0.0	227.8	0.0	100.0	100.0
27.6	0.0	0.0	0.0	276.0	0.0	100.0	100.0
33.4	0.0	0.0	0.0	334.4	0.0	100.0	100.0
40.5	0.0	0.0	0.0	405.1	0.0	100.0	100.0
49.1	0.0	0.0	0.0	490.8	0.0	100.0	100.0
59.5	0.0	0.0	0.0	594.7	0.0	100.0	100.0
72.0	6.4	0.0	0.0	720.5	0.0	100.0	100.0
87.3	24.2	6.4	6.4	872.8	0.0	100.0	100.0

Dist. mean 122.6 St.Dev. 26.3
 Analysis Range 100 Fit 1.01E-03 Channels 10 Spacing 1.28
 Peaks : 122.6 [100.0] fwhm 72.9

Merit 47.5 % : In Range 96.5 % : Accumulation Time 260.0 (Secs)

Figura 26 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesículas convencionais extrudadas à pressão de 10 Kgf/cm² à concentração de 2,5 mM.

MALVERN ANALYSIS REPORT

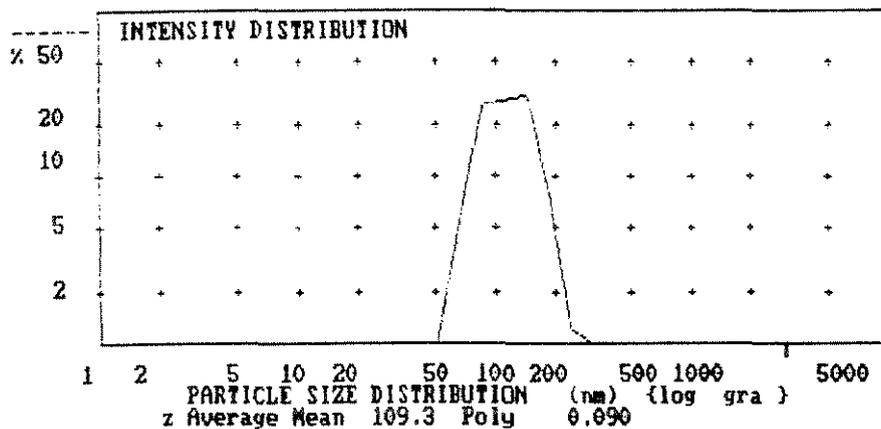
Amostra P20

Calculated from Data from accumulation file

Data Filed in : d:\data\analises.dat Record No. 3
 Result Filed in : d:\data\analises.dat Record No. 2

Data Taken at 09:49:08 on 12:11:1996

Temperature 25.0 Viscosity 0.8905 Refractive Index (Liquid) 1.330 Angle 90.0
 Particle Refractive Index (real) 0.000 (imag) 0.000
 Count rate 22.4 (1000's /sec)



PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (nm)				INTENSITY DISTRIBUTION			
Class	amount	%	below	Class	amount	%	below
4.3	5.6	0.0	0.0	96.0	124.4	28.5	31.6
5.6	7.2	0.0	0.0	124.4	161.2	31.0	60.1
7.2	9.3	0.0	0.0	161.2	208.0	7.7	91.0
9.3	12.1	0.0	0.0	208.0	270.6	1.2	98.8
12.1	15.7	0.0	0.0	270.6	350.5	0.0	100.0
15.7	20.3	0.0	0.0	350.5	454.1	0.0	100.0
20.3	26.3	0.0	0.0	454.1	588.3	0.0	100.0
26.3	34.1	0.0	0.0	588.3	762.2	0.0	100.0
34.1	44.2	0.0	0.0	762.2	987.5	0.0	100.0
44.2	57.2	0.0	0.0	987.5	1279.4	0.0	100.0
57.2	74.1	5.6	0.0	1279.4	1657.5	0.0	100.0
74.1	96.0	26.0	5.6	1657.5	2147.4	0.0	100.0

Dist. mean 117.7 St.Dev. 34.0
 Analysis Range 500 Fit 1.63E-03 Channels 16 Spacing 1.20
 Peaks : 117.7 [100.0] fwhm 95.1

Merit 47.6 % : In Range 94.0 % : Accumulation Time 290.0 (Secs)

Figura 27 - Diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesículas convencionais extrudadas à pressão de 20 Kg/cm² à concentração de 2,5 mM.

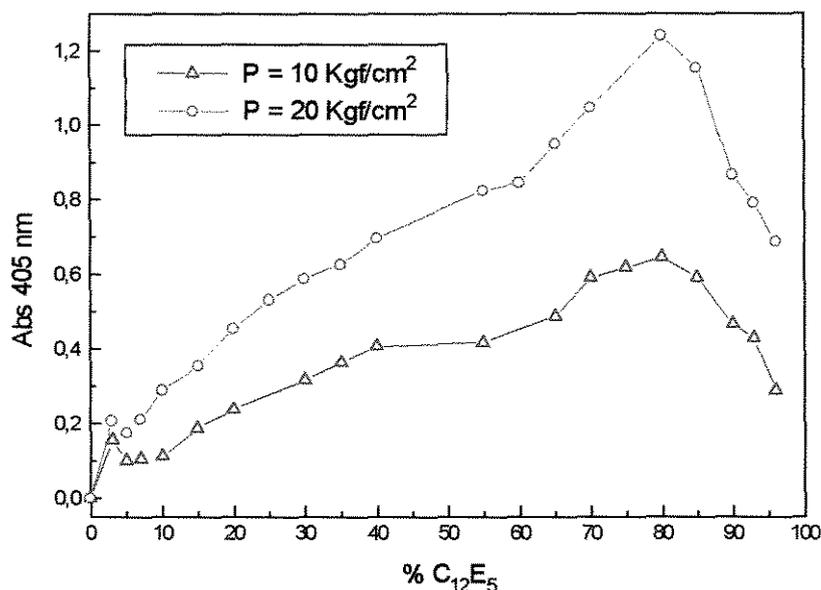


Figura 28 - Perfil de estabilidade de lipossomas convencionais (1mM) extrudados 15 vezes à pressão de 10 e 20 Kgf/cm² em presença de C₁₂E₅.

