

CIBELLE APARECIDA ROSSI TEIXEIRA

**“ENCAPSULAMENTO DE LEVOFLOXACINO EM LIPOSSOMAS
PARA ENTREGA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL”**

CAMPINAS, 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

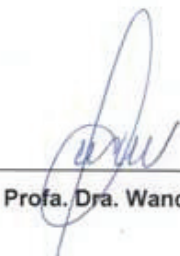
CIBELLE APARECIDA ROSSI TEIXEIRA

**“ENCAPSULAMENTO DE LEVOFLOXACINO EM LIPOSSOMAS
PARA ENTREGA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, na área de Fármacos Medicamentos e Insumos para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

Este exemplar corresponde à versão final de Dissertação defendida pela aluna Cibelle Aparecida Rossi Teixeira, e orientada pela Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida.



Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

**CAMPINAS,
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T235e Teixeira, Cibelle Aparecida Rossi, 1985-
Encapsulamento de levofloxacin em lipossomas para entrega no sistema nervoso central / Cibelle Aparecida Rossi Teixeira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Wanda Pereira Almeida.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Levofloxacin. 2. Lipossomas. 3. Sistema nervoso central. 4. Alzheimer, Doença de. I. Almeida, Wanda Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Encapsulation of levofloxacin in liposomes for delivery in the central nervous system

Palavras-chave em inglês:

Levofloxacin

Liposomes

Central nervous system

Alzheimer's disease

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Wanda Pereira Almeida [Orientador]

Angélica Zaninelli Schreiber

Patrícia Moriel

Data de defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

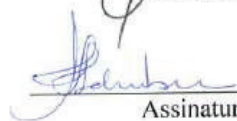
Campinas, 29 de julho de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

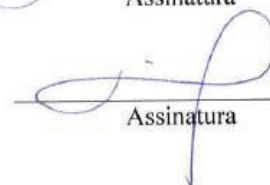
Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber


Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Moriel


Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino


Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador


Assinatura

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) tem grande impacto socioeconômico e é a principal causa de declínio cognitivo, caracterizando-se como um processo neurodegenerativo associado ao envelhecimento. Dentre as causas apontadas dessa patologia pode-se citar o estresse oxidativo, metabolismo anormal da proteína precursora do amilóide levando à formação de peptídeo beta-amilóide contendo 42 resíduos de aminoácidos (A β 42), que tem propriedade auto-agregante, levando à formação de oligômeros neurotóxicos e fibrilas que constituem as placas senis. De acordo com a literatura, a formação dessas placas é dependente de íons cobre e zinco que estão em concentrações muito elevadas no Sistema Nervoso Central (SNC), nos casos da doença de Alzheimer. O arsenal terapêutico disponível para tratar a DA, consiste em inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato, que melhoram o quadro sintomático. O desenvolvimento de fármacos baseados no efeito quelante de metais vem ganhando destaque, uma vez que foi comprovado o envolvimento de cobre e zinco no processo de formação de oligômeros e fibrilas do peptídeo beta-amilóide. Resultados obtidos no nosso laboratório demonstraram que o levofloxacino inibe a agregação e formação de fibrilas do peptídeo A β 42. Entretanto, a passagem desta fluorquinolona pela barreira hematoencefálica é dificultada pela natureza altamente lipofílica desta última. Neste trabalho, desenvolvemos uma formulação lipossomal baseada em colesterol e fosfatidilcolina para o levofloxacino, cujo percentual de encapsulação foi de 78%. A metodologia utilizada para a preparação de lipossomas foi a do filme lipídico seco, após remoção do solvente por evaporação. As partículas de 90 nm de tamanho foram obtidas utilizando-se homogeneizador de alta pressão. Um estudo realizado em um modelo de barreira hematoencefálica composto por células NG97 demonstrou que a formulação é capaz de atravessar por um modelo de barreira que mimetiza a Barreira Hemato-encefálica (BHE). Face estes resultados, o levofloxacino figura como um candidato a reposicionamento de fármaco para tratar a DA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) has great socioeconomic impact and is the leading cause of cognitive decline, characterized as a neurodegenerative process associated with aging. Among the reasons noted this pathology can cite oxidative stress, abnormal metabolism of amyloid precursor protein leading to the formation of beta-amyloid peptide which has owned self-aggregating, containing 42 amino acid residues, leading to the formation neurotoxic oligomers and fibrils constituting the senile plaques. According to the literature, the formation of these plates is dependent on copper and zinc ions which are in high concentrations in the Central Nervous System (CNS), in the cases of Alzheimer's disease. The therapeutic armamentarium available to treat AD, consists of acetylcholinesterase inhibitors and antagonists of N-methyl-D-aspartate, which improves the symptoms. The development of pharmaceuticals based metal chelating effect has been gaining attention since it has been demonstrated the involvement of copper and zinc in the formation of oligomers and fibrils of beta-amyloid peptide. Results obtained in our laboratory showed that levofloxacin inhibits aggregation and fibril formation of amyloid-beta peptide containing 42 amino acid residues. However, the passage through this barrier fluoroquinolone is hampered by the highly lipophilic nature of the latter. In this work, we developed a liposomal formulation based on phosphatidylcholine and cholesterol for levofloxacin, whose percentage of encapsulation was 78%. The methodology for the preparation of the liposome lipid film was dried after removal of the solvent by evaporation. The particles 90 nm in size were obtained using a high pressure homogenizer. A study on a model of the blood brain barrier comprising NG97 cells demonstrated that the formulation is capable of crossing the barrier with a model that mimics the Blood-Brain Barrier (BBB). Based on these results, levofloxacin is as a candidate for repositioning drug to treat AD.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia.....	2
1.2. Características fisiopatológicas	3
1.2.1. Hipótese da cascata β -amilóide	6
1.2.1.1. O processamento da proteína precursora do amilóide (PPA)	6
1.2.1.2. O peptídeo β -amilóide ($A\beta$)	8
1.2.2. Hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal	10
1.2.3. Hipótese colinérgica	11
1.3. Diagnóstico.....	12
1.4. Tratamento	12
1.5. Estresse oxidativo e o papel dos metais na Doença de Alzheimer	14
1.6. As fluorquinolonas	16
1.7. Pró-fármacos (sistemas especiais de liberação).....	19
1.7.1. Geral.....	19
1.7.2. Critérios ideais para transportadores	19
1.8. Lipossomas	20
1.8.1. Características dos lipossomas	20
1.8.2. Classificação dos lipossomas.....	21
1.8.3. Preparação dos Lipossomas	22
1.8.4. Farmacocinética	23

1.8.5. Utilização do lipossoma	24
2. JUSTIFICATIVAS	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivos gerais.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1. Reagentes	32
4.2. Caracterização físico-química do Levofloxacino	32
4.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de Levofloxacino	33
4.4. Preparação das formulações lipossomais	34
4.4.1. Geral.....	34
4.4.2. Desenvolvimento da metodologia de preparação das formulações lipossomais.....	35
4.4.2.1. Preparação da dispersão lipídica (Etapas A e B)	35
4.4.2.2. Etapa C - Hidratação do filme lipídico e incorporação do levofloxacino ...	36
4.4.2.3. Etapa D - Uniformização do tamanho dos lipossomas	36
4.4.2.4. Etapa E - Retirada do levofloxacino não encapsulado	37
4.4.3. Metodologia final de preparação das formulações lipossomais	38
4.5. Caracterização físico-química da formulação lipossomal.....	39
4.5.1. Medidas de tamanho de vesícula lipossomal.....	39
4.5.2. Potencial Zeta	40
4.5.3. Análise por Microscopia de Transmissão	41
4.5.4. Análise de RMN de Fluor	41
4.5.6. Teste de citotoxicidade.....	42
4.5.7. Estudo de passagem da formulação lipossomal pelo Modelo de Barreira que mimetiza a BHE.....	43
4.5.7.1. Quantificação das amostras após passagem da formulação lipossomal pelo Modelo de Barreira que mimetiza a BHE.....	45

4.5.8. Teste de estabilidade quanto ao tamanho da vesícula lipossomal.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Caracterização do Levofloxacino	48
5.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	48
5.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de RMN – ^{13}C	49
5.1.3. Espectroscopia no Infravermelho	50
5.1.4. Espectrometria de Massas	50
5.1.5. Ensaio de citotoxicidade in vitro de Levofloxacino	51
5.2. Obtenção da formulação lipossomal	51
5.2.1. Etapa de preparação da dispersão lipídica e formação do filme lipídico.....	51
5.2.2. Solução de hidratação e incorporação do Levofloxacino ao lipossoma	57
5.2.3. Etapa de uniformização de tamanho das vesículas lipossomais.....	63
5.2.4. Lavagem das partículas de lipossomas para retirada do levofloxacino não encapsulado	67
5.3. Caracterização dos lipossomas.....	70
5.3.1. Medidas de tamanho das vesículas lipossomais.....	71
5.3.2. Potencial Zeta	74
5.3.4. Microscopia de Transmissão (MET).....	75
5.3.5. Análise por RMN de Fluor	76
5.3.6. Eficiência de encapsulamento do Levofloxacino	78
5.3.7. Teste de citotoxicidade.....	79
5.3.8. Estudo <i>in vitro</i> em modelo de barreira que mimetiza BHE	80
5.3.9. Quantificação por HPLC das amostras estudadas <i>in vitro</i> pelo modelo de barreira hemato-encefálica.....	85
5.3.10. Estabilidade do lipossoma frente ao seu tamanho	87
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8. ANEXOS	105

8.1. Espectro de RMN – ^1H do Levofloxacino (250 MHz, CDCl_3).....	106
8.2. Espectro de RMN- ^{13}C do Levofloxacino em (62,5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	107
8.3. Espectro de infravermelho (KBr , cm^{-1}) do Levofloxacino.....	108
8.4. Espectro de Massas (baixa resolução) do levofloxacino: amostra (superior), padrão (inferior).....	109
8.5. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal sem a redução do tamanho da vesícula, logo após o momento de hidratação	110
8.6. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal da formulação obtida através da redução do tamanho das vesículas por Mini extrusora, membrana de 400 nm	110
8.7. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal da formulação obtida através da redução do tamanho das vesículas por Extrusora a vácuo, membrana de 100 nm	111
8.8. Distribuição de Tamanho de vesícula lipossomal obtida pelos processos ML_E para a formação do filme lipídico seco, método ML_08 para a etapa de hidratação do filme lipídico e incorporação do Levofloxacino e método ML_11.3 para a redução do tamanho das vesículas lipossomais	112
8.9. Potencial Zeta – Formulação lipossomal.....	113
8.10. Potencial Zeta – Lipossomas vazios	113
8.11. Espectro de RMN-19F do Levofloxacino em D_2O . Em destaque o número de varreduras realizadas (NS = 8)	114
8.12. Espectro de RMN-19F da formulação em D_2O . Em destaque o número de varreduras realizadas (NS = 128)	115
8.13. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total da amostra LP_30	116
8.14. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total da amostra LP_31	117
8.15. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total de amostra LP_32	118
8.16. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total de amostra LP_33	119

8.17. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino não encapsulado na formulação LP_30	120
8.18. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino livre na formulação LP_31	121
8.19. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino livre na formulação LP_32	122
8.20. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino livre na formulação LP_33	123
8.21. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 1 hora do teste da barreira	124
8.22. Teste Modelo de Barreira- Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 1 hora do teste da barreira	125
8.23. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 3 horas do teste da barreira	126
8.24. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 3 horas do teste da barreira	127
8.25. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 8 horas do teste da barreira	128
8.26. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma da amostra retirada do inserto - tempo de 8 horas do teste da barreira	129
8.27. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 24 horas do teste da barreira	130
8.28. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 24 horas do teste da barreira	131
8.29. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após o término da redução da vesícula lipossomal por Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos) - Tempo zero.....	132
8.30. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 3 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)	133

8.31. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 10 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)	134
8.32. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 20 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)	135
8.33. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 30 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)	136

Dedico essa dissertação

A toda minha família que sempre me apoiou, torceu por mim e acreditou que tudo fosse dar certo, mesmo nos momentos mais difíceis. Em especial aos meus pais, Neusa Aparecida Rossi e Valdemir Rossi, motivo de minha existência e caráter, a vocês, o meu muito obrigado por proporcionar o maior conhecimento que uma pessoa possa ter, que é Deus, meu bem mais precioso. Ao meu querido irmão Denis Rossi, espelho de determinação e perseverança. A minha amada sobrinha Raíssa Rossi, por todo o carinho derramado sobre minha vida e ao meu eterno amor Alan Scassa Teixeira por sempre estar ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos. Amo muito vocês!!!!

Agradecimentos

À Deus, meu bem maior, minha fonte de vida e esperança! Obrigada por ser o meu Senhor e permitir que esse sonho fosse realizado!!!

À Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida, pelo aceite nessa difícil jornada. Sobretudo pela compreensão, paciência, confiança, apoio e amizade. Obrigada por tudo! Serei eternamente grata e levarei comigo todos os ensinamentos e a ética ao se trabalhar.

Aos colegas do Instituto Vita Nova, pessoas grandiosas com as quais tenho honra de poder dividir conhecimentos.

À Débora Biloti, por toda amizade, confiança, paciência, incentivo e por ter acreditado em meu potencial, a você, o meu muito obrigado, serei sempre grata e levarei para sempre seus ensinamentos!!!

Aos colegas do LAFAME, Renan, Gisele, Caio, Gustavo, Gabi, obrigada a todos pelos agradáveis momentos de convivência no Lab.

À Paula um agradecimento especial, por toda a ajuda e paciência despendida em meu favor. Ah, não poderia deixar de agradecer todas as caronas, rrsrs, não sei como faria para ir a UNICAMP sem sua ajuda!!! Muito obrigada!!!!

Aos meus pais, por não medirem esforços para que esse sonho fosse realizado, serei eternamente grata por toda a ajuda, incentivo e paciência em me esperar no carro durante as aulas teóricas.

Ao meu querido irmão, por toda amizade, apoio e incentivo desde que inicie meus estudos.

A minha princesa Raíssa, por compreender todas as vezes que tive que me ausentar, mesmo sem entender o do porque tenho que estudar tanto....rsrsrsrs...

Ao meu grande amor, sobretudo por ter insistido em que eu fizesse minha inscrição no processo seletivo, pela paciência de ficar ao meu lado sempre, aguentando meus choros...pelo forte incentivo nos momentos que pensei em desistir desse sonho...por me buscar tarde da noite na Unicamp sempre com um sorriso...por ser compreensivo nos momentos em que me ausentei. Enfim, não tenho palavras para agradecer o que fez e faz por mim. Você é o melhor presente que Deus poderia ter me concedido, TE AMO MUITO!!!!

Aos professores, são muitos, que contribuíram para o aprendizado desde o ensino fundamental, sendo solícitos sempre em dividir os conhecimentos. Em especial, gostaria de agradecer a enorme ajuda do Prof. Marcelo Lancellotti (IB), que muito contribuiu para este trabalho.

A Rafaella (IB), Carlos Leite (Microscopia), Ricardo (HPLC) meu muito obrigado por toda a dedicação e paciência nos ensaios realizados.

A todos os mencionados acima e àqueles que por ventura tenham sido esquecidos, o meu muito obrigado!!!! Todos, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. Mais um sonho realizado, mais uma etapa cumprida!

Aos membros da pré-banca Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber (FCM), Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (IB) e Profa. Dra. Patrícia Moriel (FCM) pela leitura e sugestões para o enriquecimento do trabalho.

À EMS/SA pelas amostras de levofloxacino.

À FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Envelhecimento progressivo da população mundial.	3
Figura 2: Comparação entre cérebro normal e cérebro com DA.....	4
Figura 3: Placas senis (extracelulares) e emaranhadas neurofibrilares (intracelulares).....	5
Figura 4: O processamento da PPA pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica.	7
Figura 5: As secretases (β e α) e a geração do peptídeo $A\beta$	8
Figura 6: O processo de fibrilogênese do peptídeo $A\beta$	9
Figura 7: O processo de fibrilogênese do peptídeo $A\beta$	10
Figura 8: A proteína tau, constituinte dos microtúbulos neuronais e causando a sua desestabilização após a hiperfosforilação formando os emaranhados neurofibrilares.....	11
Figura 9: Peptídeo $A\beta_{42}$ e seus sítios de interação com metais.	15
Figura 10: Estrutura do clioquinol (A) e hidroxipiridinonas (B).....	16
Figura 11: Estrutura do ácido nalidíxico	16
Figura 12: Estrutura do Levofloxacino.....	17
Figura 13: Levofloxacino complexado com cátion divalente	18
Figura 14: Estrutura lipossomal.....	21
Figura 15: Fluxograma da preparação da formulação lipossomal contendo levofloxacino encapsulado	34
Figura 16: Esquema de cada poço com inserto da placa de co-cultura.	44
Figura 17: Foto de um filme descontínuo.	54
Figura 18: Fotografias relativas às 3 etapas do procedimento ML_D obtendo um filme homogêneo.....	56
Figura 19: Fotografias tiradas no momento da Hidratação. A mostra o momento da hidratação e a B mostra o final da hidratação.	62
Figura 20: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Amostra preparada através do processo ML_15, A amostra do	

sobrenadante da primeira lavagem, B amostra do sobrenadante da segunda lavagem e C amostra do sobrenadante da terceira lavagem.	68
Figura 21: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Amostras preparadas através dos processos ML_16 e ML_17. A amostra do sobrenadante da primeira lavagem, B amostra do sobrenadante da segunda lavagem e C amostra do sobrenadante da terceira lavagem.	69
Figura 22: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. A amostra de ativo livre eluído com metanol; F amostra de formulação lipossomal eluído com tampão fosfato; M metanol e T tampão fosfato.	70
Figura 23: Imagens da Microscopia de Transmissão da formulação lipossomal varridas em diversas posições do stub. A - Imagem em maior aumento da vesícula lipossomal; B – Imagem de alguns lipossomas colapsados; C e D – Imagem da parte externa da vesícula lipossomal.	75
Figura 24: Espectros combinados de RMN- ¹⁹ F em D ₂ O do Levofloxacino (em vermelho) e da formulação contendo o levofloxacino (azul)	77
Figura 25: Modelo de barreira que mimetiza a BHE.....	81
Figura 26: Modelo mimético de BHE, na forma sanduíche	82
Figura 27: Fotografia dos eppendorfs com os conteúdos e insertos (0 h) e dos poços (8 h) visualizados ultravioleta 365 nm.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo da proporção dos constituintes da formulação	35
Tabela 2: Resultados dos deslocamentos químicos do RMN – ^1H em DMSO- d_6 ..	49
Tabela 3: Resultados dos deslocamentos químicos do RMN – ^{13}C em DMSO- d_6	50
Tabela 4: Proporções e parâmetros estudados	53
Tabela 5: Estudo dos parâmetros e proporção dos constituintes no momento da hidratação do filme lipídico	58
Tabela 6: Processos estudados para redução do tamanho das vesículas lipossomais e seus respectivos tamanhos de partículas obtidos	63
Tabela 7: Parâmetros estudados para redução do tamanho de vesícula lipossomal através do método de Homogeneização de alta pressão	66
Tabela 8: Estudo de tempo versus velocidade de rotação para retirada de Levofloxacino não encapsulado	68
Tabela 9: Principais características de métodos para determinação de tamanho de partículas	72
Tabela 10: Porcentagem de Levofloxacino não encapsulado	78
Tabela 11: Quantificação da amostra LP_14 obtida no teste de barreira	86
Tabela 12: Tamanhos das vesículas lipossomais no período de 30 dias para estudo de estabilidade	88