Os perfis de estabilidade das vesículas mostraram-se semelhantes apenas quanto ao tipo de comportamento, pois os lipossomas extrudados a 20 Kgf/cm² apresentaram variações muito maiores nas absorvâncias relativas, o que indica um maior crescimento das vesículas e conseqüentemente uma menor estabilidade na presença de C₁₂E₅. A menor estabilidade destas vesículas poderia ser atribuída ao seu menor diâmetro médio (109,3 nm), resultando em agregados sujeitos a maiores tensões laterais decorrentes da maior curvatura da bicamada lipídica, o que facilita a penetração das moléculas de tensoativo. Deste modo, a diferença nos diâmetros das vesículas extrudadas a 10 e a 20 Kgf/cm², apesar de não ser grande, torna-se significativa no tocante à estabilidade. Experimentalmente observou-se que no processo de extrusão a 20 Kgf/cm² a passagem da amostra pela membrana é mais brusca promovendo a formação de espuma e bolhas de ar na solução. As

moléculas anfífilas de lipídios podem ter sua distribuição no meio aquoso alterada pela presença das bolhas que pode influenciar no empacotamento da bicamada. Devido à maior uniformidade e maior estabilidade das vesículas extrudadas a 10 Kgf/cm^2 , além das condições de operação mais brandas, esta pressão de extrusão foi adotada nos experimentos posteriores. Experimentalmente, observou-se também uma variação significativa da absorvância em função de uma agitação inicial, feita pela leitora de placas do tipo ELISA, de forma que todos os experimentos realizados posteriormente foram padronizados apenas com agitação branda no final das duas horas por 3 segundos.

4.2.3 - Avaliação de Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Vesículas Multilamelares

Com o objetivo de se avaliar o grau de organização da membrana para vesículas multilamelares, foram obtidos os espectros de ressonância paramagnética eletrônica destas vesículas. Vesículas multilamelares convencionais e com 6% de PEG de pesos moleculares 750, 2000 e 5000 contendo 1 mol% de marcador de spin 5-SASL foram preparadas pelo método de hidratação do filme seco. Devido à falta de definição dos desdobramentos hiperfinos internos dos espectros obtidos neste sistema não foi possível determinar o parâmetro de ordem destas vesículas. No entanto o A_{\parallel} paralelo (A_{\parallel}) que é aproximadamente proporcional ao parâmetro de ordem (Inoue et al., 1994 a) foi determinado nos espectros. Os resultados são apresentados na Tabela 10 onde verifica-se que os valores de A_{\parallel} são semelhantes, indicando que a fase membrana predomina em todas as preparações. Os resultados também confirmam que as pequenas modificações no processo de hidratação, tais como adição de solução de DMPE-PEG₇₅₀ após a formação do filme seco

de lipídios, não provocaram mudanças significativas nas vesículas multilamelares obtidas.

Tabela 10. Valores de A paralelo ($A//$) de vesículas multilamelares.

Vesículas Multilamelares	$A//$ (gauss)
Convencionais	28,65
6% PEG ₇₅₀	30,70
6% PEG ₂₀₀₀	29,45
6% PEG ₅₀₀₀	28,65

4.3 - Influência da Porcentagem de DMPE-PEG₂₀₀₀ na Estabilidade das Vesículas Unilamelares

A influência da porcentagem de PEG na estabilidade das vesículas unilamelares foi analisada através dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica, e dos perfis de turbidez de soluções obtidos para o PEG de peso molecular 2000, em toda a faixa de concentrações do surfatante C₁₂E₅. Os ensaios de RPE foram feitos com vesículas convencionais e contendo DMPE-PEG, usando 1% do marcador de membrana 5-SASL, calculado em relação à quantidade total de lipídios. Utilizou-se o PEG de peso molecular 2000 pois este foi o lipídio sintetizado em maior quantidade e os resultados obtidos com PEG₂₀₀₀ foram suficientes para se avaliar o efeito da porcentagem de PEG na superfície das vesículas.

O conjunto de dados obtidos pelos dois métodos nos permite analisar mais claramente o comportamento dos sistemas, uma vez que os dados de RPE representam uma medida direta das variações do estado da bicamada sob a ação do tensoativo, enquanto que os perfis de absorvância refletem indiretamente, e com o envolvimento de um maior número de fenômenos, as mudanças morfológicas resultantes nas vesículas.

Na Figura 29 são apresentados os espectros típicos do marcador 5-SASL obtidos em água, em micelas de tensoativo $C_{12}E_5$ e em lipossomas unilamelares. Inicialmente tem-se o espectro do marcador em água. Este resultado é típico de sistemas isotrópicos, indicando que o marcador em água encontra-se em sistema totalmente desorientado ($S = 0$). Em seguida tem-se o espectro do marcador em micelas de tensoativo $C_{12}E_5$ indicando um aumento da ordem do sistema verificado pelo maior distanciamento entre os extremos externos e um aumento no parâmetro de ordem ($S = 0,467$). Finalmente tem-se o espectro do marcador em bicamada lipídica de lipossomas unilamelares com 6% de PEG₂₀₀₀. Em membranas lipídicas o marcador está em um ambiente melhor orientado do que em micelas como pode ser observado pelo maior distanciamento entre extremos externos ($S = 0,834$).

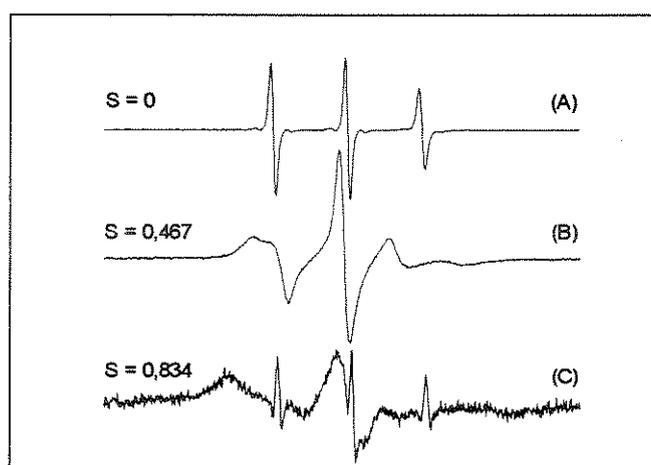


Figura 29. Espectros típicos do marcador 5-SASL em água (A), em micela (100% de tensoativo $C_{12}E_5$, 24 mM) (B) e em bicamada lipídica (1 mM) (C).

Os espectros obtidos de lipossomas em presença de diferentes porcentagens de tensoativo, foram usados para o cálculo dos desdobramentos

hiperfinos ($A_{//}$ e A_{\perp}). A Figura 30 mostra a variação do parâmetro $A_{//}$ em função da porcentagem de $C_{12}E_5$ para lipossomas unilamelares convencionais e com 3 e 6% de DMPE-PEG₂₀₀₀. Os valores de $A_{//}$ mostrados na Figura 30, indicam de uma maneira bem definida a presença de uma fase membrana até 25% de $C_{12}E_5$. De 25 a 60% de tensoativo, os valores decrescentes de $A_{//}$ refletem uma diminuição da ordem do sistema e conseqüentemente um aumento da fluidez da membrana, caracterizando uma região de transição entre a fase membrana e a micelar, que prevalece após a concentração de 60% de surfatante. Os valores dos parâmetros de ordem listados na Tabela 11 confirmam a presença destas 3 regiões.

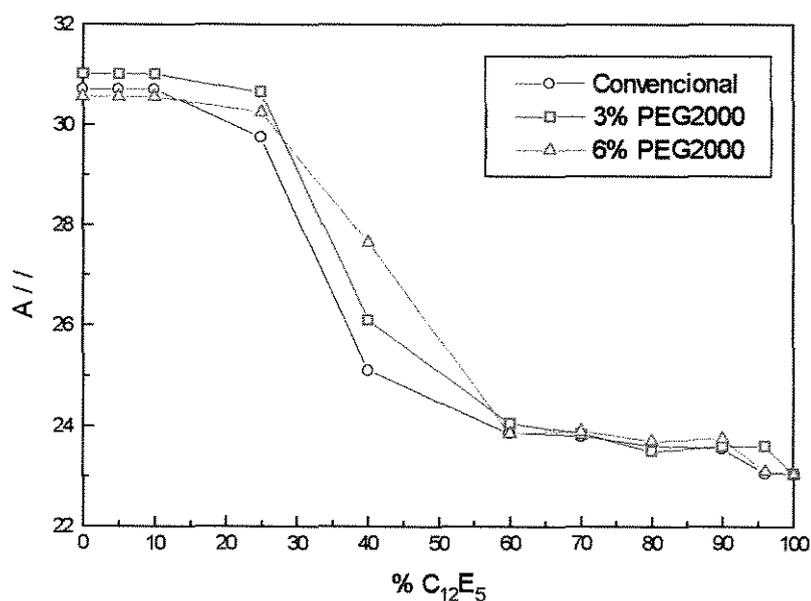


Figura 30. Variação de $A_{//}$ em misturas de vesículas - tensoativo em função da porcentagem de $C_{12}E_5$.

Na Tabela 11 figuram os valores do desdobramento hiperfino externo e o parâmetro de ordem para as vesículas em presença de $C_{12}E_5$, nas situações em que os espectros de RPE permitiram o cálculo dos parâmetros $A_{//}$ e A_{\perp} . Não foi possível a determinação dos valores do parâmetro de ordem para

vesículas convencionais e com 3% de PEG₂₀₀₀ em presença de tensoativo C₁₂E₅ à concentrações menores que 25% devido à falta de definição dos desdobramentos hiperfinos internos. Os valores do parâmetro de ordem para vesículas contendo 6% de PEG₂₀₀₀ indicam uma redução da ordem do sistema com o aumento da porcentagem de tensoativo. Pode-se observar que os valores do parâmetro de ordem obtidos variam aproximadamente na mesma proporção que o desdobramento hiperfino externo confirmado a presença das 3 regiões.

Tabela 11. Parâmetros de ordem (*S*) e desdobramento hiperfino externo (*A//*) da mistura de vesículas e tensoativo.

% C ₁₂ E ₅	Convencional		3% PEG ₂₀₀₀		6% PEG ₂₀₀₀	
	<i>S</i>	<i>A//</i>	<i>S</i>	<i>A//</i>	<i>S</i>	<i>A//</i>
0	-	30,7	-	31	0,834	30,55
5	-	30,7	-	31	0,834	30,55
10	-	30,7	-	31	0,834	30,55
25	-	29,75	-	30,65	0,819	30,25
40	0,584	25,1	0,617	26,1	0,678	27,65
60	0,528	23,85	0,525	24,05	0,513	23,85
70	0,507	23,8	0,513	23,85	0,515	23,9
80	0,501	23,6	0,496	23,5	0,503	23,7
90	0,492	23,55	0,496	23,6	0,500	23,75
96	0,471	23,05	0,492	23,6	0,475	23,1
100	0,467	23,05	0,467	23,05	0,467	23,05

Nas Figuras 31 e 32 são apresentados os perfis de estabilidade de lipossomas convencionais e com PEG, obtidos através de medidas de turbidez total das soluções, sendo que os dados da Figura 32 foram obtidos com lipossomas contendo marcador de spin 5-SASL na membrana usados nos ensaios de RPE.

Os perfis de absorvância das Figuras 31 e 32, embora apresentem diferenças significativas em valores absolutos, nos permitem verificar as três regiões delineadas pelo espectro de RPE.

Observações adicionais podem ser feitas para cada uma dessas regiões nos perfis de absorvância. Para os lipossomas convencionais as curvas apresentam primeiro um leve decréscimo em relação ao valor inicial da absorvância. Para os lipossomas com PEG, esse efeito é muito mais acentuado, e é antecedido por um aumento da absorvância em relação ao valor inicial.

Do ponto de vista físico, essas variações podem ser interpretadas como um deslocamento dos lipídios para a solução, resultante da acomodação da bicamada à presença do surfatante e o aparecimento de micelas mistas, embora predomine a fase membranar.

Na região de transição, entre 25 e 60% de tensoativo, há uma diferença marcante no comportamento dos lipossomas convencionais e com PEG. Observa-se que a estabilidade cresce com o aumento da concentração de PEG na superfície das vesículas.

A fase de crescimento efetivo das vesículas não aparece para os lipossomas com concentrações de 6% e 9% de PEG, onde há um contínuo decréscimo da absorbância com o aumento da porcentagem de tensoativo indicando uma redução contínua no diâmetro das vesículas até a completa solubilização. Esta mudança no perfil de estabilidade em concentrações a partir de 6% de PEG deve-se provavelmente a uma mudança no processo de desestabilização das vesículas. As moléculas de tensoativos são impedidas pela presença do PEG de penetrar a bicamada de fosfolipídios e promover o crescimento das vesículas, no entanto, moléculas de fosfolipídios difundem da bicamada para as micelas de tensoativo causando uma redução gradativa no diâmetro médio das vesículas até a completa solubilização em micelas mistas.

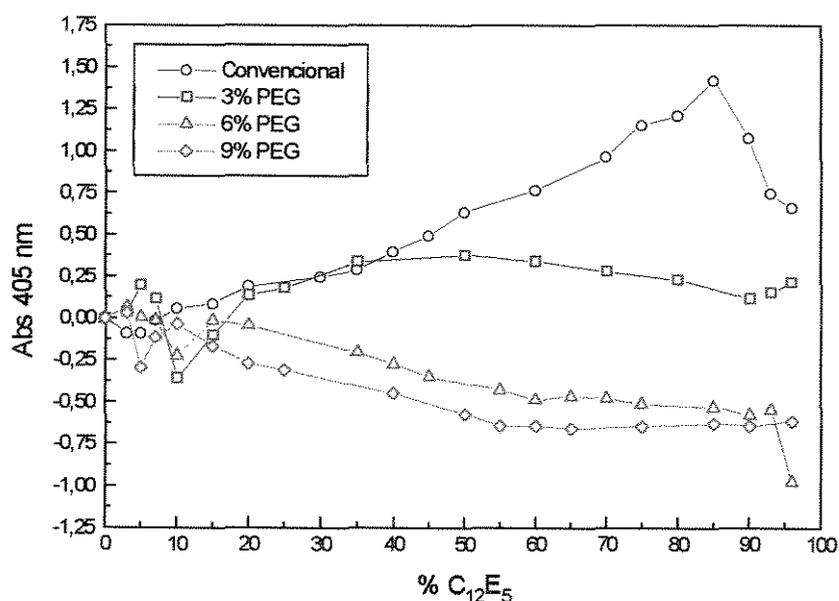


Figura 31 - Perfis de estabilidade de lipossomas convencionais e contendo PEG₂₀₀₀ (1mM), em função da concentração do tensoativo C₁₂E₅, para lipossomas com 3, 6 e 9 % de PEG na superfície.