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM: microscopia de força atômica
ALs : anestésicos locais
ANUC: ultracentrifugação analítica
A β : peptídeo β -amilóide
A β_{42} : peptídeo β -amilóide com 42 resíduos de aminoácidos
BHE: Barreira Hemato-Encefálica
CE: eletroforese capilar
DA: Doença de Alzheimer
DI: domínio intracelular
DMSO-d₆: dimetilsulfoxido deuterado
DNA: ácido desoxiribonucleico
DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura
FCT: fragmentos carboxi terminais
FFF: fracionamento por fluxo em campo
GOV: vesículas oligolamelares gigantes
GUV: vesículas unilamelares gigantes
HDL: lipoproteínas plasmáticas de alta densidade
Hec-1B: adenocarcinoma de endometriose humano
His6: 6 resíduos de histidina
His14: 14 resíduos de histidina
HLB: hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HPLC: High-performance liquid chromatography
I-AChE :inibidores da acetilcolinesterase
IRM: imagem por ressonância magnética
ISO: International Standard Organization
IV: Espectroscopia no Infravermelho
LLD: difração de luz laser
LOV: vesículas oligolamelares grandes
LP: Formulação lipossomal

LS: espelhamento de luz
LUV: Vesículas Unilamelares Grandes
Met35: resíduo de metionina
MIC: concentração inibitória mínima
ML: Método Lipossomal
MLV: vesículas multilamelares
m/m: razão massa/massa
MUV: vesículas unilamelares médias
m/v: razão massa/volume
NMDA: N-metil-D-aspartato
OLV: vesículas oligolamelares
P.A: Para análise
PCH: hidrodinâmica de coluna empacotada
PDI: índice de polidispersividade
PEG: polietilenoglicol
PPA: proteína precursora do amilóide
RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RNA: ácido ribonucléico
rpm: rotações por minutos
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
SEC: cromatografia por exclusão de tamanho
SEM: microscopia eletrônica de varredura
SFB: soro fetal bovino
SMD: mean diameter size
SNC: Sistema Nervoso Central
SOV: vesículas oligolamelares pequenas
sPPA α : fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela α -secretase
sPPA β : fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela β -secretase
SUV: Vesículas Unilamelares Pequenas
TEM: microscopia eletrônica de transmissão
TEP: tomografia de emissão de pósitron

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência

UV: ultra violeta

VMD: diâmetro médio de volume

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez há um século atrás, e é a principal causa de demência em população geriátrica (HEBERT, *et.al.*, 2003, NAZEM, *et.al.*, 2008).

A DA é a doença neurodegenerativa mais comum que afeta diretamente cerca de 10% da população com até 65 anos e cerca de 50% com até 85 anos (GAGGELLI, *et.al.*, 2006). Foi descoberta em 1906 pelo médico Alois Alzheimer, (ALZHEIMERMED, 2013) sendo sua manifestação gradual, com um progressivo e irreversível declínio cognitivo (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

1.1. Epidemiologia

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA (ABBOTT, 2013). Em 1950, havia 214 milhões de pessoas com 60 anos ou mais. Atualmente, 11% da população mundial já atingiram esse patamar. Na Figura 1 temos um gráfico representativo do envelhecimento populacional. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2025, 1,2 bilhões de pessoas com mais de 60 anos, estarão afetadas pela doença (ALZHEIMERMED, 2013).

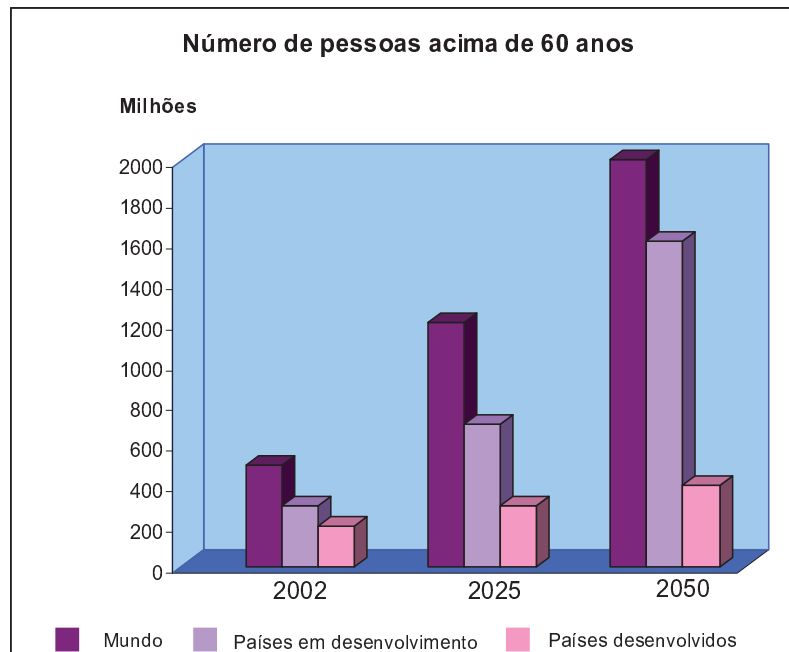


Figura 1: Envelhecimento progressivo da população mundial (Adaptado ALZHEIMERMED, 2013).

De acordo com a Associação de Alzheimer, mais de 5,4 milhões de americanos apresentam os sintomas da doença. Estima-se que, no Brasil, a DA afete 1,2 milhão de pessoas. (ALZHEIMERMED, 2013; ABBOTT, 2013) Por ser uma doença cerebral degenerativa devastadora, seu custo anual para a economia dos EUA é superior a 180 bilhões de dólares e acredita-se que até 2050 mais de 115 milhões de pessoas em todo o mundo estarão vivendo com a doença. Infelizmente, mesmo após várias décadas de pesquisa nesta área, muitos dos fármacos aprovados para o seu tratamento somente atenuam os sintomas e apresentam pouco efeito sobre a progressão da doença (ABBOTT, 2013).

1.2. Características fisiopatológicas

O principal agente de risco em doenças neurodegenerativas é a idade e está diretamente ligada ao stress oxidativo (peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, oxidação DNA e RNA) (CHEOW, 2010).

As regiões cerebrais mais comprometidas são aquelas associadas às funções mentais superiores, tais como o aprendizado, memória e comportamento emocional. Particularmente, o córtex frontal e o hipocampo são os mais comprometidos pelas alterações bioquímicas referentes à patologia (ALZ, 2013). Uma de suas características mais marcantes é a perda difusa de neurônios (ZATTA, *et.al.*, 2009) que culmina com uma significativa diminuição do tecido cerebral, conforme mostrado na Figura 2.



Figura 2: Comparação entre cérebro normal e cérebro com DA (Adaptado de ALZ, 2013).

A DA é uma doença extremamente complexa e seus mecanismos patogênicos ainda não foram completamente elucidados. Os dois principais achados morfológicos relacionados à DA são as placas senis ou neuríticas e os emaranhados neurofibrilares (Figura 3). As placas senis são formadas pela deposição extracelular de fibrilas do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e os emaranhados neurofibrilares, por agregados intraneuronais de proteína tau hiperfosforilada (ALZHEIMERMED, 2013) Estes achados morfológicos conduziram à elaboração as principais hipóteses que tentam explicar a patogênese da DA: a hipótese da cascata β -amilóide, a hipótese colinérgica e a hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal (GAGGELLI, *et.al.*, 2006; KUNG, 2012).

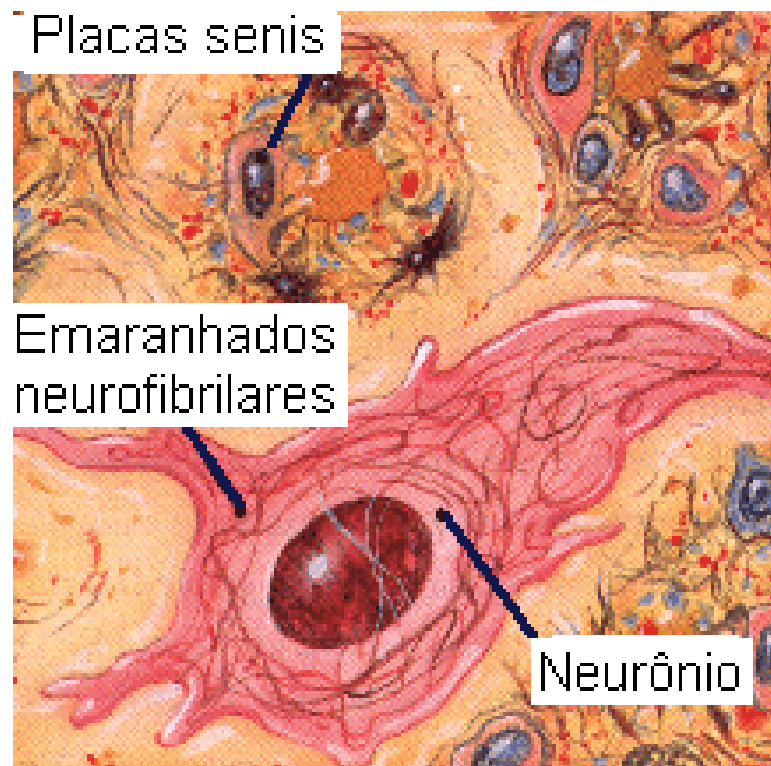


Figura 3: Placas senis (extracelulares) e emaranhadas neurofibrilares (intracelulares) (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2013).

Os cátions metálicos são cruciais para a vida, porém tem sido evidenciado que eles também estão envolvidos nos danos neurais de doenças neurodegenerativas como a DA, pois, foram relatadas concentrações elevadas desses metais em vários locais do cérebro de pacientes com Alzheimer em comparação com indivíduo de mesma idade que não apresenta a doença (GAETA, 2005).

Há fortes evidências de uma relação entre estresse oxidativo e o depósito cortical de β -amilóide. Essa correlação parece depender das propriedades físico-químicas do β -amilóide, que são coerentes com a atividade antioxidante e pró-oxidante. O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade das células de defesa de acionar

mecanismos de proteção, que envolvem enzimas como a superóxido dismutase e catalase, além do tripeptídeo glutatona (CHEOW, 2010). Quando este desequilíbrio ocorre, as biomoléculas modificadas oxidativamente (proteínas, lipídeos e nucleotídeos) perdem a sua função e acumulam-se no compartimento celular. No caso de células muito sensíveis, como neurônios, a falta de controle de sistemas de defesa pode levar a morte celular (CHEOW, 2010).

1.2.1. Hipótese da cascata β -amilóide

A identificação do peptídeo A β nas placas senis extracelulares, por meio de análises histológicas *post mortem* em cérebros de pacientes com DA, levantou a hipótese de que este evento pudesse estar relacionado ao desencadeamento da patologia. Segundo esta hipótese, a neurodegeneração na DA começa com o processamento anormal da proteína precursora do amilóide (PPA), discutido a seguir, e resulta na produção, agregação e deposição do peptídeo A β . Aparentemente, a cascata amilóide pode facilitar a formação dos emaranhados neurofibrilares e a morte celular (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

1.2.1.1. O processamento da proteína precursora do amilóide (PPA)

O peptídeo A β é gerado extracelularmente a partir da clivagem de uma proteína transmembrânica chamada proteína precursora de amilóide (PPA), que é expressa no organismo em condições fisiológicas normais. A PPA pode apresentar 695, 751 e 770 resíduos de aminoácidos, sendo que a proteína de 695 aminoácidos é predominantemente expressa nos neurônios (GUO, *et.al.*, 2012). O processamento proteolítico da PPA é feito por duas proteases conhecidas como β e γ -secretases). Em condições não patológicas, além da γ , outra secretase predomina (α -secretase), que é considerada não amiloidogênica, uma vez que os resíduos formados não levam à formação do peptídeo A β_{42} (PROX, *et.al.*, 2012). Na DA, ou a expressão da β -secretase está aumentada ou a depuração dos fragmentos insolúveis está comprometida. Os peptídeos amiloidogênicos

apresentam de 39-43 resíduos de aminoácidos e são os principais constituintes das placas senis e depósitos amilóides cerebrovasculares havendo, entretanto, a predominância do resíduo de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) (PRICE, *et al.*, 2009).

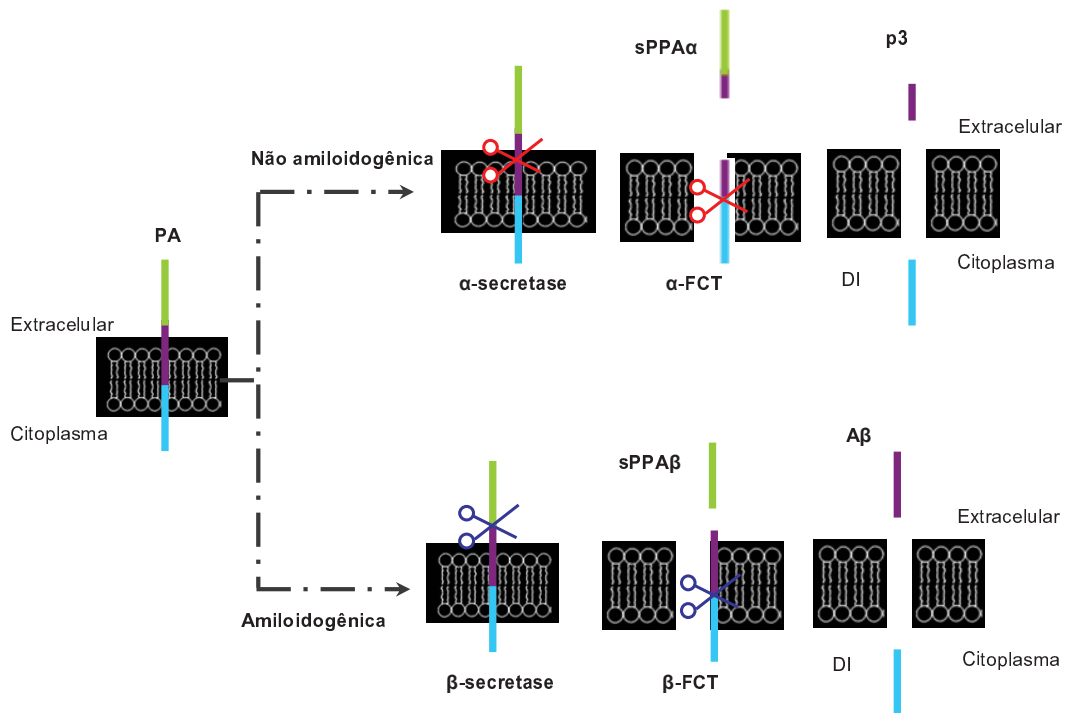


Figura 4: O processamento da PPA pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica (Adaptado de WILQUET, *et. al.*, 2004).

A α -secretase, membro da família das metaloproteases, e a β -secretase também conhecida como BACE, uma aspartil protease ligada à membrana, clivam o domínio extracelular N-terminal da PPA, liberando os fragmentos solúveis sPPA α e sPPA β (Figura 4)(GAGGELLI, *et.al.*, 2006). Os fragmentos sPPA α parecem apresentar atividade neurotrófica e sinaptogênica, enquanto que os fragmentos sPPA β parecem apresentar atividade sinalizadora (GUO, *et.al.*, 2012). A γ -secretase finalmente cliva fragmentos carboxi terminais (FCT) do domínio transmembrana da PPA (Figura 5), liberando o fragmento p3 e o peptídeo A β ,

respectivamente, para o meio extracelular e o domínio intracelular da PPA (DI) para o citoplasma (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

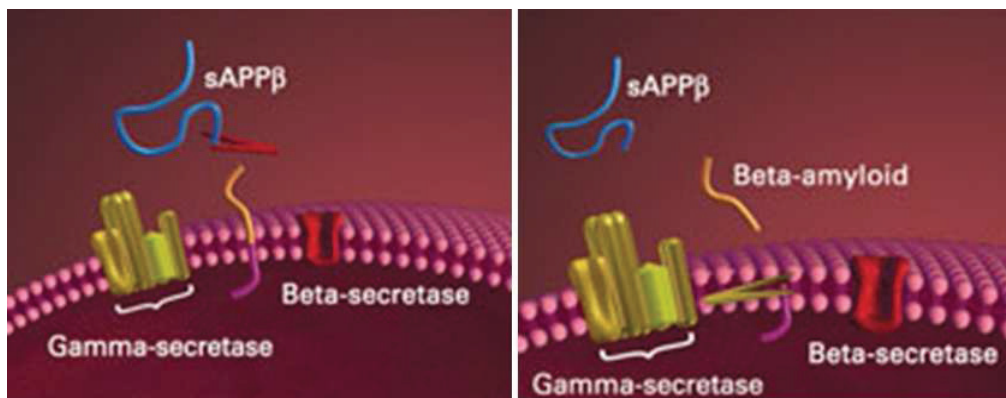


Figura 5: As secretases (β e γ) e a geração do peptídeo A β (NATIONAL INSTITUTE OF AGING).

A evidência mais forte de que o processamento proteolítico anormal e o aumento na geração de A β são cruciais para o processo patológico vem de estudos de formas raras hereditárias da DA. Mutações na PPA e nas presenilinas, as proteínas do núcleo do complexo γ -secretase, afetam a geração do peptídeo A β , sua agregação, ou degradação. Além disso, todas as mutações identificadas em PPA são agrupadas em torno dos três sítios de clivagem das secretases (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

1.2.1.2. O peptídeo β -amilóide (A β)

O peptídeo A β_{42} , além de ser particularmente tóxico às células nos estágios iniciais do processo de agregação, possui uma atividade fibrilogênica. É descrito na literatura que oligômeros de A β_{42} inibem a viabilidade neuronal 10 vezes mais do que fibrilas e 40 vezes mais do que o peptídeo não agregado, com A β_{42} oligomérico promovendo inibição significativa a 10 nmol/L (DAHLGREN, *et.al.*, 2002).