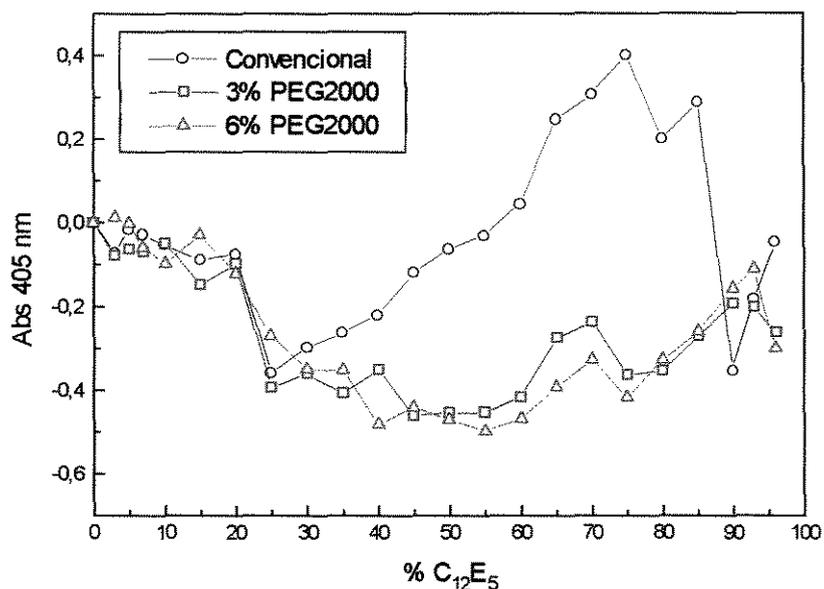


Figura 32. Perfis de estabilidade de lipossomas convencionais e com PEG₂₀₀₀ na superfície (1mM) contendo 1% de marcador de membrana 5-SASL.

4.4 - Influência do Tamanho da Cadeia de PEG na Estabilidade das Vesículas Unilamelares

A Figura 33 mostra a influência do tamanho da cadeia de PEG na estabilidade dos lipossomas com um teor de 3% de PEG em relação ao total de lipídios na vesícula em comparação com lipossomas convencionais sob a ação do tensoativo C₁₂E₅. Este teor de 3% de PEG foi escolhido devido à melhor resolução dos perfis em toda a faixa de concentração de tensoativos. Para todos os pesos moleculares, a presença de PEG aumenta a estabilidade das vesículas em comparação aos lipossomas convencionais, como pode ser observado pelo menor crescimento das vesículas. A elevadas concentrações de C₁₂E₅ os resultados mostram que a maior estabilidade dos lipossomas foi obtida com PEG de peso molecular 2000 Da como pode ser observado pelo

menor crescimento das vesículas. Na região de alta concentração de surfatante, maior que 60%, os resultados não mostram diferenças significativas no crescimento e desestruturação das vesículas contendo PEG₇₅₀ e PEG₅₀₀₀. Isto demonstra que o mecanismo de estabilização não está unicamente ligado ao aumento do comprimento da cadeia, indicando que provavelmente há um comprimento ideal de máxima estabilidade. Embora o aumento da cadeia proporcione um aumento de hidrofiliicidade e conseqüentemente uma maior hidratação na superfície das vesículas, que faz com que haja uma diminuição da difusão de moléculas de tensoativo até a bicamada, outros fatores tais como mobilidade e conformação das cadeias ou mudanças no empacotamento da bicamada, podem implicar em uma redução da estabilidade. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Blume e Cevc (1993) os quais verificaram que a estabilidade de lipossomas em presença de fluidos biológicos é aumentada devido a mobilidade da barreira superficial polar introduzida pela presença de PEG existindo um comprimento ótimo das suas cadeias.

Na região de baixa concentração de surfactante, menor que 25%, as curvas exibem oscilações de absorbância, sendo nesse caso muito mais acentuadas que as observadas com a variação de concentração de PEG na superfície das vesículas. Essas oscilações são tanto maiores quanto maior for a cadeia de PEG. Outro ponto importante a observar nos resultados, é que o aumento da cadeia de PEG produz um retardamento da região de crescimento efetivo das vesículas.

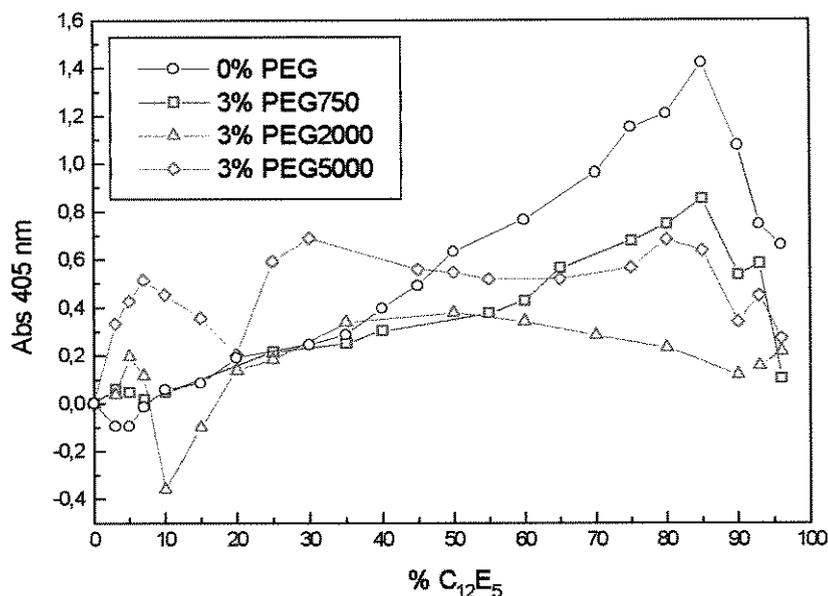


Figura 33 - Efeito do tamanho da cadeia de PEG na estabilidade de lipossomas (1mM). Teor de 3% de PEG.

4.5 - Perfis de Estabilidade dos Lipossomas em Presença dos Tensoativos da Série C_xE_y. Influência do HLB na Estabilidade das Vesículas Unilamelares

O estudo da influência do balanço hidrofílico hidrofóbico das moléculas de tensoativo na estabilidade de lipossomas unilamelares convencionais e modificados com PEG₂₀₀₀ foi feito em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈, e apresentou os perfis mostrados a seguir. Nestes experimentos utilizou-se o DMPE-PEG com PEG de peso molecular de 2000 Da, pois este foi o tamanho de cadeia que produziu as vesículas de maior estabilidade, bem como o lipídio sintetizado em maior quantidade neste trabalho.

A Figura 34 mostra os perfis obtidos com lipossomas unilamelares convencionais, onde as vesículas mostraram-se bem mais estáveis em presença dos tensoativos $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{16}E_8$, do que em presença do $C_{12}E_5$ que é o tensoativo mais hidrofóbico. Somente com esse último tensoativo é que se pode observar as 3 regiões características da variação de estabilidade de lipossomas em presença de tensoativos. Com os tensoativos $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{16}E_8$, praticamente não se observa crescimento das vesículas, e sim uma redução contínua na absorbância e a partir da concentração de 60% há o provável aparecimento de micelas em todas as situações. Interessante observar que para os tensoativos $C_{12}E_8$ e $C_{14}E_8$ que são os tensoativos mais hidrofílicos pois possuem os maiores HLB provavelmente ocorre agregação das micelas acima de 90 % de concentração de tensoativo, o que explica os elevados valores da absorbância nestas altas concentrações de tensoativo. Portanto a hidrofílicidade do tensoativo parece ser de fundamental importância no processo de formação de grandes agregados. Os resultados mostram que a estabilidade decresce quando o HLB do tensoativo é 11,67, não apresentando diferenças significativas quando o HLB varia de 12,42 a 13,71. Neste trabalho tentamos utilizar outros tensoativos da série, mas devido às limitações de solubilidade apresentadas pelos tensoativos $C_{14}E_5$, $C_{16}E_5$ e $C_{18}E_5$ (possuidores de HLBs mais baixos que 11,67) não foi possível verificar se a estabilidade continua diminuindo com a redução do HLB, ou apresenta um ponto de máxima redução, tal como o comportamento da permeabilidade de lipossomas com o HLB obtido por Maza e colaboradores 1992 (a).

Observa-se que o perfil de estabilidade obtido com $C_{12}E_8$, teve a forma diferente daquele obtido por Edwards e Almgren (1992) para vesículas convencionais sonicadas, constituídas de PC, não apresentando a fase de

crescimento das vesículas. Edwards e Almgren verificaram que com o aumento do grupamento de cabeça polar de $C_{12}E_5$ para $C_{12}E_8$, o início do crescimento das vesículas e início de formação de micelas foi deslocado para menores porcentagens de tensoativo, indicando uma maior instabilidade destas vesículas em presença do tensoativo $C_{12}E_8$. Esta diferença com nossos resultados foram provavelmente devido à presença de DMPE e COL em nossa composição, bem como a de obtenção de vesículas unilamelares por extrusão que produz vesículas mais uniformes.

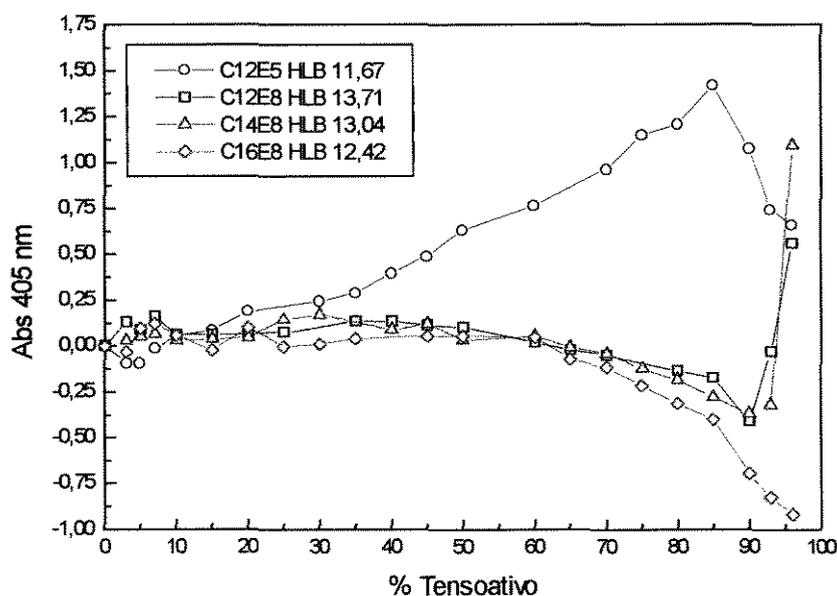


Figura 34 - Perfis de estabilidade de lipossomas convencionais (1mM) em presença dos tensoativos $C_{12}E_5$, $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{16}E_8$ em função da concentração dos tensoativos.

O efeito dos diferentes tensoativos na estabilidade de lipossomas unilamelares contendo 3% de PEG_{2000} é apresentado na Figura 35. Observa-se que o comportamento em relação ao HLB é semelhante ao observado com lipossomas convencionais: as vesículas mostraram-se bem mais estáveis em

presença dos tensoativos $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{16}E_8$, do que em presença do $C_{12}E_5$. As oscilações à baixa concentração de tensoativo (menor que 25%), foram muito mais acentuadas para o $C_{12}E_5$.

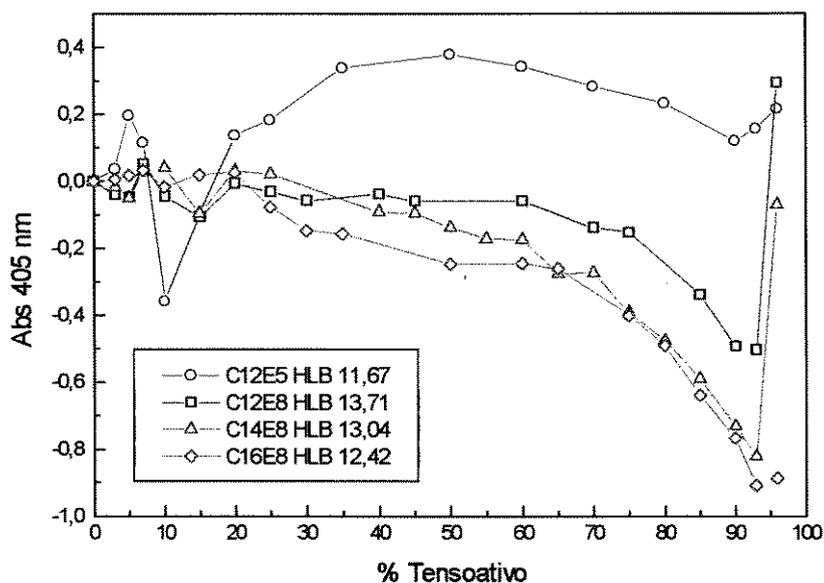


Figura 35 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 3% de PEG_{2000} (1mM) em presença dos tensoativos $C_{12}E_5$, $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{16}E_8$ em função da concentração dos tensoativos.