O processo de fibrilogênese ocorre em cascata e envolve estruturas intermediárias. Primeiramente, o peptídeo coalesce e forma pequenos oligômeros que se agregam produzindo grupamentos de alto peso molecular, chamados de protofibrilas (Figura 6 e 7). Estas, eventualmente excedem o limite de solubilidade e depositam na forma de fibrilas (GAETA, 2005).

A presença de fibrilas do peptídeo A β ₄₂ desencadeiam uma resposta inflamatória da microglia, resultando na produção de citocinas inflamatórias e ativação de mastócitos (RAPOPORT, *et. al.*, 2011; JIN, *et. al.*, 2013; LEE, *et.al.*, 2012).

A neurotoxicidade do peptídeo A β está relacionada principalmente aos intermediários oligoméricos solúveis se comparada às fibrilas amilóides (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).



Figura 6: O processo de fibrilogênese do peptídeo A β (Adaptado de WILQUET, *et.al.*, 2004).

As placas senis, um dos marcadores da DA, são formadas de agregados fibrilares de peptídeo A β . Esta “hipótese da cascata amilóide” pressupõe que a neurodegeneração começa com o processamento anormal da PPA, resultando na produção, agregação e deposição do peptídeo A β (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

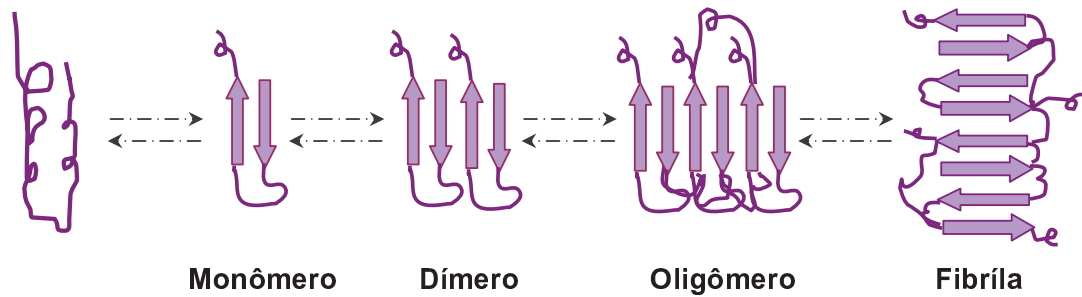


Figura 7: O processo de fibrillogênese do peptídeo A β (Adaptado de HUBER, 2012).

O peptídeo A β adota várias conformações, das aleatórias às folhas- β e α -hélices em solução, o que torna difícil o planejamento de inibidores baseados na estrutura sua tridimensional. A cascata de agregação do peptídeo A β envolve a transição de conformações aleatórias para folhas- β . Muitos estudos *in vitro* a respeito da fibrillogênese do peptídeo A β tem indicado que a transição estrutural de α -hélice para folha- β pode desempenhar papel fundamental na formação de fibrilas amilóides (WILQUET, *et. al.*, 2004; EVANS , *et.al.*, 2006; CHEN, *et.al.*, 2006).

1.2.2. Hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal

A observação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, bem como a identificação de fragmentos hiperfosforilados da proteína tau como parte destas estruturas, suportou a hipótese de que a sua formação pudesse estar envolvida na patogênese da DA (Figura 8). De acordo com esta hipótese, as alterações do citoesqueleto são os principais eventos que levam à neurodegeneração na DA, como a hiperfosforilação e agregação da proteína tau relacionados à ativação de processos de morte celular (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

O papel fisiológico da proteína tau consiste em controlar a montagem dos microtúbulos neuronais proporcionando um elemento essencial para a estabilização do citoesqueleto neuronal. Este citoesqueleto é um sistema

chave para manter a integridade estrutural e o transporte axonal. Na DA, a hiperfosforilação da proteína tau promove a desorganização dos microtúbulos e a formação dos emaranhados neurofibrilares, processo adicional ligado à morte neuronal (ALZ, 2013).

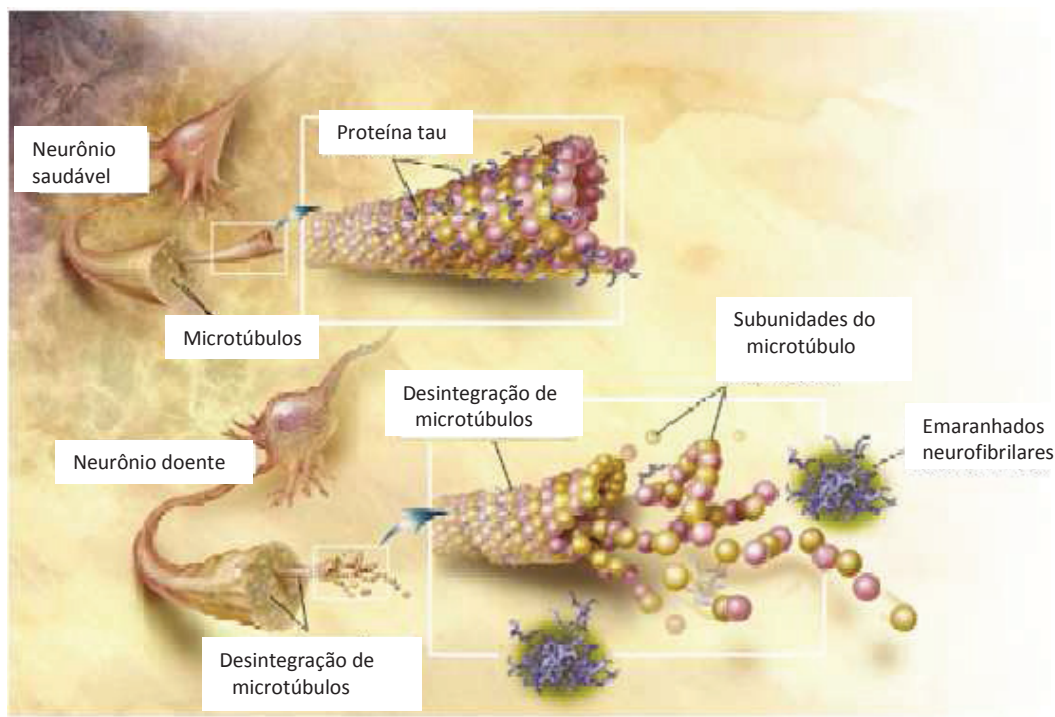


Figura 8: A proteína tau, constituinte dos microtúbulos neuronais e causando a sua desestabilização após a hiperfosforilação formando os emaranhados neurofibrilares (HUBER, 2012).

1.2.3. Hipótese colinérgica

A acetilcolina é um neurotransmissor associado ao processo cognitivo, incluindo memória e aprendizado, e foi observado que há um déficit deste neurotransmissor na DA. De acordo com a “hipótese colinérgica”, o início da DA se daria pela disfunção dos neurônios colinérgicos presentes no cérebro,

contribuindo para o declínio cognitivo observado nos pacientes com DA e na demência senil não-Alzheimer (GAGGELLI, *et.al.*, 2006).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico provável da DA é realizado principalmente através de testes clínicos, enquanto que o diagnóstico definitivo só pode ser realizado por meio de exame histopatológico do tecido cerebral, obtido por biópsia ou após a morte por necropsia (ALZHEIMERMED, 2013; BIBL, *et.al.*, 2008).

Ao longo das últimas décadas, ocorreu um grande avanço no diagnóstico da DA. Atualmente, centros norte americanos especializados na doença são capazes de fazer o diagnóstico rotineiramente, com precisão de 90%. Entretanto, o desafio ainda é bastante grande nas tentativas de se conseguir fazer o diagnóstico precoce da doença, ainda na sua fase assintomática. Seguindo este raciocínio, agentes terapêuticos capazes de modificar o estado de doença serão eficazes, provavelmente, nos estágios iniciais da DA. Portanto, alcançar o sucesso no diagnóstico precoce será importante e dependerá, em última análise, de encontrar biomarcadores adequados para a DA (CARRILLO, *et.al.*, 2009). Neste sentido, muitas pesquisas em amostras biológicas como sangue e líquido cefalorraquidiano, na tentativa de encontrar marcadores e alelos de risco da doença, vêm sendo desenvolvidas. Além disso, o aperfeiçoamento de modalidades de imagem incluindo a imagem do peptídeo A β com tomografia de emissão de pósitron (TEP) e imagem por ressonância magnética (IRM) também são alvo de pesquisas (BIBL, *et.al.*, 2008).

1.4. Tratamento

Ainda não existem no arsenal terapêutico, medicamentos efetivos contra a DA, devido tanto à natureza multipatogênica da doença, quanto ao fato de não haver ainda um método de diagnostico precoce. Os fármacos disponíveis no

mercado que são utilizados no tratamento desta patologia são apenas atenuantes dos sintomas apresentados. Esta farmacoterapia pode ser dividida em:

- **terapêutica específica**, que tem como objetivo reverter processos fisiopatológicos que conduzem à morte neuronal e à demência;
- **abordagem profilática**, que visa retardar o início da demência ou prevenir o declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado o processo;
- **tratamento sintomático**, que visa restaurar, ainda que parcial ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência;
- **terapêutica complementar**, que busca o tratamento das manifestações não cognitivas da demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono.

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia da DA, a terapêutica e o diagnóstico precoce permanecem um desafio.

Os efeitos dos fármacos hoje aprovados no tratamento da DA limitam-se ao retardo na evolução natural da doença, permitindo apenas uma melhora temporária do estado funcional do paciente (FORLENZA, 2005).

Os inibidores da acetilcolinesterase (I-AChE), galantamina e donepezila, são os principais fármacos hoje licenciados para o tratamento da DA. Seu uso baseia-se no pressuposto déficit colinérgico que ocorre na doença, conforme discutido no item 1.2.3, e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina através da inibição de sua enzima hidrolítica. A acetilcolinesterase apresenta também outro sítio importante para interação com ligantes. Este sítio é conhecido como sítio periférico ou aniônico e tem sido apontado como um local onde ocorre a organização das fibrilas, no processo de fibrilogênese, dando a esta enzima uma característica de chaperona. A donepezila é um inibidor duplo da acetilcolinesterase, pois se liga aos sítios catalítico e aniônico, através de interações hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio com resíduos de triptofano (W86 e W 286) (KRYGER, *et.al.*, 1999). Infelizmente, fatores farmacogenéticos são responsáveis por uma resposta heterogênea aos I-AChE, sendo que alguns

pacientes beneficiam-se muito, enquanto que para outros, a melhora observada é muito discreta (TAYEB, *et.al.*, 2012).

Outro fármaco usado no tratamento da DA é a Memantina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que é um dos receptores para o glutamato, principal neurotransmissor excitatório cerebral. Quando este neurotransmissor está em excesso no cérebro, há ativação crônica destes receptores que promovem extensivo influxo de cálcio para o neurônio. Como consequência, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular. Na doença de Alzheimer, foi comprovado que há alterações nas concentrações deste neurotransmissor. Assim, a Memantina age impedindo que o excesso de glutamato ative estes receptores (ALZHEIMERMED, 2013; ABBOTT, 2013; FORLENZA, 2005).

1.5. Estresse oxidativo e o papel dos metais na Doença de Alzheimer

Acredita-se que o estresse oxidativo tenha papel importante na DA. O mesmo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a habilidade da célula em se defender contra eles. Este desequilíbrio na homeostase de espécies pró-oxidantes e antioxidantes resulta na produção de várias espécies potencialmente tóxicas, que participam na iniciação e/ou propagação de reações radicalares em cadeia (CONTESTABILE, 2001). No caso particular de células sensíveis como os neurônios, esta perda de controle dos sistemas de defesa pode levar à morte celular (MINEUR, 2008).

O peptídeo A β apresenta sítios de coordenação para Zn²⁺ e Cu²⁺. Os dois resíduos de histidina (His₆ e His₁₄) localizados na parte N-terminal do peptídeo A β ₄₂ e um resíduo de metionina (Met₃₅) na região C-terminal, tem sido apontado como regiões fundamentais para ligação com o íon metálico conforme ilustrado na Figura 9. Os resíduos de histidina mencionados ligam-se ao cobre, enquanto a metionina parece estar envolvida com a redução do cobre e geração de peróxido de hidrogênio. O processo de formação de fibrilas A β *in vivo* é dependente da interação destes metais com o peptídeo (CONTESTABILE, 2001).

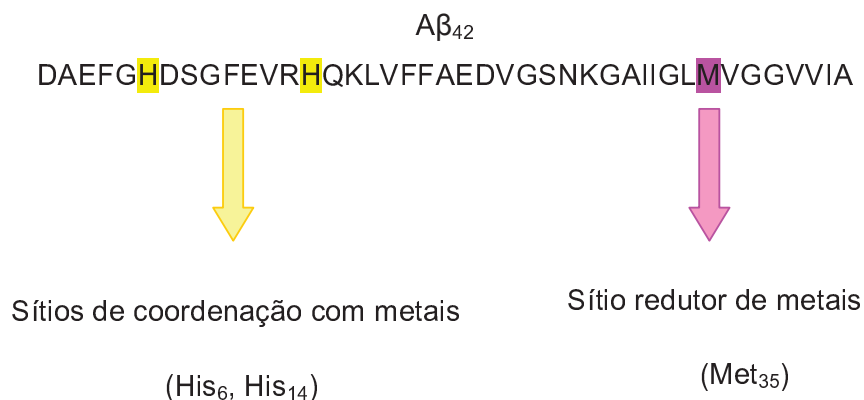


Figura 9: Peptídeo $A\beta_{42}$ e seus sítios de interação com metais.

O cérebro é um órgão especializado que normalmente concentra cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) no neocórtex. O desequilíbrio de íons metálicos no organismo é um co-fator bem conhecido em várias desordens neurodegenerativas. Os metais são essenciais para a vida e tem papel central em muitas vias bioquímicas. O seu desequilíbrio, especialmente no caso de Cu^{2+} e Zn^{2+} , tem atraído o interesse na investigação da etiologia de uma variedade de condições neurodegenerativas e, em particular, a patogênese da DA (ALZ, 2013). Dados recentes indicam que a homeostase destes íons metálicos está intimamente associada a DA, (ABBOTT, 2013) existindo relatos de que a deposição destes metais nos cérebros de pacientes com DA, em concentrações de três a cinco vezes maiores do que o controle (ALZ, 2013; NATIONAL INSTITUTE OF AGING).

Uma das atuais estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos na pesquisa para a DA visa interferir no acúmulo de íons metálicos, principalmente Cu^{2+} e Zn^{2+} . Para tanto, quelantes metálicos seriam compostos potenciais para estas pesquisas. Dentre estes, podemos citar o clioquinol (Figura 10), protótipo de um composto que concluiu a fase clínica II para DA (PBT 2 – estrutura em sigilo), (TAYEB, *et.al.*, 2012; ALZFORUM, 2012). Compostos da classe das hidroxipiridinonas (Figura 10 – B), também tem sido importantes protótipos para o desenvolvimento de potenciais fármacos para a DA baseados na estratégia de complexação de metais (GOTTSCHALDT, *et.al.*, 2013).

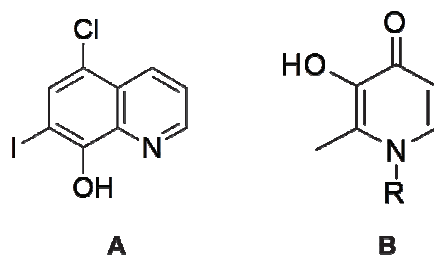


Figura 10: Estrutura do clioquinol (A) e hidroxipiridinonas (B)

1.6. As fluorquinolonas

As fluorquinolonas apresentam interações medicamentosas quando co-administradas com antiácidos e fármacos contendo cátions divalentes (magnésio e cálcio). Estes complexos formados não são absorvidos e contribuem para a redução da biodisponibilidade do fármaco. A semelhança estrutural existente entre o clioquinol, hidroxipiridinonas e as fluorquinolonas motivou pesquisadores a estudarem essa classe como potencial agente inibidor da agregação do peptídeo β -amilóide (HUBER, 2012).

As fluorquinolonas compreendem uma série de agentes antimicrobianos sintéticos modelados a partir do ácido nalidíxico (Figura 11), uma quinolona com interessante atividade antibacteriana, que foi sintetizada e patenteada em 1962 por Lescher e colaboradores (LESCHER, *et.al.*, 1962).

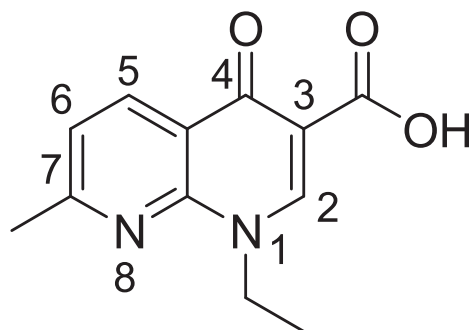


Figura 11: Estrutura do ácido nalidíxico

Estas fluorquinolonas são resultados de estudos de relação estrutura atividade para o desenvolvimento de compostos com maior potência, espectro de atividade estendido e propriedades de absorção e distribuição melhoradas. Tais características culminaram com o desenvolvimento de novos membros da classe no tratamento de uma variedade de infecções sistêmicas graves (WILSON, *et.al.*, 2004). A introdução de um átomo de flúor em posição C-6 e um grupo piperazila em posição C-7 conferiu um amplo e potente espectro de atividade antibacteriana.

Após a importante descoberta do norfloxacin, inúmeras fluorquinolonas foram sintetizadas e avaliadas, merecendo destaque o levofloxacin (Figura 12), que possui um amplo espectro de atividade contra vários microrganismos patogênicos, em seres humanos e animais, resistentes a outros antibióticos. Essa eficácia está diretamente ligada ao seu mecanismo de ação, baseado na inibição da DNA girase bacteriana, uma enzima essencial para a replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano (CONTESTABILE, 2001).

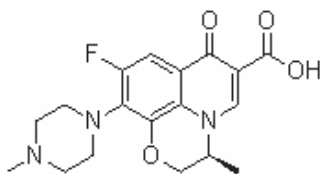


Figura 12: Estrutura do Levofloxacin.