A partir de 6% de PEG_{2000} na superfície das vesículas unilamelares os perfis de estabilidade se tornam mais semelhantes, tendo em comum o gradativo decréscimo de absorvância na faixa de aproximadamente 25 a 60% acentuando-se à elevadas concentrações do tensoativo como pode ser observado na Figura 36. Esta tendência se torna ainda mais evidente para 9% de PEG (Figura 37) indicando que nestas porcentagens a presença de PEG tende a minimizar o efeito da influência do HLB da molécula de tensoativo na estabilidade das vesículas.

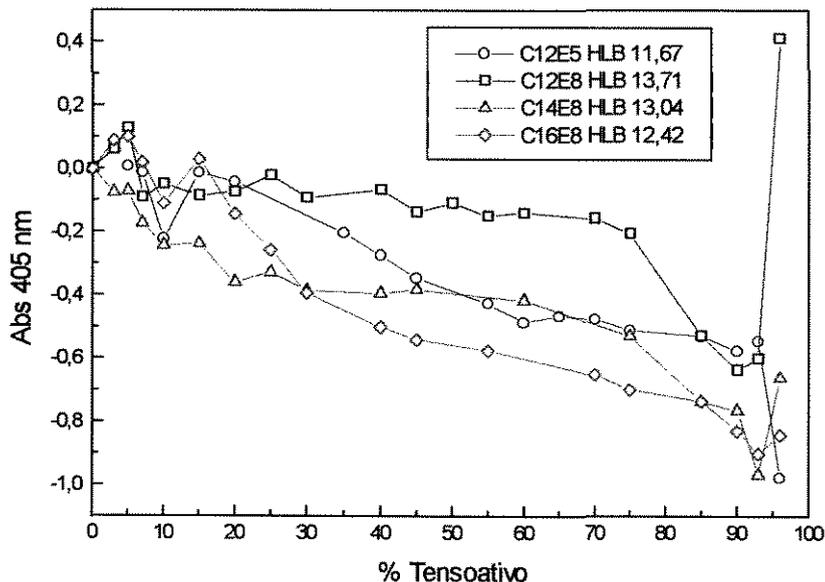


Figura 36 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 6% de PEG₂₀₀₀ (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos.

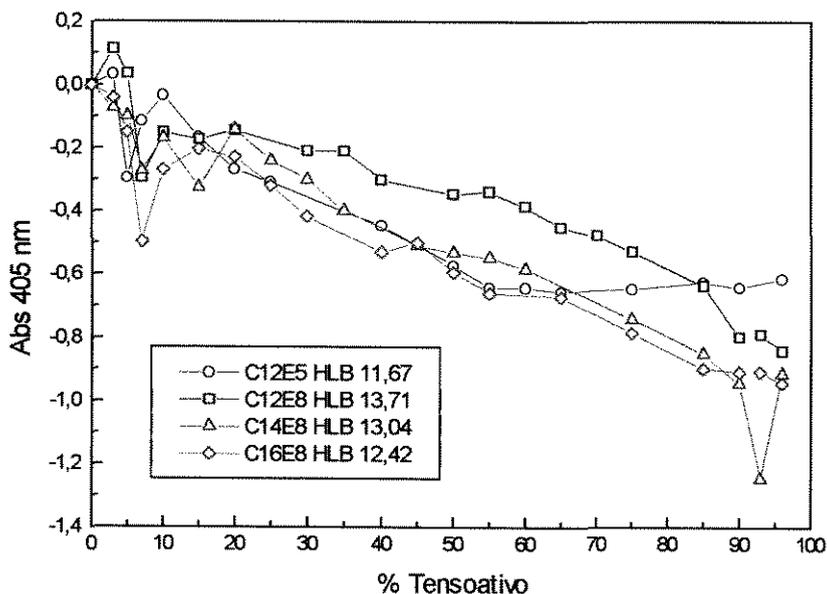


Figura 37 - Perfis de estabilidade de lipossomas com 9% de PEG₂₀₀₀ (1mM) em presença dos tensoativos C₁₂E₅, C₁₂E₈, C₁₄E₈ e C₁₆E₈ em função da concentração dos tensoativos.

De uma maneira geral, os resultados obtidos mostram que a estabilidade dos lipossomas com PEG é diferente daquela observada com os lipossomas convencionais, também em relação ao HLB dos tensoativos. Fica evidente também nestas figuras o efeito estérico de proteção exercido pelas cadeias de PEG na superfície das vesículas, com a formação de uma camada hidrofílica ao redor da vesícula.

5.0 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho foram valiosos considerando-se que com o domínio da metodologia de derivatização e purificação do DMPE com PEG de vários pesos moleculares não mais é necessário importar-se esses fosfolipídios, reduzindo-se bastante os custos das pesquisas e posteriores aplicações dos lipossomas contendo PEG no nosso país. Os resultados de estabilidade obtidos de lipossomas convencionais e com PEG mostram regiões operacionais úteis para aplicações médicas de lipossomas e para o estudo de membranas lipídicas. A observação do comportamento dos sistemas auxilia o entendimento dos mecanismos de desestabilização de lipossomas em presença de tensoativos.

A derivatização do fosfolipídio DMPE com PEG, usando carbonil diimidazol como agente de ligação (segundo metodologia usada na patente 5.013.556 de 7 de maio de 1991) foi reproduzida com bom rendimento neste trabalho. A mesma metodologia foi usada com bons resultados para a derivatização do mesmo fosfolipídio com PEG de pesos moleculares 750 e 5000 Da.

O processo de purificação usado na referida patente foi também reproduzido para o PEG₂₀₀₀, embora o produto obtido não seja tão puro quanto ao fabricado pela Avanti Polar Lipids. Admite-se que essas impurezas estejam em baixa concentração, por não terem sido detectadas na cromatografia de camada delgada (TLC).

As modificações introduzidas nos gradientes de concentração dos solventes usados na purificação do fosfolipídio derivatizado com PEG de

pesos moleculares 750 e 5000 Da, mostraram-se efetivas. O aumento do caráter hidrofílico da mistura de solventes para a purificação do PEG de peso molecular 5000 Da e a redução para o PEG com peso molecular 750 Da, em relação ao gradiente usado para o PEG₂₀₀₀, propiciou uma purificação adequada dos produtos.