O levofloxacin é um dos membros das fluoroquinolonas mais comumente usados, sendo o isômero ativo o S-isômero isolado do ofloxacin racêmico. Essa classe de compostos tem atualmente destacada importância no combate a diferentes tipos de bactérias (SOUZA, 2005).

As fluoroquinolonas possuem em sua estrutura heteroátomos (O, N) que possuem elétrons não ligantes que complexam com metais (HUBER, 2012). A estrutura dos complexos formados consiste na ligação do átomo metálico central a duas moléculas do ligante (fluoroquinolona), através do oxigênio da carbonila (4-

oxo) e do grupo carboxila (3-carboxi), conforme representado na Figura 13 para o levofloxacinó.

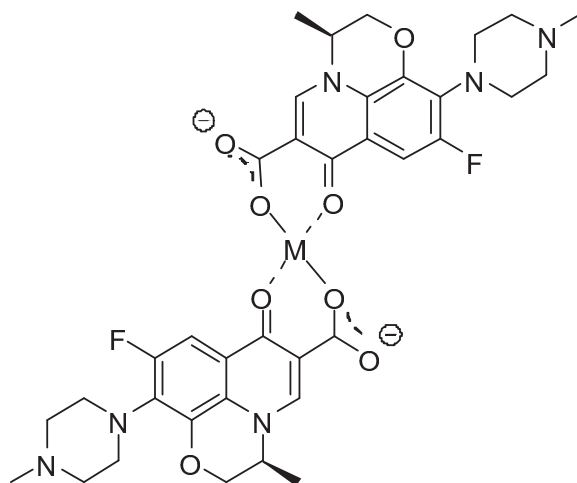


Figura 13: Levofloxacinó complexado com cátion divalente

A quelatão de metais é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da DA, que vem sendo fortalecida pela constatação da participação de metais no processo de formação de fibrilas amilóides e no estresse oxidativo, além das concentrações elevadas de Zn^{2+} e Cu^{2+} , em regiões do Sistema Nervoso Central, associadas à DA (HUBER, 2012).

No entanto, uma grande limitação dessa estratégia é conseguir que o fármaco sozinho seja capaz de atingir o Sistema Nervoso Central (SNC), visto que, em nosso organismo temos um sistema de defesa que é a presença da Barreira Hemato-Encefálica (BHE) (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993).

A BHE consiste em uma barreira celular, uma interface complexa e dinâmica, entre a circulação sistêmica e o Sistema Nervoso Central, responsável pela homeostase iônica do microambiente do Sistema Nervoso Central (SNC) com o objetivo de proteção contra compostos tóxicos, fármacos e patógenos (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993). É uma estrutura complexa constituída por células endoteliais intimamente interconectadas entre si, envoltas por perócitos e

prolongamentos de um tipo de célula da glia, os astrócitos (WILSON, *et.al.*, 2004; SOUZA, 2005).

Estudos apontam que para conseguir permear essa barreira, o tamanho da partícula deve estar abaixo de 400 nm (MIRAHMADI, *et.al.*, 2010; VU, *et.al.*, 2013), tendo uma maior probabilidade se estiver em torno de 100 nm.

De forma a tentar suprir essa dificuldade, pesquisadores têm estudado formas de carrear através de transportadores, fármacos para diversas doenças relacionadas ao SNC, dentre elas, a DA.

1.7. Pró-fármacos (sistemas especiais de liberação)

1.7.1. Geral

Como relatado anteriormente, uma droga terapeuticamente promissora pode ter sua utilização limitada na prática clínica devido a problemas como baixa permeabilidade, pouca solubilidade, problemas com sua metabolização, estabilidade, segurança farmacêutica, pouca biodisponibilidade, inespecificidade, absorção incompleta ou outros efeitos adversos. Há uma grande ênfase na pesquisa para descobrir métodos e transportadores que visam melhorar uma eficácia terapêutica, minimizando ou eliminando essas propriedades indesejáveis (BHOSLE, *et.al.*, 2006; KERNS, *et.al.*, 2008).

1.7.2. Critérios ideais para transportadores

Para que um transportador seja realmente eficaz, ele necessita apresentar algumas características básicas. Um transportador ideal não deve apresentar toxicidade intrínseca, não deve ser imunogênico e antigênico, não deve se acumular no organismo, possuir um número adequado de grupos funcionais para a ligação do fármaco, ser estável à manipulação química, ser de fácil caracterização além de mascarar a atividade do ativo ligado até liberação do mesmo no local desejado da ação. Na abordagem pró-fármaco mútuo, o

transportador deve apresentar alguma atividade biológica própria, apresentando em sua estrutura subunidades farmacofóricas (WILSON, *et.al.*, 2004).

Dentre esses transportadores ideais, podemos citar micropartículas, nanoemulsões, chips, lipossomas convencionais, lipossomas peguados, dentre outros (GAUMET, 2008).

1.8. Lipossomas

Os lipossomas apresentam características compatíveis com as de um transportador ideal, e há algum tempo vem sendo objeto de estudos para veicular substâncias com características hidrofílica ou lipofílicas, devido à característica anfótera que o lipossoma apresenta (SANTOS, 2002). Diversos pesquisadores, estudam o lipossoma como um carreador para entrega de quimioterápicos, vacinas de antígenos, radiofármacos para diagnóstico por imagem, medicamentos a base de ácidos nucleicos para terapia genética e muitas outras aplicações (BEHERA, *et.al.*, 2011).

1.8.1. Características dos lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (Figura 14). São de natureza anfótera, pois são constituídos por uma fase externa contendo um sistema de membranas fosfolipídicas e uma fase interna constituída por um meio aquoso. É possível encapsular uma grande variedade de moléculas dentro desses espaços (CABEÇA, 2009).

Apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação, de forma que, quando alcançam os tecidos alvos podem liberar doses concentradas do medicamento, aumentando a eficácia do tratamento (MACHADO, *et.al.*, 2007). Os lipossomas modificam as propriedades farmacocinéticas, o tempo de trânsito na circulação

sanguínea e o metabolismo da droga encapsulada (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993). A liberação controlada de drogas encapsuladas em lipossomas apresenta menores efeitos colaterais, logo menor toxicidade (KERNS, *et.al.*, 2008).

Os lipossomas, classicamente, são preparados a partir do glicerofosfolípido e fosfatidilcolina (BARENHOLZ, *et.al.*, 2011). De uma forma mais geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar (BHOSLE, *et.al.*, 2006). São sistemas versáteis, que podem ser classificados quanto ao tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno, conforme as necessidades farmacológicas (CHIN, *et.al.*, 1999).

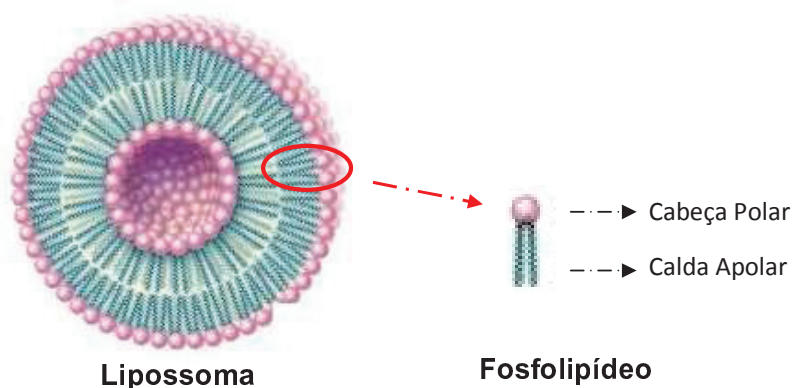


Figura 14: Estrutura lipossomal. Adaptado de Medicina Geriátrica.

1.8.2. Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com: sua morfologia, tamanho e composição.

Morfologicamente, as vesículas lipossomais podem ser classificadas como vesículas unilamelares pequenas, unilamelares grandes ou multilamelares. Em relação ao tamanho as vesículas podem ser classificadas como pequenas ou grandes, dependendo de seu diâmetro. As primeiras tem diâmetro na faixa de 20-40 nm, e as vesículas grandes, de 50 a 200 nm. Estas últimas são as mais

empregadas no encapsulamento de fármacos, por serem mais estáveis (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993).

Em relação à composição, lipossomas podem ser constituídos por um, ou mais fosfolipídeos, geralmente combinado(s) ao colesterol. Quimicamente, as diferenças entre estes tipos de lipossomas dependem do(s) tipo de fosfolipídeo(s) que entra(m) em sua composição. As variações químicas podem ser na porção polar, por exemplo, fosfatidilcolina, ou ainda na cadeia carbônica, que pode ser saturada ou insaturada em posições diferentes da cadeia (WANG, *et.al.*, 2005).

A combinação entre a escolha dos componentes das vesículas lipossomais, bem como suas quantidades relativas nessas vesículas, e a metodologia empregada em sua preparação são fatores extremamente importantes para a obtenção de formulações com características desejadas para a entrega de fármacos em tecidos específicos. A combinação de componentes em proporções específicas impacta nas características das vesículas lipossomais, tais como sua carga superficial, tamanho, lamelaridade e capacidade de encapsulação do fármaco de interesse. Estas características da partícula lipossomal vão impactar sua estabilidade química e física, e seu comportamento *in vivo* e *in vitro* (BEHERA, *et.al.*, 2011).

1.8.3. Preparação dos Lipossomas

Os lipossomas podem ser preparados através de diversos processos: agitação, sonicação, extrusão, liofilização, congelamento e descongelamento, evaporação em fase reversa, entre outros. Dependendo do modo de preparo, muitas formas vesiculares lipídicas podem ser obtidas, com diâmetros variando entre 400 e 3500 nm (SUŁKOWSKI, *et.al.*, 2006).

Os lipossomas de preparação mais imediata são as vesículas multilamelares, constituídas por várias bicamadas lipídicas. A partir destas, são obtidas as demais espécies: vesículas unilamelares pequenas e vesículas unilamelares grandes (BHOSLE, *et.al.*, 2006).

Inicialmente, os componentes lipídicos são dissolvidos em um solvente adequado (clorofórmio, por exemplo) isento de toxicidade residual. Após remoção do solvente, a baixa temperatura e pressão reduzida, obtêm-se um filme lipídico bem fino. Este é então hidratado com uma solução tampão, em temperatura acima da temperatura de transição de fase, de modo que ocorra a fusão do lipídio (ZHANG, *et.al.*, 2011). Na sequência, a solução é submetida a vários ciclos de agitação/ aquecimento, obtendo-se ao final dessa etapa uma suspensão de vesículas multilamelares (MLV). Para obter outros tipos de lipossomas como os lipossomas de vesículas pequenas (SUV), utiliza-se o processo de sonicação; os lipossomas de vesículas grandes (LUV) podem ser obtidos através do processo de extrusão ou com homogeneizadores de alta pressão, enquanto MVL é obtido através de congelamento e liofilização. Em todas as situações são realizadas operações complementares de modo a garantir homogeneidade e pureza às preparações. Cuidados especiais que assegurem apirogenicidade, isotonicidade, atoxicidade e estabilidade do lipossoma são imprescindíveis (CABEÇA, 2009).

1.8.4. Farmacocinética

A farmacocinética de lipossomas constituídos de fosfolipídios naturais e colesterol é caracterizada por alta velocidade de depuração do plasma. Essas vesículas são rapidamente removidas da circulação por macrófagos do sistema retículo endotelial, principalmente do fígado, baço e medula óssea (BEHERA, *et.al.*, 2011).

Após administração, por via oral ou intravenosa, o lipossoma está sujeito a várias interações com os componentes dos fluidos biológicos, o que pode alterar a permeabilidade de sua membrana e a velocidade de liberação da substância encapsulada (WANG, *et.al.*, 2005).

Os lipossomas podem interagir com a superfície da célula por duas formas principalmente, por adsorção e endocitose. Os lipossomas podem ser adsorvidos diretamente a uma superfície celular ou através de interações específicas, mediante um receptor (SULKOWSKI, *et.al.*, 2006).

Quando administrado por via oral, o lipossoma é afetado pelos sais biliares que se incorporam em sua membrana, induzindo mudança da fase lamelar para micelar, gerando uma série de desestabilizações (WANG, *et.al.*, 2005).

Já por via intravenosa, os lipossomas interagem com dois grupos de proteínas: as lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL) e as opsoninas. Com as primeiras podem ocorrer transferências de lipídios dos lipossomas para as lipoproteínas, além da passagem de apoproteínas, componentes da HDL, para a membrana lipossomal. Essas interações são diminuídas ou inibidas quando pelo menos 30% do total dos lipídios do lipossoma forem constituídos de colesterol (MONKKONEN, *et.al.*, 1994). Por outro lado, as opsoninas aderem à membrana lipossomal, fazendo com que o lipossoma seja fagocitado mais rapidamente diminuindo assim sua permanência na circulação. Nesse sentido, o tempo de meia vida do lipossoma pode ser consideravelmente prolongado na circulação pela incorporação dentro da sua bicamada fosfolipídica, de gangliosídeos ou polietilenoglicol (PEG) (ZHANG, 2005).

A liberação do princípio ativo contido no lipossoma dependerá de células endocitárias, que capturam o lipossoma principalmente em órgãos como o fígado, o baço e a medula óssea. Após a fagocitose o princípio ativo é liberado através dos fagolisossomas, podendo se difundir no citossol ou ser excretado para o meio extracelular. A velocidade de liberação do princípio ativo a partir do lipossoma é influenciada pelo tamanho e composição do lipossoma (ZHANG, *et.al.*, 2009).

1.8.5. Utilização do lipossoma

Apesar das limitações práticas da utilização de lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, a utilização de vesículas lipídicas continua a ter grandes vantagens relativamente a outras famílias de transportadores, tendo como uma de suas principais vantagens a facilidade de incorporação de um fármaco, independentemente da sua carga ou massa molecular. Além disso, os sistemas de vesículas lipídicas encontram-se caracterizados em termos de estrutura, estabilidade físico-química, toxicidade, imunogenicidade e formas de

administração *in vivo* (intravenosa, intramuscular, subcutânea, dérmica, ocular, pulmonar, nasal ou oral), dispondo-se de um vasto leque de possibilidades na escolha do sistema mais adequado para cada fim (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993).

Atualmente, já são disponíveis diversas formulações farmacológicas comerciais utilizando lipossomas como carreadores, como por exemplo, no tratamento de câncer a Doxorrubicina lipossomal (GUO, *et.al.*, 2011) e para tratamentos de infecções fungicas sistêmicas em pacientes imunodeprimidos a utilização de Anfotericina B lipossomal (KERNS, *et.al.*, 2008).

Na fabricação de vacinas os lipossomas são aplicados como veículos de liberação de antígenos como adjuvante imunológico, apresentando vantagens como a fácil preparação, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como a liberação lenta de antígenos encapsulados. Também pode ser encontrado na terapia de doenças infecciosas e parasitárias. Pesquisas realizadas em camundongos exibiram liberação controlada dos fármacos encapsulados em lipossomas para doenças como tuberculose e leishmaniose (ZHANG, *et.al.*, 2011).

Outra aplicação das vesículas lipossomais é no encapsulamento de anestésicos locais (ALs), aumentando o tempo de meia-vida dos anestésicos *in vivo*, prolongando o efeito da anestesia e diminuindo os efeitos colaterais (CHIN, *et.al.*, 1999). Estudos mostram também, que levofloxacino encapsulado em lipossomas, é um promissor fármaco para tratar infecções pulmonares, por conseguir entregar o fármaco de forma mais efetiva e com redução dos efeitos adversos (ZHANG, *et.al.*, 2009).

Além disso, existem estudos avançados sobre a utilização de lipossomas como vetores para a entrega de novas moléculas alvo para fins de diagnóstico e terapêutica para a Doença de Alzheimer (VU, *et.al.*, 2013), e isto pode ser explicado através de uma maior probabilidade que os lipossomas possuem de permear a BHE, através de sua constituição e tamanho e a elevada afinidade dos lipossomas a formas agregadas de β -amilóide (GOBBI, *et.al.*, 2010; VU HUONG, *et.al.*, 2013)

2. JUSTIFICATIVAS

Com o número crescente do número de casos da Doença de Alzheimer e da limitação do arsenal terapêutico, é urgente a necessidade de uma farmacoterapia efetiva que ajude no controle de seu desenvolvimento e sintomas. Considerando as principais características fisiopatológicas da doença de Alzheimer, com destaque para a formação e acúmulo de fibrilas de peptídeo β -amilóide, processo este dependente de metais, principalmente cobre e zinco, a terapia baseada no uso de agentes complexantes de metais tem sido uma das mais promissoras (TAYEB, *et.al.*, 2012; ALZFORUM, 2012).

Como já apresentado, o levofloxacino é um agente quelante de metais (TAYEB, *et.al.*, 2012; GOTTSCHALDT, *et.al.*, 2013) que apresenta propriedades inibidoras da agregação do peptídeo β -amilóide (HUBER, 2012).

Atualmente, tem-se estudado muito a respeito do reposicionamento de fármacos (ASHBURN, *et.al.*, 2004), ou seja, uma aplicação terapêutica diferente da original, e um dos motivos seria ter o conhecimento prévio da farmacocinética do fármaco. Alguns exemplos de medicamentos atualmente comercializados e que sofreram estudos de segundo uso são: sildenafil, inicialmente utilizado para angina e atualmente amplamente empregado para tratar a disfunção erétil; minoxidil, inicialmente utilizado como agente anti-hipertensivo e atualmente utilizado para queda de cabelo; sibutramina, fármaco anti-depressivo, atualmente utilizado para perda de peso.

Dentro ainda do conceito de reposicionamento de fármacos com ênfase em DA, estudos com iododoxorrubicina, (TAGLIAVINI, *et.al.*, 1997) um antibiótico do grupo das antraciclinas com atividade antitumoral, vem sendo realizados com relação a atividade inibidora da agregação do peptídeo β -amilóide. Embora os resultados tenham sido muito promissores, *in vitro* e *in vivo*, a dificuldade da antraciclina em atravessar a BHE se mostrou um empecilho para que os estudos pudessem ser continuados visando a sua aplicação como fármaco anti-Alzheimer. A tetraciclina também foi avaliada e apresentou atividade inibidora da fibrillogênese, tendo como vantagem a sua habilidade em atravessar a barreira hemato-encefálica (FORLONI, *et.al.*, 2001).

Dentre os outros fármacos estudados como potenciais agentes anti-Alzheimer, o levofloxacin se mostrou um dos mais promissores, mas uma estratégia para permitir a sua passagem pela barreira hemato-encefálica deveria ser desenvolvida.

Frente aos resultados obtidos em nosso laboratório com relação à capacidade do levofloxacin em complexar cobre e zinco, e de inibir a agregação do peptídeo β -amilóide, decidimos desenvolver uma formulação que pudesse permitir a entrega de levofloxacin para o Sistema Nervoso Central, uma vez que, de acordo com a literatura, este fármaco não atravessa a barreira hemato-encefálica. Neste estudo, a nossa abordagem é o encapsulamento de levofloxacin em lipossomas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Com base no que foi exposto sobre a correlação entre DA, acúmulo de íons metálicos, formação de fibrilas do peptídeo β -amilóide e dificuldade de fármacos em atravessar a barreira hemato-encefálica, este projeto tem por objetivo encapsular o levofloxacino, um potencial agente redutor na formação de fibrilas, em lipossomas de forma a possibilitar a sua passagem pela BHE e acesso ao SNC.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Desenvolvimento e otimização das condições de preparação de lipossomas contendo Levofloxacino encapsulado;
- 3.2.2. Monitoramento da estabilidade dos lipossomas frente ao seu tamanho;
- 3.2.3. Quantificação do Levofloxacino total e livre;
- 3.2.4. Estudo da passagem da formulação lipossomal por um modelo de barreira que mimetiza *in vitro* a BHE.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes

Os reagentes e solventes P.A. foram adquiridos da Sigma Aldrich sem purificação ou tratamento adicional. Acetonitrila e Metanol grau HPLC, foram adquiridos da Tédia e Merck, respectivamente. A Fosfatidilcolina de ovo adquirida da Phospholipid. O Levofloxacino foi adquirido da Hetero Drugs Limite e a Azida de sódio da Across Organics. A coluna OASIS HLB, para retirada do levofloxacino não encapsulado foi adquirida da Merck.

4.2. Caracterização físico-química do Levofloxacino

As técnicas relacionadas abaixo foram utilizadas para caracterizar o levofloxacino a fim de possibilitar comparação após o seu encapsulamento.

- **Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono**, utilizando DMSO-d₆ como solvente.
Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram adquiridos em aparelhos Inova 500 operando a 500 e a 125 MHz, para ¹H e de ¹³C, respectivamente; BRUKER 250 operando a 250 MHz para ¹H e a 62,5 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo padrão interno tetrametilsilano, clorofórmio, ácido trifluoroacético, metanol ou dimetilsulfóxido deuterados.
- **Espectroscopia de infravermelho** no intervalo 4000 – 400 cm⁻¹, utilizando pastilhas de KBr .
Os espectros no infravermelho (IV) foram registrados em equipamento PerkinElmer e as amostras preparadas em pastilha de KBr seco ou em filme, foram analisadas no intervalo 4000-400 cm⁻¹.
- **Espectrometria de Massas** por infusão direta, utilizando como solvente Metanol: Água (1:1). Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro Quadrupolo UPLC-Waters infusão direta com fonte Electrospray (ESI).

Todas as análises foram realizadas no Instituto de Química da UNICAMP.

4.3. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de Levofloxacin

O ensaio de citotoxicidade é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer composto de acordo com a International Standard Organization (ISO 10993). Em ensaios de citotoxicidade, a substância teste é colocada em contato com culturas de células verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos (GOBBI, *et.al.*, 2010).

Esse ensaio visa garantir que a formulação não apresenta citotoxicidade para a linhagem NG97 (glioblastoma), de forma a permitir então, a realização do teste da passagem da formulação lipossomal por um modelo de barreira que mimetiza a BHE.

A linhagem NG97 foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 h, até as células adquirirem confluência. Após a contagem, as células foram diluídas até a sua densidade de inoculação e transferidas para uma microplaca contendo 96 orifícios, em um volume fixo de 100 µmol/L por orifício. A densidade de inoculação das células foi 1 x 10⁵ cels/mL. Esta concentração inicial de células foi determinada a partir de curvas de crescimento, assegurando-se que elas estariam em crescimento logarítmico ao longo do experimento. A microplaca contendo as células foi pré-incubada a 37 °C por 72 h com 5% de CO₂ para permitir estabilização, (ROGERO, 2003) antes da adição do composto-teste. O composto foi então solubilizado em DMSO, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,12 µg/mL, e adicionado ao meio. Após 3h de incubação no meio livre de soro contendo 50 µg/mL de vermelho neutro, as células foram lavadas rapidamente com PBS e em seguida, 0,1 mL de uma solução de etanol/ácido acético (50% vv) e etanol para retirar o corante. Após agitação por 10 min, a absorbância foi lida em 540 nm. Estes ensaios foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (IB/UNICAMP).

4.4. Preparação das formulações lipossomais

4.4.1. Geral

Na Figura 15, apresentamos um fluxograma do processo de preparação da formulação lipossomal.

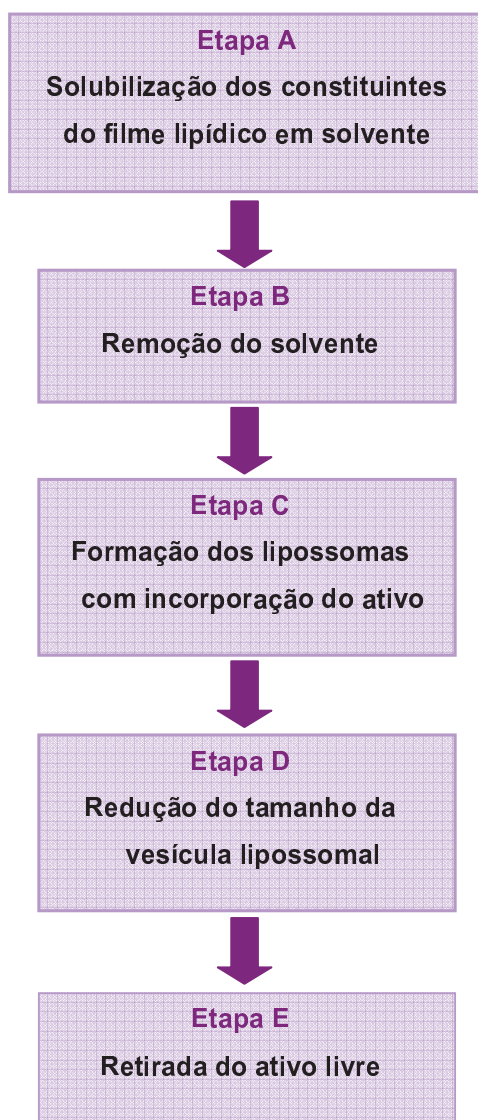


Figura 15: Fluxograma da preparação da formulação lipossomal contendo levofloxacinó encapsulado

Todas as formulações lipossomais mencionadas neste trabalho foram obtidas por hidratação do filme lipídico seco, técnica amplamente empregada para encapsular fármacos em lipossomas (PERKINS, 2000; HASHIZAKI, 2003).

4.4.2. Desenvolvimento da metodologia de preparação das formulações lipossomais

4.4.2.1. Preparação da dispersão lipídica (Etapas A e B)

Esta etapa, que origina o filme lipídico seco mediante evaporação do solvente, é o primeiro passo para preparar os lipossomas. Nela, um fator muito importante é a solubilização total do fosfolipídio e do colesterol (ZHANG, *et.al.*, 2011) sendo que diferentes proporções dos constituintes foram testados, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Estudo da proporção dos constituintes da formulação

Fosfatidilcolina de ovo (% em massa)	Colesterol (% em massa em relação à massa de lipídeo)	Levofloxacino (% em massa em relação à massa de lipídeos)
87,50	12,50	12,50
66,60	33,3	50,00
66,60	33,3	100,00

Durante a otimização desta etapa, todas as três proporções detalhadas nos resultados e discussões, foram estudadas através da dispersão de fosfatidilcolina de ovo e do colesterol em clorofórmio. Para esta etapa, a formulação Fosfatidilcolina: Colesterol: Levofloxacino (66,6:33,3:100) foi a que se mostrou com melhor desempenho com relação: a não formação de bolhas no filme, resistência do lipossoma (mediante a verificação no momento da centrifugação

realizada na Etapa E) e porcentagem de encapsulamento, avaliada via quantificação por HPLC.

Após total solubilização, foi realizada a retirada do solvente à pressão reduzida. O balão contendo o filme lipídico foi colocado em bomba de vácuo, para remoção de solvente residual (Etapa B).

4.4.2.2. Etapa C - Hidratação do filme lipídico e incorporação do levofloxacino

Para a formação das vesículas, os filmes lipídicos secos foram hidratados em tampão fosfato 10 mmol/L pH 7, sob agitação magnética sendo a temperatura, controlada por banho de silicone.

Nessa etapa, três proporções do Levofloxacino em relação à massa de lipossoma foram estudadas: 12,5; 50 e 100 % (ZHANG, *et.al.*, 2009). O tempo estudado para a hidratação variou de 1 a 2 horas, já para a temperatura de hidratação, foi determinado uma faixa estreita de 50 à 65 °C (WANG, *et.al.*, 2005; ZHANG, *et.al.*, 2011). Todos os parâmetros estudados estão descritos na Tabela 4.

4.4.2.3. Etapa D - Uniformização do tamanho dos lipossomas

No momento da hidratação do filme lipídico são formados lipossomas multilamelares (SULKOWSKI, *et.al.*, 2006), os quais apresentam diâmetro grande, e para que se consigam lipossomas de tamanhos menores, uniformes e se mantenham estáveis, três diferentes métodos foram testados, sendo eles:

- **Extrusão**, Mini extrusora, Avanti Polar Lipis, equipada com duas seringas de Hamilton de 1 mL e 2 filtros de polycarbonato com poro de diâmetro de 400nm. Um volume de 1 mL da amostra à 50 °C foi submetida a 19 ciclos de extrusão manualmente (BERGER, 2001).

- **Extrusão a vácuo**, para tal procedimento, faz-se necessário o uso de uma bomba de vácuo (Vaccubraand ME2) acoplada a um kitassato, pelo qual está conectado o suporte contendo uma membrana de policarbonato de poro de 100 nm. Um volume de 50 mL de amostra à 50 °C foi submetida a 3 ciclos de extrusão (CHAPMAN, *et.al.*, 1990).
- **Pressão** através do equipamento PANDA – Gea Niro Soavi, para este estudo, a cada teste de pressão, na faixa de 400 a 1000 bar (BACHMANN, 1993), 50 mL da formulação sofreu recirculação de 5 a 7 minutos, dependendo da etapa em que se estava estudando (RODRIGUEZ, 2001).

4.4.2.4. Etapa E - Retirada do levofloxacino não encapsulado

Esta etapa consiste na remoção do Levofloxacino que não foi encapsulado. Para otimização deste processo, dois métodos foram utilizados:

- **Centrifugação**: para essa etapa, foram realizados diversos estudos abrangendo velocidades de rotação 14000 – 5000 rpm e tempo de 10-60 minutos (ZHANG, *et.al.*, 2011). Para esses testes, utilizamos a Centrífuga – Microfuge 16, Beckman Couter. Em cada teste, para a lavagem inicial, uma alíquota de 1 mL da formulação lipossomal sofreu o processo de centrifugação a uma rotação e tempo pré-determinados. Após a primeira centrifugação, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com tampão fosfato 10 mmol/L, pH 7, ao qual o levofloxacino apresenta certa solubilidade. Novamente a amostra foi submetida a um novo processo de centrifugação nos mesmos parâmetros anteriores (SULKOWSKI, *et.al.*, 2006; ZHANG, *et.al.*, 2011). Foram feitas tantas lavagens quanto possíveis antes do rompimento dos lipossomas, repetindo as etapas descritas acima.
- **Separação através de Coluna de Extração em Fase Sólida**: Neste processo, se fez necessário primeiramente molhar a coluna com Metanol e após, acrescentou-se 5mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7 de forma a

ambientalizar a coluna. Para a retirada do ativo que não foi encapsulado, adicionou-se a parte superior da coluna, 2 mL da formulação lipossomal, eluindo a mesma com 10 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7 (SULKOWSKI, *et.al.*, 2006; ZHANG, *et.al.*, 2011). No final da coluna a primeira alíquota recolhida, refere a uma formulação lipossomal isenta de ativo livre. Após para remover o levofloxacino que ficou interagido com o recheio de Divinilbenzeno com propileno, acrescentou a parte superior da coluna, 10 mL de Metanol, conhecendo a solubilidade do Levofloxacino em Metanol, recolhendo assim como segunda alíquota, o levofloxacino que se encontrava livre na formulação.

Ao término de cada ciclo de centrifugação ou eluição da amostra pela coluna, a amostra do sobrenadante ou alíquota, respectivamente, depositou-se em placa cromatográfica, e após, visualizada em luz UV 365 nm, para isso se fez uso de UV-Vis HP 8453, de forma a verificar qualitativamente, a presença de levofloxacino.

4.4.3. Metodologia final de preparação das formulações lipossomais

1. Em balão de fundo redondo de 100 mL, em 50 mL de solvente clorofórmio, promoveu-se a dissolução da fosfatidilcolina de ovo e do colesterol;
2. Evaporou-se o solvente, em rotaevaporador (280 rpm) por 2 horas a 39 °C (temperatura controlada por banho de aquecimento);
3. Removeu-se possível resíduo de solvente do filme lipídico seco, obtido em 2, em linha de vácuo, por aproximadamente 1 hora;
4. Hidratou-se o filme lipídico por adição de 50 mL de solução do Levofloxacino em tampão fosfato, 10 mM, pH 7, sob agitação magnética rápida, durante 60 min. a 60 °C. (temperatura controlada por banho de silicone);
5. Promoveu-se a redução do tamanho da vesícula através da homogeneização por alta pressão da suspensão de lipossomas multilamelares obtidos em 4 por 25 ciclos a pressão de 700 bar;

6. Separaram-se alíquotas com 5 mL da suspensão lipossomal obtidas em 5 para posterior retirada do ativo livre;
7. A coluna de extração em fase sólida foi molhada com metanol e posteriormente ambientalizou-a com 5mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7;
8. Alíquotas de 2 mL da suspensão lipossomal, reservadas em 6, foram passadas pela coluna de separação de sólidos, eluindo-se com 10 mL de tampão, para obtenção de formulação isenta de ativo livre;
9. Armazenou-se a formulação lipossomal em frasco de vidro âmbar, sob temperatura controlada de 4 °C;
10. Para remover o Levofloxacino livre que ficou retido na coluna, acrescentou-se 10 mL de Metanol a coluna;
11. Separaram-se alíquotas do eluente para elaboração de placa e posterior realização de leitura em luz UV – 365 nm para observar a presença de ativo no sobrenadante;
12. Filtrou-se a solução de ativo livre em metanol com auxílio de filtro de 0,45 µm.

Observação: No caso de lipossomas vazios (sem Levofloxacino), a metodologia empregada foi exatamente a mesma, exceto pela etapa descrita em 4, onde não foi acrescido o ativo ao tampão fosfato 10 mmol/L, pH 7.

4.5. Caracterização físico-química da formulação lipossomal

4.5.1. Medidas de tamanho de vesícula lipossomal

O diâmetro da vesícula lipossomal, influência tanto a biodistribuição quanto a eliminação das vesículas após administração de formulações (MIRAHMADI, *et.al.*, 2010).

Para esse estudo foram utilizados ao longo do desenvolvimento do projeto três tipos de equipamentos:

- **ZetaSizer Nano**, Malvern Instruments, que utiliza como base o espalhamento de luz (espectroscopia de correlação por fótons), tendo como modelo a vesícula sendo considerada esférica.

As medidas foram feitas para amostras de lipossomas diluídas em solução 1 mmol/L de KCl, empregando os seguintes parâmetros: dispersante: água; índice de refração dispersante: 1.330; temperatura 25 °C; tempo de equilíbrio: 1 min.; número de varreduras por amostra: 12 a 14 (HANUS, *et.al.*, 1999).

- **Nanophox**, SympaTEC, que utiliza como técnica a Espectroscopia por Cross Correlation em tridimensional, tendo feixes de luzes conjugados, com medidas simultâneas de tamanho a vesícula e estabilidade de suspensões.

As medidas foram feitas com amostras diluídas em água deionizada (1 gota de amostra em 3 mL de água), empregando como parâmetros: temperatura de 25 °C; tempo de equilíbrio: 1 min.; número de corridas por amostra: 5 (HANUS, *et.al.*, 1999).

- **Analisador de distribuição de tamanho de partículas**, Beckman Coulter LS 13320, o qual utiliza analisador de difração a laser. A amostra é diluída em água e tempo de equilíbrio de 1 minuto (HANUS, *et.al.*, 1999).

Estes ensaios de tamanho de partícula foram realizados no Instituto Vita Nova, Instituto de Pesquisas localizado em Hortolândia, SP/Brasil.

4.5.2. Potencial Zeta

Estas medidas foram feitas em equipamento ZetaSizer Nano, Malvern Instruments. As amostras de lipossomas estudadas, foram diluídas em solução 1 mmol/L de KCl, empregando os seguintes parâmetros: dispersante: água; índice de refração dispersante: 1.330; temperatura 25 °C; tempo de equilíbrio: 1 min.; número de varreduras por amostra: 12 a 14 (SKOOG, 2002). Estes ensaios foram realizados no Instituto de Química/UNICAMP.

4.5.3. Análise por Microscopia de Transmissão

Essa análise tem por objetivo determinar a estrutura da vesícula lipossomal a partir de um feixe de elétrons emitidos em direção de uma ultrafina camada de amostra. Desta forma, a interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem, a qual é ampliada e focada em um dispositivo de imagem. Para essa análise, utilizamos o Microscópio Zeiss-CEM902, operado em 80kV, equipado com filtro de energia. As imagens foram adquiridas com câmara CCD Proscan HSC2 (marca Proscan) e plataforma de aquisição EsiVision.

A amostra foi totalmente dispersa em água, após, colocou-se uma gota da amostra em uma grade de cobre com 3 mm de diâmetro e 300 mesh, sendo que esta foi previamente revestida por um filme de parlódio e carbono para promover uma sustentação mecânica e elétrica. Após a aplicação da amostra sobre essa grade, esta foi colocada em estufa 60 °C por 10 a 15 minutos (VU, *et.al.*, 2013).

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Microscopia (Instituto de Química/UNICAMP).

4.5.4. Análise de RMN de Fluor

Como apenas na estrutura do Levofloxacino tem a presença do átomo de flúor, optou-se por executar essa análise para avaliar as diferenças nas amostras de Levofloxacino livre (não encapsulado), e naquela em que a mesma se encontrava encapsulada.