A caracterização dos lipídios derivatizados por cromatografia de camada delgada mostrou que, com o aumento da cadeia de PEG, há um aumento na hidrofiliicidade global da molécula. A CMC dos lipídios derivatizados decresce com o aumento da cadeia de PEG devido provavelmente a um aumento na área superficial ocupada pela molécula na interface líquido/ar.

Vesículas multilamelares convencionais e com 6% de PEG de pesos moleculares 750, 2000, e 5000 Da foram preparadas pelo método da hidratação do filme seco e tiveram graus de empacotamento semelhantes.

Vesículas unilamelares pequenas (VUP), foram obtidas por extrusão em membranas de policarbonato, com 15 passagens pela extrusora a 75 °C com boa reprodutibilidade.

A pressão de extrusão mostrou-se importante fator para a estabilidade e reprodutibilidade das preparações das vesículas. A pressão de 10 Kgf/cm² foi adequada para a obtenção de vesículas unilamelares com uma estreita distribuição de tamanho, características estas imprescindíveis para aplicações médicas.

A presença de PEG na superfície das vesículas aumenta a estabilidade dos lipossomas em relação aos convencionais. A estabilidade cresce com o aumento da concentração de PEG de 3, 6 e 9 % na superfície das vesículas, demonstrando a eficácia do efeito estérico de proteção exercido pelas cadeias de PEG na superfície dos lipossomas. Os espectros de RPE e os perfis de absorvância das soluções mostram o aparecimento de três regiões distintas com o aumento da concentração de tensoativo. A primeira à concentrações de tensoativos menores que 25%, onde predomina a fase membranária, seguida de uma fase de transição entre 25 e 60%, onde coexistem vesículas e micelas mistas em proporções significativas, e finalmente a fase micelar, à concentrações de tensoativos maiores que 60%.

O aumento da cadeia de PEG não necessariamente implica no aumento da estabilidade das vesículas. A estabilidade aumenta quando o peso molecular da cadeia de PEG cresce de 750 para 2000 Da, porém decresce para o PEG de peso molecular 5000 Da, para o qual a estabilidade é semelhante àquela observada para os lipossomas com PEG 750 Da.

O balanço hidrofílico-hidrofóbico dos tensoativos influencia a estabilidade dos lipossomas. Os tensoativos mais hidrofóbicos causam maior desestabilização na membrana. A maior variação na estabilidade das vesículas convencionais foi observada quando o HLB do tensoativo varia de 11,67 para 12,42. Menores variações foram observadas para os valores de HLB 12,42; 13,04 e 13,71 dos tensoativos $C_{16}E_8$, $C_{14}E_8$ e $C_{12}E_8$, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para os lipossomas contendo 3% de PEG. O aumento da concentração de PEG₂₀₀₀ para 6 e 9% minimiza os efeitos da influência do HLB da molécula do tensoativo na estabilidade das vesículas.

6.0 - SUGESTÕES

O trabalho realizado até aqui fornece à literatura informações adicionais importantes no estudo da estabilidade de lipossomas convencionais e modificados com PEG em presença de tensoativos não-iônicos. Estes resultados abrem novas perspectivas de aplicação e estudo. A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

Identificar as prováveis causas das diferenças no comportamento dos DMPE-PEG nas curvas de determinação de concentração micelar crítica dos lipídios sintetizados em comparação aos lipídios padrão.

Sintetizar DMPE-PEG's utilizando PEG com pesos moleculares entre 750 e 5000 Da. Otimização do gradiente de solventes utilizados na purificação do DMPE-PEG de forma a produzir e purificar lipídios com PEG de diferentes pesos moleculares.

Estudar a estabilidade entre lipossomas unilamelares de mesma composição contendo PEG preparados por extrusão em membranas de diferentes diâmetros de poro e por sonicação.

Estudar a eficiência de encapsulamento e permeabilidade da bicamada de lipossomas contendo PEG sob ação de tensoativos pela liberação de marcadores encapsulados, tais como carboxifluoresceína. Paralelamente, poder-se-ia estudar a estabilidade por modificações na turbidez total e ordenação da bicamada por ressonância paramagnética eletrônica.

Estudar a estabilidade de lipossomas contendo PEG com outros tensoativos da série C_XE_Y com outros HLB's.

Coletar um maior número de dados experimentais com EPR na faixa de 25 a 60% de tensoativo com o objetivo de estudar melhor o comportamento da fluidez da membrana nesta faixa. Estudar as modificações na ordenação da bicamada das vesículas pela ação de tensoativos por ressonância paramagnética eletrônica utilizando marcadores de spin mais hidrofóbicos.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, T. M.; Chonn, A. Large Unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Let.* **223** (1) :42-46, 1987.

Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redeman, C.; Yay-Young. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **1066** :29-36, 1991.

Allen, T. M.; Hansen, C.; Rutledge, J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **981** :27-35, 1989.

Allen, T. M.; Ryan, J. L.; Papahadjopoulos, D. Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* **818** :205-210, 1985.

Alonso, A.; Saez, R.; Villena.; Goñi, F. M. Increase in size of sonicated phospholipid vesicles in the presence of detergents. *Membrane Biol.* **67** :55-62, 1982.

Alonso, A.; Urbaneja, M. -A.; Goñi, F. M.; Carmona, F. G.; Canovas, F. G.; Fernandez-G, J. C. Kinetic studies on the interaction of phosphatidylcholine liposomes with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta.* **902** :237-246, 1987.

Blume, G.; Cevc, G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **1029** :91-97, 1990.

Blume, G.; Cevc, G. Drug-carrier and stability properties of long-lived lipid vesicles, cryptosomes, in vitro and in vivo. *J. Lipos. Res.* **2** (3) :355-368, 1992.

Blume, G.; Cevc, G. Molecular mechanism of lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **1146** :157-168, 1993.

Carrington, A. & McLauchlan, A. D. Introduction to Magnetic Resonance, New York Harper & Row, 1967.

Chen, P. S.; Toribara, T. Y.; Warner, H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28** :1756-1758, 1956.

Edwards, K.; Almgren, M. Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. *Progr. Col. & Pol. Sci.* **82** :190-197, 1990.

Edwards, K.; Almgren, M. Solubilization of lecithin vesicles by C₁₂E₈: structural transitions and temperature effects. *Prog. Col. Interf. Sci.* **147** (1) :1-21, 1991.

Edwards, K.; Almgren, M. Surfactant-induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup size. *Langmuir*, **8** :824-832, 1992.

Edwards, K.; Almgren, M; Bellare, J.; Brown, W. Effects of Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. *Langmuir* **5** :473-478, 1989.

Gabizon, A.; Papahadjopoulos, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposomes clearance "in vivo". *Biochim. Biophys. Acta.* **1103** :94-100, 1992.