Para análise de RMN de Fluor utilizamos o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear – Avance 500, operando a 470 MHz para flúor.

As amostras (Levofloxacino e Formulação lipossomal) foram diluídas em D₂O, sendo 750 uL de amostra em 750 uL de D₂O. Estes ensaios foram realizados no Instituto de Química/UNICAMP.

4.5.5. Eficiência de encapsulamento

A quantificação de Levofloxacino foi feita mediante análise de Cromatografia Líquida de Alta eficiência, HPLC, (Alliance Waters e2695) Separation Module Photodiode Array Detector 2998 (Waters). A coluna utilizada foi uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6x150 mm), (Zorbax) com diâmetro de poro de 100 Å e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi Tampão fosfato: Acetonitrila (65:35). O volume de injeção foi de 20 µL, o fluxo utilizado foi de 1,5 mL/min. O tempo de corrida é de 5 minutos e o tempo de retenção de 1,7 minutos (PHARMACOPEIA, 2010).

Para quantificação total, 1 mL da amostra lipossomal foi rompido com 5 mL metanol em balão volumétrico (JENABIOSCIENCE, 2012; NOTEBOOK SCIENCE, 2012). Após, 875 µL da amostra foi diluída em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato 10 mM, pH7, a uma concentração teórica de 0,227 mg/mL. Dessa solução, 100 µL foi diluído novamente em 100mL de tampão fosfato 10 mM, pH7, obtendo uma concentração teórica final de 0,227 µg/mL.

Para quantificação de Levofloxacino não encapsulado, 2 mL da amostra lipossomal passou pela coluna de extração em fase sólida (SULKOWSKI, *et.al.*, 2006; ZHANG, *et.al.*, 2011). Para a remoção do levofloxacino livre, 10 mL de metanol foi injetado a coluna, o qual permitiu a eluição do levofloxacino livre. Uma alíquota de 875 µL do eluído foi diluída em 10 mL de tampão fosfato 10 mM, pH7. Dessa solução, 100 µL foi diluído novamente em 100mL de tampão fosfato 10 mM, pH7

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Cromatografia Líquida (Instituto de Química/UNICAMP).

4.5.6. Teste de citotoxicidade

Esse teste visa garantir que a formulação lipossomal não apresenta citotoxicidade para a linhagem NG97 (glioblastoma), de forma a permitir então, a

realização do teste da passagem da formulação lipossomal por um modelo de barreira que mimetiza a BHE (LANCELLOTTI, 2011; PEREIRA, 2011).

A linhagem NG97 foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C com 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 h, até as células adquirirem confluência. Após a contagem, as células foram diluídas até a sua densidade de inoculação e transferidas para uma microplaca contendo 96 orifícios, em um volume fixo de 100 µmol/L por orifício. A densidade de inoculação das células foi 1 x 10⁵ céls/mL. Esta concentração inicial de células foi determinada a partir de curvas de crescimento, assegurando-se que elas estariam em crescimento logarítmico ao longo do experimento. A microplaca contendo as células foi pré-incubada a 37 °C por 72 h com 5% de CO₂ para permitir estabilização, (ROGERO, 2003) antes da adição do composto-teste. O composto foi então solubilizado em DMSO, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,12 µg/mL, e adicionado ao meio. Após 3h de incubação no meio livre de soro contendo 50 µg/mL de vermelho neutro, as células foram lavadas rapidamente com PBS e em seguida, 0,1 mL de uma solução de etanol/ácido acético (50% vv) e etanol para retirar o corante. Após agitação por 10 min, a absorbância foi lida em 540 nm. Estes ensaios foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (Instituto de Biologia/UNICAMP).

4.5.7. Estudo de passagem da formulação lipossomal pelo Modelo de Barreira que mimetiza a BHE

Células NG97 (glioblastoma humano) e Hec-1B (produto de endometriose humano) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de Soro Fetal Bovino em garrafas de 75 cm³ e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após a confluência simultânea de ambas as monocamadas celulares, as células foram então tripsinizadas. As células NG97 foram transferidas para uma placa de 24 orifícios. Células Hec-1B, por sua vez, foram transferidas para insertos com poros de 0,4 µm, Thin certs – Greiner Bio One, os quais ficaram suspensos nos poços da placa que continham a cultura de NG97, conforme está ilustrado na

Figura 16. A placa de co-cultura celular foi mantida em condições de incubação supracitadas (LANCELLOTTI, 2011).

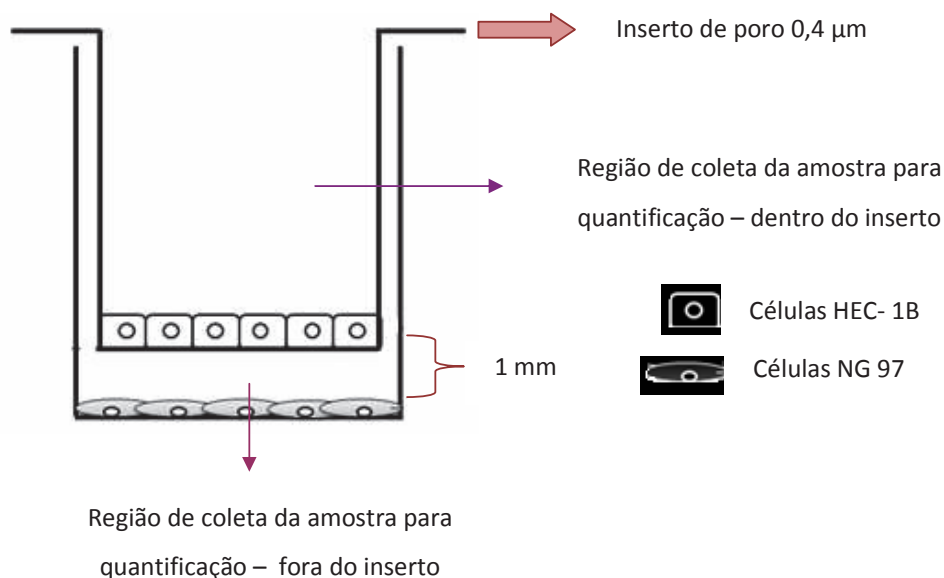


Figura 16: Esquema de cada poço com inserto da placa de co-cultura.

Após a confluência de ambos os tapetes celulares, trocaram-se meio da placa para RPMI 1640 com 10 % de SFB. Os poços com NG97 receberam 1 mL de meio e os insertos com Hec-1B, os quais tinham volume máximo de 350 µL, receberam diferentes alíquotas de meio (LANCELLOTTI, 2011). Os insertos aos quais seriam inoculadas as amostras de lipossomas vazios (denominadas por LP10 e LP12) e amostras de lipossoma contendo Levofloxacino encapsulado (denominada por LP14) receberam 175 µL de meio e 175 µL da amostra (proporção 1:1). Aos insertos destinados ao controle com Levofloxacino adicionou-se 315 µL de meio e 35 µL de uma solução de Levofloxacino 100 µg/ml para uma concentração final de 10 µg/ml no inserto. Já aos poços destinados ao controle negativo, foram adicionados 350 µL de meio RPMI 1640 + 10 % de SFB (PEREIRA, 2011).

Antes da troca de meio dos insertos, os mesmos foram transferidos para uma placa vazia e estéril de 24 orifícios. Tal procedimento foi adotado para evitar

uma possível contaminação acidental na parte inferior da placa com as amostras no momento de aplicação das mesmas. Assim, eliminou-se a possibilidade de um resultado falso positivo em relação à passagem das amostras testadas no modelo de BHE.

Após a aplicação dos compostos, os insertos com Hec-1B foram reposicionados à placa com NG97. A placa, então, foi incubada nas mesmas condições previamente descritas acima. O conteúdo das suspensões dos poços e dos insertos foram coletados nos tempos de 1, 3, 8 e 24 horas e armazenados separadamente em eppendorfs de 1,5 mL. Foi realizada a leitura em luz UV 365 nm de forma a verificar qualitativamente se os lipossomas haviam conseguido passar por essa barreira de células. Após essa visualização, os eppendorfs foram mantidos em 4 °C, para posterior quantificação.

Devido a alta complexidade técnica, foi possível realizar apenas uma vez esse teste.

4.5.7.1. Quantificação das amostras após passagem da formulação lipossomal pelo Modelo de Barreira que mimetiza a BHE

As amostras coletadas nos tempos de 1, 3, 8 e 24 horas, foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta eficiência, HPLC (Alliance Waters e2695) Separation Module Photodiode Array Detector 2998. A coluna utilizada foi uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6x150 mm) com diâmetro de poro de 100 Å e tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi Tampão fosfato: Acetonitrila (65:35). O volume de injeção foi de 20 µL, o fluxo utilizado foi de 1,5 mL/min. O tempo de corrida é de 5 minutos e o tempo de retenção de 1,7 minutos (PHARMACOPEIA, 2010).

Para o preparo das amostras retiradas dos insertos, diluiu-se 350 µL da amostra em tampão fosfato 10 mM, pH7, em balão volumétrico de 10 mL, denominada em solução A. Para uma segunda diluição, pegou-se 100 µL dessa solução A e diluiu-se novamente com tampão fosfato em um balão volumétrico de 100 mL.

Para as amostras retiradas dos orifícios, coletou-se 1 mL do meio e promoveu sua diluição em balão volumétrico de 10 mL com tampão fosfato 10 mM, pH7, solução A'. Diluiu-se 100 µL dessa solução A' com tampão fosfato, em balão volumétrico de 100 mL.

4.5.8. Teste de estabilidade quanto ao tamanho da vesícula lipossomal

Para esse teste, a amostra de formulação lipossomal, foi armazenada em frasco de vidro âmbar sob temperatura controlada de 5 °C, sendo acrescido a amostra de formulação lipossomal, 0.1% de Azida (m/v) como conservante.

Periodicamente, 0; 3; 10; 20 e 30 dias após o preparo da amostra, a mesma foi analisada através do equipamento Nanophox para verificar o tamanho das vesículas lipossomais.

Para essas análises de tamanho das vesículas conforme preconiza o fabricante, dilui-se 1 gota de amostra em 3 mL de água, empregando como parâmetros: temperatura de 25 °C; tempo de equilíbrio: 1 min.; número de corridas por amostra: 5.

Estes ensaios foram realizados no Instituto Vita Nova, Instituto de Pesquisas localizado em Hortolândia, SP/Brasil.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização do Levofloxacino

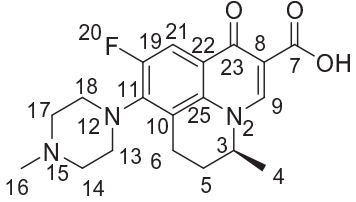
Neste item, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos quanto à caracterização físico-química do levofloxacino de forma a permitir uma comparação com as análises realizadas após o levofloxacino estar encapsulado em lipossomas. Para isso fez-se análise de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , Espectroscopia no Infravermelho (IV), Espectroscopia de Massas e Análise de Citotoxicidade frente à linhagem celular NG97.

5.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O espectro de RMN de ^1H do Levofloxacino vide ANEXO 8.1., demonstra um singlete em 8,93 ppm que foi atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao nitrogênio quinolínico. Na porção correspondente aos hidrogênios aromáticos, observa-se um dubleto em 7,49 ppm correspondente ao hidrogênio aromático que acopla com o flúor ($J = 12,4 \text{ Hz}$). Em 4,89 - 4,92 ppm observa-se um quarteto que foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono assimétrico e em 1,45 ppm observa-se um dubleto atribuído à $-\text{CH}_3$ ligada ao carbono assimétrico da molécula de levofloxacino. Em 2,22 ppm observa-se um singlete que foi atribuído à $-\text{CH}_3$ ligada à piperazina. Além disso, observa-se um singlete largo em 2,43 ppm e um multiplete em 3,27-3,29 ppm atribuídos aos hidrogênios da piperazina.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do Levofloxacino estão dispostos na Tabela 2. Os dados estão de acordo com os descritos na literatura (CHIN, *et.al.*, 1999; MOHAMMED, 2009).

Tabela 2: Resultados dos deslocamentos químicos do RMN – ^1H em DMSO- d_6

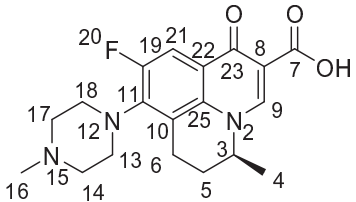
Levofloxacin	Numeração	RMN – ^1H (multiplicidade; J em Hz, Integração)
	9	8,93 (s, 1H)
	21	7,49 (d, J = 12,4 Hz, 1H)
	3	4,89 – 4,92 (m, 1H)
	5	4,57 (d, J = 11,4 Hz, 1H); 4,36 (d, J = 10,1 Hz, 1H)
	13,18	3,27 – 3,29 (m, 4H)
	14,17	2,43 (sl, 4H)
	16	2,22 (s, 3H)
	4	1,45 (d, J = 6.7 Hz, 3H)

5.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de RMN – ^{13}C

No espectro de RMN de ^{13}C do Levofloxacin (ANEXO 8.2.), observam-se dois sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em 176,3 e 166,0 ppm, além dos sinais correspondentes aos grupos $-\text{CH}$ em 54,8 ppm e aos grupos $-\text{CH}_2$ em 68,0; 55,0 e 50,1 ppm e aos grupos $-\text{CH}_3$ em 46,0 e 17,9 ppm. Além disso, observa-se dubletos em 155,4; 140,1; 132,0 e 119,5 ppm correspondentes aos carbonos $-\text{C}_0$ vizinhos ao flúor e que acoplam com o mesmo. O dubleto observado em 103,2 ppm também acopla com o flúor e foi atribuído ao $-\text{CH}$ aromático. Esses achados estão de acordo com a literatura (MOHAMMED, 2009).

Na Tabela 3 estão às atribuições dos carbonos presentes na molécula.

Tabela 3: Resultados dos deslocamentos químicos do RMN – ^{13}C em DMSO- d_6

Levofloxacin	Numeração	RMN – ^{13}C (multiplicidade; J (Hz);
	23	176,3 (C=O)
	7	166,0 (C=O)
	19	155,4 (C_0 ; d; JCF = 980,1 Hz)
	9	146,0 (CH)
	10	140,1 (C_0 ; d; JCF = 28,78 Hz)
	11	132,0 (C_0 ; d; JCF = 55,9 Hz)
	22	124,7 (C_0)
	25	119,5 (C_0 ; d; JCF = 38,2 Hz)
	8	106,6 (C_0)
	21	103,2 (C_0 ; d; JCF = 95,6 Hz)
	5	68,0 (CH_2)
	13,18	55,0 (CH_2)
	3	54,8 (CH)
	14,17	50,1 (CH_2)
	16	46,0 (CH_3)
	4	17,9 (CH_3)

5.1.3. Espectroscopia no Infravermelho

O Espectro de Infravermelho do Levofloxacin, vide ANEXO 8.3., mostrou o aparecimento da absorção em 1722 cm^{-1} característica de C=O de ácido carboxílico e a absorção em 1620 cm^{-1} atribuída a C=O da quinolona, confirmando a estrutura molecular do ativo conforme literatura (MOHAMMED, 2009).

5.1.4. Espectrometria de Massas

O pico molecular do Levofloxacin encontrado foi em $362,1\text{ m/z}$, massa essa correspondente ao levofloxacin (MOHAMMED, 2009). O espectro pode ser visualizado no ANEXO 8.4.

5.1.5. Ensaio de citotoxicidade in vitro de Levofloxacino

Neste ensaio, as amostras submetidas ao teste não apresentaram citotoxicidade para a linhagem celular NG97 estudada, este resultado torna viável o teste de modelo de barreira que mimetiza a BHE, uma vez que essa linhagem celular fará parte do modelo de barreira.

5.2. Obtenção da formulação lipossomal

Aqui são apresentados e discutidos os parâmetros estudados para a obtenção de uma formulação lipossomal com composição, tamanho, carga, eficiência de encapsulamento e estabilidade promissoras para o objetivo deste projeto. Para isso, serão apresentadas e discutidas as seguintes etapas do processo: Dispersão dos constituintes e formação do filme lipídico seco, hidratação do filme lipídico e incorporação do levofloxacino, redução no diâmetro das vesículas lipossomais e por fim, retirada do fármaco que não foi encapsulado.

5.2.1. Etapa de preparação da dispersão lipídica e formação do filme lipídico

Na Tabela 4 estão descritas as proporções estudadas dos constituintes da dispersão lipídica, bem como velocidade de rotação e tempo para evaporação do solvente no rota-evaporador.

Em geral, os componentes lipossomais (Fosfatidilcolina de ovo e Colesterol) (ROGERO, 2003; WONG, *et.al.*, 2003; MONKKONEN, *et.al.*, 1994) são dispersos em Clorofórmio não havendo nenhuma dificuldade de solubilização dos componentes, desta forma, o volume de solvente não foi alvo de estudo nesta etapa. No entanto, estudos mostram que a velocidade de evaporação do solvente influencia no momento da formação do filme lipídico, e que temperaturas próximas de 50 °C não são responsáveis por aumentar a probabilidade de oxidação lipídica (ZHANG, *et.al.*, 2011).

Frente a essa observação e tendo o conhecimento que os parâmetros de evaporação – velocidade e temperatura têm influência nas características do filme lipídico, iniciou-se o estudo desses parâmetros, conforme pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4: Proporções e parâmetros estudados

Método	Fosfatidilcolina de ovo (mg)	Colesterol (mg)	Clorofórmio (mL)	Rotação (rpm)	Temperatura (°C)	Aspecto visual do filme
ML_A	70	10	20	90	Ambiente	Filme com mais regiões espessas do que delgadas
ML_B	70	10	20	150	Ambiente	Filme com mais regiões espessas do que delgadas
ML_C	70	10	20	280	Ambiente	Filme com algumas regiões espessas
ML_D	70	10	20	280	39	Filme praticamente todo delgado
ML_E	200	100	20	280	39	Filme praticamente todo delgado

Inicialmente fixamos a proporção dos constituintes do filme lipídico em 7:1 Fosfatidilcolina de ovo e Colesterol respectivamente, proporção essa obtida de acordo com a literatura (WONG, *et.al.*, 2003).

Para início dos testes, método denominado por ML_A, optou-se por evaporar o solvente de forma mais branda possível, através de uma baixa rotatividade, 90 rpm, e a temperatura ambiente, isso justificada através da baixa pressão de vapor do clorofórmio.

Para esse método, a remoção do solvente foi realizada com sucesso, no entanto, visualmente o filme lipídico formado apresentou várias descontinuidades, conforme podemos visualizar na Figura 17. Isso pode ser justificado, pois, com uma rotação branda, o solvente acaba por permanecer em contato com determinada região do balão por mais tempo, essa permanência, acaba por formar um filme mais espesso em algumas regiões e delgados em outras.



Figura 17: Foto de um filme descontínuo. As regiões circuladas em vermelho chamam a atenção para essa descontinuidade.

Através dos resultados obtidos no método ML_A, optamos por aumentar a velocidade de rotação para 150 e 280 rpm, métodos ML_B e ML_C respectivamente, e manter os demais parâmetros iguais ao método anterior, método ML_A. Essa escolha se justifica, pois, ao aumentar a velocidade de rotação, o solvente tende a evaporar mais rapidamente, além de ficar por menos tempo em cada região do balão, podendo então, formar um filme mais delgado em todas as regiões do balão (MONKKONEN, *et.al.*, 1994).

No entanto, o observado nos filmes gerados através dos métodos ML_B e ML_C foi uma diminuição das regiões formadas por um filme mais espesso, mas ainda houve a presença dessa heterogeneidade na formação da espessura do filme, sendo então indício de que apenas a velocidade de rotação não seria suficiente para evaporar o clorofórmio na velocidade necessária.

Desta forma, partiu-se por estudar um novo parâmetro, a adição de temperatura para a remoção mais rápida do solvente (ZHANG, 2011). Para esse estudo, utilizamos o método denominado por ML_D, onde mantivemos todos os parâmetros do método ML_C, proporção dos constituintes em 7:1 Fosfatidilcolina: Colesterol respectivamente, rotação de 280 rpm, alterando então, apenas a temperatura de ambiente para 39 °C.

Com a adição de temperatura ao processo, e uma rápida rotação, foi possível evaporar o solvente de forma muito rápida, permitindo desta forma, que a maior parte do filme formado, visualmente, se mostrou mais delgado, conforme pode ser visualizado na Figura 18.



Figura 18: Fotografias relativas às 3 etapas do procedimento ML_D obtendo um filme homogêneo. 1 etapa da solubilização da Fosfatidilcolina e Colesterol em Metanol. 2 etapa da evaporação do Clorofórmio e 3 obtenção do filme lipídico seco delgado.

No entanto, apesar de se conseguir formar um filme mais delgado, nas etapas posteriores, através de estudos iniciais de diminuição no tamanho da vesícula lipossomal, discutido no item 5.2.3 a estrutura do lipossoma se mostrou frágil, o lipossoma estava se rompendo muito facilmente e liberando o ativo encapsulado. Desta forma, sabendo que o componente do filme lipídico responsável por trazer resistência à estrutura do lipossoma é o Colesterol, (WANG, *et.al.*, 2005) optou-se por alterar em 2:1 a proporção de Fosfatidilcolina de ovo e Colesterol, respectivamente (NOMURA, *et.al.*, 2005), na formulação, método denominado por ML_E. Através dessa alteração, obteve-se então um filme lipídico mais delgado e um lipossoma mais resistente.

Frente a esses resultados promissores, os parâmetros estabelecidos nesta etapa do processo consistem em um filme lipídico de composição (m/m) 2:1 Fosfatidilcolina de ovo: Colesterol, com velocidade de rota-vapor para evaporação do clorofórmio de 280 rpm e temperatura de evaporação de 39 °C.

Apesar de estudos sobre a ausência de estímulo à oxidação lipídica quando se submete lipídeos a temperatura próxima a 50 °C (ZHANG, *et.al.*, 2011), sabe-se que fosfolipídeos são facilmente oxidáveis até mesmo a temperatura corporal

de 37 °C. Como sugestão para futuros projetos seria quanto a realização de ensaios de quantificação do fosfolípido de forma a garantir que o mesmo não sofreu oxidação durante o processo e desta forma preservar a permeabilidade inicial da membrana. Em casos onde for constatada essa oxidação, constituintes como alfa-tocoferol podem ser acrescentados a formulação para ajudar a prevenir tal oxidação lipídica (QUINN, *et.al.*, 2012).

5.2.2. Solução de hidratação e incorporação do Levofloxacino ao lipossoma

Esta etapa consiste na formação propriamente dita da vesícula lipossomal, e na incorporação do levofloxacino ao núcleo do lipossoma.

Para se obter uma hidratação eficaz e com uma alta porcentagem de encapsulamento, vários parâmetros como, escolha do meio, concentração de sólidos na suspensão, porcentagem de levofloxacino em relação ao filme lipídico, tempo e temperatura de hidratação podem influenciar (RODRIGUES, 2011; ZHANG, *et.al.*, 2011; VU, *et.al.*, 2013). Desta forma, estudamos cada um desses parâmetros, os quais estão apresentados resumidamente na Tabela 5.

Tabela 5: Estudo dos parâmetros e proporção dos constituintes no momento da hidratação do filme lipídico

Método	Massa de		Volume de	Tempo de	Temperatura de	% de
	filme	Massa de	tampão			
	lipídico (mg)	Levofloxacino (mg)	fosfato (mL)	agitação (min)	aquecimento(°C)	encapsulamento
ML_01	80	10	10	60	50	-
ML_02	160	20	50	60	60	-
ML_03	160	20	50	120	60	20,00 ± 0,67
ML_04	400	50	50	120	60	45,00 ± 0,89
ML_05	400	200	50	120	60	60,00 ± 1,00
ML_06	400	400	50	120	60	75,00 ± 0,73
ML_07	650	650	50	120	60	77,00 ± 0,94
ML_08	650	650	50	60	60	78,00 ± 1,32

Procurou-se escolher para a hidratação, um meio que fosse compatível com o organismo e no qual o levofloxacin seja solúvel, assim, optou-se por utilizar o Tampão fosfato 10 mmol/L, pH 7 (ZHANG, 2009).

Como o levofloxacin possui características hidrofílicas, a estrutura lipossomal, possibilita que o levofloxacin se localize em dois compartimentos, sendo eles, núcleo e superfície externa do lipossoma, pois ambas as regiões são formadas pelas “cabeças” polares dos fosfolípidos, conforme explicado anteriormente (MACHADO, *et.al.*, 2007).

De forma a verificar o comportamento do levofloxacin frente a essas duas possibilidades, iniciou-se o estudo pelo método, ML_01 com uma baixa proporção de ativo em relação a massa de filme lipídico, sendo 8:1 a proporção de massa de filme lipídico: levofloxacin, respectivamente (BERGER, 2001).

Com essa hidratação, foi observada a formação de aglomerados. Sabendo que o estímulo para que o filme lipídico forme as vesículas lipossomais é a presença do meio aquoso (RODRÍGUEZ, 2001), possíveis justificativas para essa ocorrência, seria a alta concentração de sólidos na suspensão, 9 mg/mL, não tendo estímulo suficiente para que o filme lipídico venha a formar vesículas. Outro possível parâmetro responsável pelo aglomeramento, seria com relação a temperatura de 50 °C não ser suficiente para promover o desprendimento eficaz do filme lipídico do fundo do balão (BERGER, 2001).

Com base nesse primeiro resultado obtido, optou-se por estudar no método ML_02 uma diminuição na concentração de sólidos da suspensão, 3,6 mg/mL, mantendo a proporção (m/m) de filme lipídico:levofloxacin de 8:1, aumentando então o volume do meio para 50 mL. Outro parâmetro alterado foi o aumento da temperatura para 60 °C, temperatura essa não influente para aumentar a oxidação lipídica (ZHANG, *et.al.*, 2011). Com essas alterações, a suspensão obtida apresentou uma menor quantidade de aglomerados, mas não a ausência em sua totalidade, tendo então por fim, uma hidratação não satisfatória.

Uma possível justificativa para tal evidencia, se refere ao tempo de hidratação ser inferior ao necessário para que todo o filme lipídico consiga se

desprender do fundo do balão e assim, possibilitar a formação das vesículas lipossomais (RODRÍGUEZ, *et.al.*, 2001).

Desta forma, um terceiro estudo, ML_03 foi realizado, onde o parâmetro ajustado foi o aumento no tempo de hidratação para 2 horas (CHAPMAN, *et.al.*, 1990), tomando o cuidado de manter os outros parâmetros conforme estudados em ML_02. A amostra gerada através da ausência de aglomerados se mostrou praticamente toda hidratada. Isso indicou nesse processo da necessidade de um maior tempo para que o filme lipídico consiga se desprender do fundo do balão a uma temperatura de 60 °C e permaneça em contato com o meio aquoso de forma a sofrer estímulo suficiente para a formação da vesícula lipossomal.

Como a amostra gerada por este método, ML_03 se mostrou promissora, após o final da hidratação, foi verificada a sua eficiência de encapsulamento, obtendo como resultado $(20,00 \pm 0,67)\%$ do levofloxacino encapsulado ao núcleo do lipossoma. Esse resultado mostrou uma grande dificuldade que o levofloxacino possui em se deslocar do meio externo para o núcleo do lipossoma. Isso é justificado por o meio externo, ser altamente hidrofílico, e também, por a parte externa do lipossoma apresentar características hidrofílicas. A literatura deixa claro que substâncias hidrofílicas apresentam na maioria das vezes uma baixa porcentagem de encapsulamento (BERGER, 2001).

Para um quarto teste, optou-se por estudar se realmente a proporção de sólidos apresenta influência na redução de aglomerados, (RODRÍGUEZ, *et.al.*, 2001) ou se a temperatura e tempo de hidratação é que foram responsáveis por tal redução. Para isso, no método ML_04 aumentou-se a massa de sólidos para 9 mg/mL, mantendo a proporção inicial (m/m) filme lipídico: levofloxacino de 8:1. Os demais parâmetros foram cuidadosamente mantidos conforme o teste anterior, ML_03.

A amostra gerada através desse quarto teste se mostrou bem hidratada sem a presença de aglomerados. Isso indicou que, a porcentagem de sólidos não foi fator responsável pelos aglomeramentos nas amostras anteriormente obtidas e sim, à temperatura e o tempo de hidratação.

Sabe-se que a alta concentração de sólidos pode influenciar no deslocamento de uma substância para o núcleo do lipossoma (BERGER, 2001). Como no método ML_04 essa concentração de sólidos foi aumentada, e a eficiência de encapsulamento também, pode-se concluir que nesse sistema, o fator de concentração é estimulante para promover o encapsulamento do levofloxacino. Desta forma, alta concentração de sólidos no meio de hidratação, serve de estímulo para que o levofloxacino se desloque de um ambiente hidrofílico sob alta concentração, meio de hidratação, para um ambiente hidrofílico onde a concentração está reduzida, ou seja, no núcleo do lipossoma.

Através dessa conclusão, optou-se por estudar no método ML_05, o aumento na concentração de sólidos na suspensão, para 12 mg/mL. Concomitantemente fez-se a alteração na proporção (m/m) de levofloxacino: filme lipídico para 1:2, pois uma maior quantidade de ativo disponível pode ajudar no deslocamento do equilíbrio (TIKSHDEEP, 2012).

Com essas alterações a eficiência de encapsulamento aumentou em 15,00%, confirmando então a teoria da alta concentração de sólidos para um estímulo ao levofloxacino em se deslocar de um meio mais concentrado, ou seja, o meio de hidratação; superfície externa do lipossoma, para um meio menos concentrado, o núcleo do lipossoma.

De forma a explorar ainda mais esse conceito, foram realizados mais 2 estudos, alterando a proporção em 1:1 (m/m) filme lipídico: levofloxacino. Com essa alteração foi obtido uma concentração no meio de hidratação de 16 mg/mL para o estudo ML_06 e 26 mg/mL para ML_07. Em ambos os estudos, a eficiência de encapsulamento aumentou em aproximadamente em 15%. Isso indica que o excesso de ativo para deslocar esse equilíbrio atingiu o seu máximo na proporção (m/m) de 1:1, filme lipídico: levofloxacino.

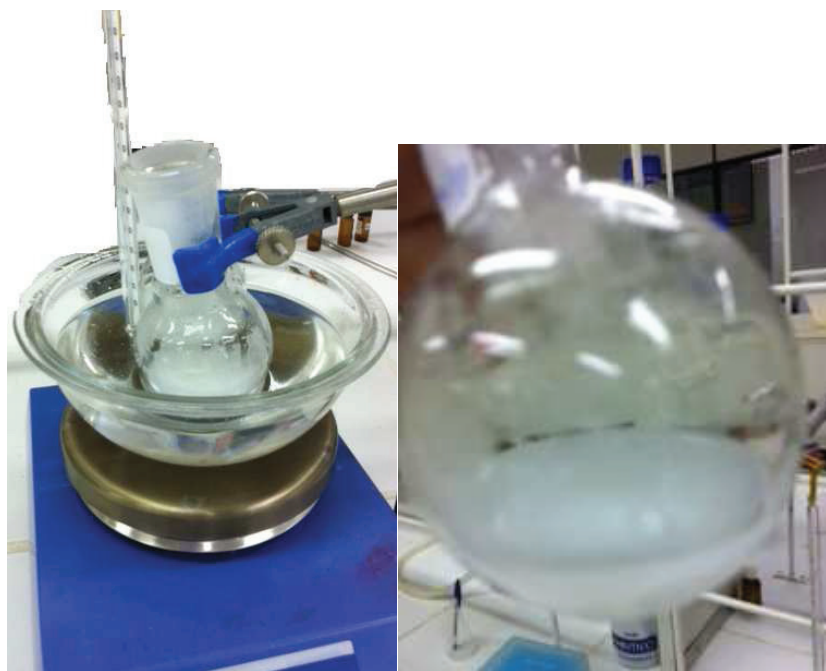
Um último estudo realizado, ML_08 se justificou pela observação durante os experimentos mostrando que com o tempo de hidratação de 1 hora, o aspecto visual da suspensão era o mesmo observado no tempo de 2 horas, para as amostras obtidas pelos métodos ML_05, ML_06 e ML_07. Esta observação foi estímulo para no método ML_08 estudar a real importância de se manter sob

hidratação por um tempo de 120 minutos, conforme presumido anteriormente. A amostra obtida em um tempo de hidratação de 60 minutos apresentou-se sem aglomerados e obteve um percentual de encapsulamento de 78%.

Com base nesse último resultado, foi concluído que os parâmetros que realmente interferiram nessa etapa do processo, foram: temperatura de hidratação, concentração de sólidos na suspensão e porcentagem (m/m) de levofloxacino em relação ao filme lipídico.

Os parâmetros definidos nesta etapa foram: proporção em massa de levofloxacino: filme lipídico de 1:1, sendo uma concentração de sólidos na suspensão de 26 mg/mL, hidratando sob agitação por um tempo de 1 hora a uma temperatura de 60 °C, denominado esse conjunto de parâmetros por ML_08.

Na Figura 19 podemos observar o momento da hidratação e visualizar o lipossoma totalmente hidratado.



A

B

Figura 19: Fotografias tiradas no momento da Hidratação. A mostra o momento da hidratação e a B mostra o final da hidratação.

5.2.3. Etapa de uniformização de tamanho das vesículas lipossomais

Devido a escolha do processo para formação do filme lipídico seco, os lipossomas formados no momento da hidratação desse filme de acordo com o método ML_08, apresentam vesículas multilamelares e com tamanhos de diâmetro próximo a 10,00 μm (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993; SULKOWSKI, *et.al.*, 2006). Em ANEXO 8.5, pode ser visualizada a curva que ilustra a distribuição no tamanho das vesículas lipossomais logo após o momento de hidratação. Nessa amostra 50,00% das vesículas apresentam um diâmetro médio de 4,39 μm e 90,00% das vesículas um diâmetro médio de 10,80 μm . Esse grande tamanho obtido é justificado devido ao lipossoma formado ser constituído por multilamelas. No entanto, estudos indicam que para que a vesícula lipossomal possa ter capacidade de penetrar a BHE através das junções entre as células endoteliais, o tamanho que essa vesícula deve apresentar se dá em torno de 100,00 nm (HASHIZAKI, 2003; WONG, *et.al.*, 2003).

Para conseguir reduzir o diâmetro da vesícula e garantir que o lipossoma permaneça estável, ou seja, não seja passível de se aglomerar em um curto espaço de tempo (MONKKONEN, *et.al.*, 1994), a formulação foi submetida a 3 diferentes processos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Processos estudados para redução do tamanho das vesículas lipossomais e seus respectivos tamanhos de partículas obtidos

Processo	Processamento	Tamanho de partícula (nm)
ML_09	Mini-extrusora com membrana de poro de 400 nm	510
ML_10	Extrusora a vácuo com membrana de poro de 100 nm	131
ML_11	Homogeneizador de alta pressão*	46 – 356 nm

* Estudo de várias pressões apresentados na Tabela 8

O primeiro método estudado para a redução das vesículas lipossomais foi através da Mini-extrusora. Para esse método optou-se por realizar um número ímpar de passagens pela membrana de forma a evitar uma possível contaminação da amostra por vesículas grandes que poderiam não ter passado pelo filtro (CHAPMAN, *et.al.*, 1990).

Através desse processo foi possível obter vesículas com raio hidrodinâmico médio no valor de $(255,00 \pm 0,78)$ nm, ou seja, um diâmetro de vesícula de $(510,00 \pm 0,78)$ nm. A curva de distribuição obtida através do Zeta Size, pode ser visualizada no ANEXO 8.6.

Como a membrana utilizada para esse processo apresentava um poro de diâmetro 400,00 nm, esperava-se obter um diâmetro de vesícula lipossomal de no máximo 400,00 nm, e foi encontrado em 510,00 nm, esse ligeiro aumento pode ser justificado pela influência que as moléculas de água de hidratação podem ocasionar, aumentando desta forma, o raio hidrodinâmico das vesículas (MONKKONEN, 1994).

Esse método se mostrou eficaz para o proposto, ou seja, em reduzir o tamanho das vesículas lipossomais. A força manual aplicada para que a amostra passasse pela membrana de 400,00 nm, se mostrou suficiente e proporcionou a redução pretendida com o uso dessa membrana. No entanto, com o equipamento disponível, o volume de amostra que se consegue por ciclo de extrusão é muito baixo, no máximo 1 mL, consequentemente, para um volume maior de amostra, esse método se mostra muito lento.

Visando que, o diâmetro desejado para a vesícula lipossomal seja próximo a 100,00 nm, outra dificuldade apresentada por essa técnica foi quanto a realização de uma extrusão manual, ou seja, a força necessária a ser aplicada para que os lipossomas consigam passar por uma membrana de poro de 100,00 nm é bem maior do que a que foi utilizada para uma membrana de 400,00 nm, inviabilizando então essa técnica para esse estudo.