Goñi, F. M.; Alonso, A. Surfactant-induced liposome fusion: molecular mechanisms and biotechnological applications. In Gaber, B. P.; Schnur, J. M.; Chapman, D. *ed.* Biotechnological applications of lipid microstructures. advances in experimental medicine & Biology. New York and London Plenum press **238**, 1986.

Griffith, O. H., Cornell, D. W. & McConnell, H. M. *J. Phys. Chem.* **43** :2909-2917, 1965.

Hinze, W.L.; Pramauro, E. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **24** (2) :133-177, 1993.

Hope, M. J.; Bally, M.B. Bally; 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. *Biochim. Biophys. Acta.* **812** :55-65, 1985.

Hubbel, W. L. & McConnell, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **93** :314-326, 1971.

Inoue, T.; Kawamura, H.; Okukado, S.; Shimosawa, R. Characterization of molecular assemblies formed in aqueous C₁₀E₇/DPPC mixture by spin label and fluorescence probe techniques and mechanism of micelle-to-vesicle transformation. *J. Col. Int. Sci.* **168** :94-102, 1994 (b).

Inoue, T.; Motoyama, R.; Totoki, M.; Miyakawa, k.; Shimosawa, R. Molecular aggregates formed in aqueous mixtures of POE type nonionic surfactants and phosphatidylcholines. *J. Col. Int. Sci.* **164** :318-324, 1994 (a).

Israelachvili, J. Intermolecular & Surface Forces. Second Edition, San Diego, 1994.

Israelachvili, J., Marcelja, S. & Horn R.G. Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. of Biophys.* **13** (2) :121-200, 1980.

Jost, P.; Libertini, L. J.; Hebert, V. C. & Griffith, O. H. *J. Mol. Biol.*, **59** :77-98, 1971.

Klibanov, A.; Maruyama, K; Beckerleg, A. M.; Torchilin, V. P.; Huang, L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta.* **1062** :142-148, 1991.

Klibanov, A.; Maruyama, K; Torchlin, V. P.; Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Let.* **268** (1) :235-237, 1990.

Kreuter, J. *ed.*; Colloidal Drug Delivery Systems. Drugs and the pharmaceutical sciences. New York, Marcel Dekker Inc. **66**, 1994.

Lasch, J.; Hoffmann, J.; Omelyanenko, W. G.; Klibanov, A. A.; Torchilin, V. P.; Binder, H.; Gawrisch, K. Interaction of Triton X-100 and

octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations, spectroscopic studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1022** :171-180, 1990.

Lasic, D. D.; Martin, F. J.; Gabizon, A.; Huang, S. K.; Papahadjopoulos, D. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta.* **1066** :159-165, 1991.

Lasic, D. D. *ed.* Liposomes: from physics to applications. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1993.

Lichtenberg, D. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* **821** :470-478, 1985.

Lichtenberg, D.; Robson, R. J.; Dennis, E. A. Solubilization of phospholipids by detergents - Structural and Kinetic Aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* **737** :285-304, 1983.

Litzinger, D. C.; Huang, L. Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. *Biochim. Biophys. Acta.* **1127** :249-254, 1992.

Mayer, L. D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R.; Janoff, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **817** :193-196, 1985.

Mayer, L. D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* **858** :161-168, 1986.

Maza, A. de la; Leal, J. S.; Parra, J. L.; Garcia, M. T.; Ribosa, I. Permeability changes of phospholipid vesicles caused by surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (5) :315-319, 1991.

Maza, A. de la; A.; Parra, J. L. Solubilization of phospholipid bilayer caused by surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70** (7) :699-706, 1993.

Maza, A. de la; Parra, J. L. Solubilization of unilamellar phospholipid bilayers by nonionic surfactants. *Col. & Pol. Sci.* **272** :721-730, 1994.

Maza, A. de la; Parra, J. L.; A.; Garcia, M. T.; Ribosa, I.; Leal, J. S. Permeability changes in the phospholipid bilayer caused by nonionic surfactants. *J. Col. Int. Sci.* **148** (2) :310-316, 1992 (a).

Maza, A. de la; Parra, J. L.; A.; Leal, J. S. Alteration of permeability of neutral and electronegatively charged liposomes by alkyl sulfate surfactants. *Langmuir.* **8** :2422-2426, 1992 (b).

Moraes, A. M. Preparação, Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Lipossomas Contendo o-Carboranilpropilamina, L-p-Boronofenilalanina e Doxorubicina. Tese de doutorado. FEQ / DPQ / UNICAMP, Campinas, 1996.

Needham, D.; McIntosh, T. J.; Lasic, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1108** :40-48, 1992.

New, R. R. C. *ed.* Liposomes a practical approach. Oxford University Press, 1990.

Pamplona, D. C.; Santana, M. H. A. Mathematical modelling of the mechanical behaviour and stability of liposomes in the presence of surfactants. Anais do 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Rio de Janeiro, 1996.

Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Matthew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.; Lee, K.-D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redeman, C.; Martin, F. J. Sterically Stabilized Liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** (24) :11460-11464, 1991.

Pecora, R. Doppler shifts in light scattering from pure liquids and polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **40** :1604-1614, 1964.

Rozen, M. J. Purification of surfactants for studies of their fundamental surface properties. *J. Col. Int. Sci.* **79** (2), 1981.

Santana, M. H. A.; Carbonell, R. G.; Kilpatrick, P. K. Stability of Surface Modified Liposomes in the Presence of Non-ionic Surfactants. Relatório científico da FAPESP, 1993.

Schick, M. J. *ed.* Nonionic Surfactants - Physical Chemistry. Surfactant Science Series. Marcel Dekker, Inc 23, 1987.

Schreier, S.; Polnazek, C. F. & Smith, I. C. P. *Biochim. Biophys. Acta.* 515 :375-436, 1978.

Steffen, D. M. The effect of cholesterol, phosphatidylethanolamine phosphatidylcholine vesicles when treated with nonionic surfactant. Tese de mestrado, North Caroline State University, Raileigh, NC, EUA, 1993.

Urbaneja, M.-A.; Goñi, F. M.; Alonso, A. Structural changes induced by Triton X-100 on sonicated phosphatidylcholine liposomes. *J. Biochem.* 173 :585-588, 1988.

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

Wertz, J. E. & Bolton, J. R. Eletron Spin Resonance - elementary theory and practical applications. New York McGraW-Hill, 1972.

Woodle, M. C.; Collins, L. R.; Sposler, E. Kossovsky, N; Papahadjopoulos, D.; Martin, F. J. Sterically stabilized liposomes: Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys. J.* 61 :902-910, 1992 (b).

Woodle, M. C.; Matthay, K. K.; Newman, M. S.; Hidayat, J. E.; Collins, L. R.; Redemann, C. T; Martin, F. J.; Papahadjopoulos, D. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1105 :193-200, 1992 (a).

Woodle, M. C.; Lasic, D. D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1113** :171-199, 1992.