De forma a tentar suprir essas duas dificuldades apresentadas, iniciou-se um estudo de redução do tamanho de vesícula lipossomal através do auxílio de uma extrusora a vácuo (CHAPMAN, *et.al.*, 1990).

Nesse sistema, um maior volume de amostra é possível de ser gerado por ciclo de extrusão, além da força do vácuo, facilitar a passagem dos lipossomas pela membrana de 100,00 nm.

Com este método uma curva unimodal foi obtida, representando vesícula lipossomal com diâmetro médio de tamanho de $(131,12 \pm 0,93)$ nm e um diâmetro médio em volume de $(134,64 \pm 1)$ nm. A curva de distribuição de tamanho de vesícula pode ser visualizada em ANEXO 8.7.

Apesar de o objetivo proposto ter sido atingido, ou seja, as vesículas estarem com tamanho próximo a 100,00 nm (JIN, *et.al.*, 2013), esse processo se mostrou inviável devido a uma limitação do sistema. Para que o sistema opere adequadamente, um volume constante de aproximadamente 20 mL de amostra necessita estar presente no compartimento de alimentação, de forma a permitir que a bomba de vácuo desempenhe o seu papel de forçar a passagem do lipossoma pela membrana. No entanto, essa exigência, impossibilita garantir que toda a amostra sofra o mesmo número de passagens pela membrana, sendo esse um fator importante a possibilitar uma maior estabilidade ao lipossoma (ZUIDAM, *et.al.*, 2003).

Frente a essa nova dificuldade, buscou-se estudar outro método para a redução do tamanho das vesículas, sendo utilizada, a alta pressão (MASSING, 2008; BACHMANN, 1993) exercida pelo equipamento para a redução no tamanho da vesícula lipossomal, ao invés da barreira, membrana com poro pré definido.

Como o parâmetro responsável por definir o tamanho das vesículas obtidas é a pressão exercida contra as mesmas (BACHMANN, 1993; RODRÍGUEZ, *et.al.*, 2001), fez-se necessário estudar mais detalhadamente esse parâmetro. Na Tabela 7 pode-se verificar as pressões estudadas por esse processo e os respectivos tamanhos das vesículas lipossomais obtidos através de análise por Nanophox.

Tabela 7: Parâmetros estudados para redução do tamanho de vesícula lipossomal através do método de Homogeneização de alta pressão

Processo	Pressão (bar)	Tempo (minutos)	Tamanho médio da vesícula lipossomal (nm)
ML_11.1	400	5	165,00 ± 0,98
ML_11.2	550	5	165,00 ± 0,76
ML_11.3	700	5	90,00 ± 0,85
ML_11.4	850	5	180,50 ± 1,00
ML_11.5	1000	5	64,00 e 290,00 ± 0,67
ML_11.6	1000	7	46,00 e 356,00 ± 0,87

Quanto maior a pressão sobre as vesículas lipossomais, maior a energia que as mesmas possuem para colidirem entre si e entre o cabeçote do equipamento (BACHMANN, 1993), levando à redução do diâmetro de vesícula. Por causa desta observação, fez-se um estudo variando a pressão exercida sobre as vesículas lipossomais de 400 a 1000 bar.

Inicialmente, o estudo foi feito aplicando-se uma pressão de 400 bar e as vesículas formadas apresentaram um tamanho médio de 165,00 nm. Um aumento de 150 bar, não foi suficiente para reduzir o tamanho dessas vesículas, permanecendo a média com 165,00 nm de tamanho.

Já com uma pressão de 700 bar, o tamanho médio foi reduzido para 90,00 nm. Embora este tamanho possa ser considerado adequado para o propósito deste projeto, buscamos verificar a possibilidade de se obter uma partícula com diâmetro menor ainda, e continuou-se o aumento das pressões. Observou-se então, que com pressões de 850 e 1000 bar, as vesículas lipossomais eram desestabilizadas, tendendo à agregação. Essa tendência pode ser visualizada através dos tamanhos de vesículas obtidos, 180,00 nm ao utilizar uma pressão de 850 bar e duas populações de 64,00 e 290,00 nm; 46,00 e 356,00 nm em 1000 bar.

De todas as técnicas estudadas nesta etapa, a que se mostrou mais vantajosa para obtenção de vesículas estáveis e com menor tamanho, foi o uso da alta pressão, sendo a de 700 bar, a mais adequada. As vesículas obtidas nestas condições compõem a amostra que denominamos ML_11. 3.

Segundo a literatura, quando a redução do tamanho das vesículas é realizada através da homogeneização de alta pressão, as vesículas multilamelares tendem a se tornar unilamelares pequenas (BACHMANN, 1993). Uma das formas de estudo futuro, para confirmar o número de lamelas que a vesícula lipossomal apresenta seria através da técnica de Microscopia por Criofatura (TIKSHDEEP, 2012), técnica essa que a partir de um corte da amostra previamente congelada, é possível de se verificar de forma íntegra a estrutura do lipossoma.

5.2.4. Lavagem das partículas de lipossomas para retirada do levofloxacino não encapsulado

Durante o processo de incorporação do Levofloxacino, nem todo o ativo é incorporado ao lipossoma.

Para que a formulação possa ser usada como sistemas de liberação, é necessária a remoção completa do fármaco não encapsulado e para isso, vários métodos têm sido empregados. Podemos citar a centrifugação, cromatografia de troca iônica, a ultrafiltração, cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia por adsorção (GABRIELLE-MADELMONT, 2003).

Para esse trabalho, dois dos métodos relatados acima foram estudados para a remoção do ativo não incorporado. O primeiro método estudado foi à centrifugação e o segundo foi à filtração através de cromatografia por adsorção. Este último é o mais utilizado e foi escolhido devido à sua simplicidade para execução, reprodutibilidade, pode ser usado para quantidades maiores de amostras, não promove alterações na amostra, além de permitir que as frações coletadas possam ser re-analisadas (SKOOG, *et.al.*, 2002).

Para o primeiro método de centrifugação, (MASSING, 2008) um estudo de tempo e velocidade foi realizado, conforme mostra Tabela 8. Esse estudo se fez

necessário na busca por uma força gravitacional adequada para conseguir fazer com que as vesículas, devido ao seu tamanho e por serem insolúveis ao meio de lavagem (PHARMACOPEIA, 2010; JENABIOSCIENCE, 2012) acabem por se sedimentarem, formando um corpo de fundo e o levofloxacinol por apresentar solubilidade ao meio de lavagem, permaneça disperso ao sobrenadante.

Tabela 8: Estudo de tempo versus velocidade de rotação para retirada de Levofloxacinol não encapsulado

Processo	Tempo (min.)	Velocidade (rpm)	Número de lavagens	Resultado
ML_13	60	14000	1	Rompimento dos lipossomas
ML_14	60	10000	2	Rompimento dos lipossomas
ML_15	20	8000	3	Rompimento dos lipossomas
ML_16	10	8000	3	Rompimento dos lipossomas
ML_17	10	5000	3	Rompimento dos lipossomas

Durante todos os estudos realizados de velocidade e tempo, com o aumento do número de lavagens, a intensidade da mancha visualizada em luz 365 nm era reduzida (Figuras 20 e 21). Esse fato indicava inicialmente que a lavagem estava sendo efetiva, e que o levofloxacinol que não foi encapsulado estava sendo retirado do meio.

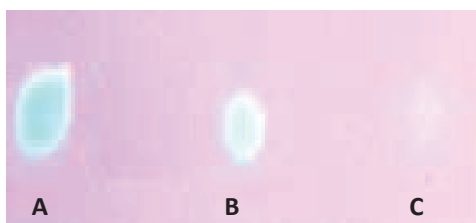


Figura 20: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Amostra preparada através do processo ML_15, A amostra do

sobrenadante da primeira lavagem, B amostra do sobrenadante da segunda lavagem e C amostra do sobrenadante da terceira lavagem.

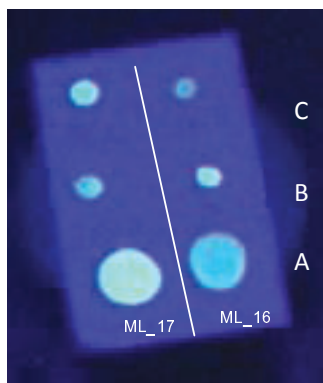


Figura 21: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Amostras preparadas através dos processos ML_16 e ML_17. A amostra do sobrenadante da primeira lavagem, B amostra do sobrenadante da segunda lavagem e C amostra do sobrenadante da terceira lavagem.

No entanto, como é de conhecimento, os lipossomas são estruturas extremamente frágeis (HASHIZAKI, 2003, ZUIDAM, 2003). Através dos testes realizados com a centrifugação, comprovou-se esse fato. Em todas as velocidades estudadas, 14000 – 5000 rpm, a força de centrifugação aplicada às vesículas lipossomais resultaram no rompimento dos lipossomas e com isso, liberação do levofloxacino encapsulado no meio de lavagem.

Desta forma, o que foi visualizado em luz UV inicialmente, se tratava de levofloxacino que não foi encapsulado. A conclusão de que os lipossomas se romperam, deu-se no momento em que foi observada a diminuição drástica do corpo de fundo nos insertos após cada centrifugação.

Frente a essa limitação da técnica, iniciou-se o estudo de retirada do levofloxacino livre por cromatografia de adsorção, através de interações intermoleculares.

Como na estrutura do levofloxacino existe a presença de átomos como F, N, O e a presença de anéis aromáticos, buscou-se estudar separar o levofloxacino

que não foi encapsulado através de possíveis interações que essa estrutura possibilita. Desta forma, escolheu-se como polímero para interagir com esses átomos o Divinilbenzeno com propileno (JENABIOSCIENCE, 2012; MOHAMMED, 2009).

Nesta escolha existe a possibilidade de dois tipos de interações: primeira do tipo dipolo-dipolo, entre os átomos F, N e O do levofloxacino com o H presente na estrutura do divinilbenzeno com propileno e segundo, do tipo interações hidrofóbicas devido a presença de anéis aromáticos tanto na estrutura do levofloxacino como na do recheio da coluna (MOHAMMED, 2009).

Pudemos comprovar de forma qualitativa que essa técnica foi bem sucedida, pois visualizamos em luz 365 nm apenas a amostra de metanol que foi utilizada para eluir o levofloxacino que havia ficado retido no recheio da coluna, conforme Figura 22.



Figura 22: Foto de placa cromatográfica revelada em luz UV no comprimento de onda de 365 nm. A amostra de ativo livre eluído com metanol; F amostra de formulação lipossomal eluído com tampão fosfato; M metanol e T tampão fosfato.

5.3. Caracterização dos lipossomas

Neste item, serão discutidas as caracterizações realizadas para as formulações lipossomais. Serão apresentados resultados obtidos para o tamanho

da vesícula lipossomal, Potencial Zeta para a carga superficial dos lipossomas, Microscopia de Transmissão, RMN de ¹H, Eficiência de encapsulamento, Citotoxicidade dos lipossomas frente a linhagem celular NG97, Estudo de passagem da formulação lipossomal por um modelo de barreira que mimetiza a BHE e por fim, um estudo de Estabilidade dos lipossomas quanto ao seu tamanho.

5.3.1. Medidas de tamanho das vesículas lipossomais

O tamanho da vesícula influencia tanto a biodistribuição quanto a eliminação das partículas após administração de formulações, mas esse parâmetro não é bem controlado e, em geral, é pouco discutido na maioria das publicações (MIRAHMADI, *et.al.*, 2010).

Dentre os mecanismos possíveis de interação entre os lipossomas e as células pode-se citar: adsorção a superfície celular, fusão com a membrana celular, pinocitose do fármaco, endocitose, formação de endossomas, entre outros.

Além dos mecanismos citados acima, o tamanho das vesículas também está diretamente relacionado com a possibilidade de passagem pela BHE através das junções justapostas (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993; FORLONI, *et.al.*, 2001). Várias discussões existem a respeito do melhor tamanho para que essa passagem seja bem sucedida, sendo que a maioria acredita ser tamanhos próximos a 100 nm (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993; MIRAHMADI, *et.al.*, 2010; VU, *et.al.*, 2013; LANCELOTTI, 2011). Desta forma, uma das principais caracterizações nesse trabalho se deu quanto ao tamanho de vesícula lipossomal obtida, de forma a buscar que o principal meio de interação seja através do tamanho da vesícula.

Diferentes técnicas são atualmente disponíveis para determinar tamanho de partículas menores que 1 µm. A Tabela 9, extraída de um artigo de revisão (GAUMET, *et.al.*, 2008), apresenta algumas das técnicas e resume suas principais características e limitações.

Tabela 9: Principais características de métodos para determinação de tamanho de partículas (GAUMET, *et.al.*, 2008)

Método	Princípio	Faixa de tamanhos	Limitações
LS	Interação de radiação	50 nm - 1 µm	Imprópria para populações muito polidispersas método indireto; grande influência de agregados ou partículas grandes; muitos parâmetros influentes.
LLD	Interação de radiação	1 – 1000 µm	Grande quantidade de amostra necessária; método indireto.
SEM, TEM	Microscopia	50 nm – 1000 µm	Dispendiosa em relação ao tempo; influência da preparação da amostra.
AFM	Microscopia	10 nm – 1 µm	Amostragem; não-automatizada; complexidade de realização; tratamento de imagem; subjetiva.
ANUC	Centrifugação		Processamento de dados complexo.
FFF	Eluição	20 µ - 1 µm	Difícil de manusear; otimização necessária para tipo de partícula.
CE	Eletroforese	20 – 500 nm	Complexidade de realização.
PCH, SEC	Cromatografia	< 100 nm	Longas etapas de otimização; dispendiosa em relação ao tempo.

LS: espelhamento de luz; LLD: difração de luz laser; SEM: microscopia eletrônica de varredura; TEM: microscopia eletrônica de transmissão; AFM: microscopia de força atômica; ANUC: ultracentrifugação analítica; FFF: fracionamento por fluxo em campo; CE: eletroforese capilar; PCH: hidrodinâmica de coluna empacotada; SEC: cromatografia por exclusão de tamanho.

Dentre todas as técnicas disponíveis optou-se por utilizar a de espalhamento de luz, por nos atender tecnicamente, estar disponível, além da necessidade de pouca amostra para análise.

Para essa técnica, a vesícula é considerada esférica. Assim, a presença de poucos agregados aumenta consideravelmente o resultado de tamanho médio. Além disso, diversos parâmetros podem influenciar o resultado das medidas como viscosidade, pH do meio, temperatura, concentração e sedimentação de partículas (GAUMET, *et.al.*, 2008).

Todas as análises foram realizadas mediante a autocorrelação das vesículas durante um tempo estimado de 60 segundos. Cada amostra é analisada por 5 vezes, permitindo então uma maior garantia dos resultados médios obtidos. O equipamento expressa o valor medido através do número ou da intensidade de volume medido.

Em ANEXO 8.8 pode-se visualizar uma das curvas de distribuição de tamanho da formulação que melhor se mostrou quanto ao tamanho (SAKAMOTO, *et.al.*, 1993), estabilidade e eficiência de encapsulamento. Para essa análise, uma curva unimodal foi obtida, representando que 10,00% da amostra apresenta 75,64 nm, 50,00% da amostra apresenta 91,51 nm. A média entre os resultados de tamanho médio pode ser considerada, $(90,50 \pm 0.70)$ nm e uma média geral em volume de $(92,10 \pm 0,27)$ nm, de acordo com os valores que compuseram o cálculo desta média. No entanto, isso não significa que as partículas possuem tamanho entre 91,20 e 89,8 nm, mas sim que os resultados de tamanho médio, obtidos em quintuplicata, são próximos.

Para a medida de tamanho de vesícula lipossomal vazia, sem o ativo, um valor de $(115,00 \pm 1,00)$ nm foi encontrado para número e $(116,00 \pm 0,81)$ nm para volume.

Observa-se então que ao encapsular o ativo ocorre uma ligeira diminuição no tamanho das vesículas. Uma das razões para este efeito considera a proposta de alguns autores sobre a acomodação do ativo no núcleo do lipossoma, de forma que a vesícula tende a se “fechar” para acomodar melhor o ativo (AGASHE, 2010).

Embora os resultados de tamanho médio por número e volume médio por intensidade sejam praticamente iguais, vale salientar que quando a amostra é

analisada com relação à intensidade, os resultados acabam sendo superestimados em relação às contribuições de agregados presentes no meio.

Quando analisado por número, a contribuição de uma pequena quantidade de agregados é praticamente desprezível (GAUMET, *et.al.*, 2008). No entanto, neste caso, por a amostra ter se mostrado com uma boa polidespersividade, tal diferença é pouco significativa.

5.3.2. Potencial Zeta

A importância de determinar o potencial zeta nas amostras lipossomais está na possibilidade de modular esta característica, de modo a serem obtidas vesículas mais estáveis quanto à agregação e fusão, e para fornecer informações sobre a interação entre lipossomas e fármacos neles carregados (HEATH, 1985; ZHANG, 2005).

Os lipossomas contendo levofloxacinó encapsulado apresentam carga superficial de $-15,10 \pm 0,92$ mV e para lipossomas vazios a carga apresentada é de $-20,00 \pm 1,00$ mV. (ANEXO 8.9 e 8.10)

Com relação às características superficiais de carga da formulação, os resultados das medidas de potencial zeta revelam que as vesículas são carregadas negativamente. Valores negativos de potencial zeta eram esperados para estas formulações, pois o fosfolípido, Fosfatidilcolina de ovo, confere superfícies negativamente carregadas às vesículas (LEVCHENKO, *et.al.*, 2002).

Quanto à carga superficial, não foram constatadas alterações significativas em decorrência da incorporação de levofloxacinó aos lipossomas, o que era esperado, já que em pH 7, apresenta-se, predominantemente, com seus grupos – COOH desprotonado ($-\text{COO}^-$) e o nitrogênio da amina terciária (anel piperazínico) encontra-se protonado ($-\text{R}_3\text{N}^+\text{H}$).

5.3.4. Microscopia de Transmissão (MET)

Esta análise de microscopia de transmissão tinha por objetivo verificar de forma qualitativa a presença de levofloxacin (cristais) que não foi encapsulado, através da observação de dois tipos de estrutura, uma representando o lipossoma e outra representando o levofloxacin. Algumas imagens obtidas estão representadas na Figura 23.

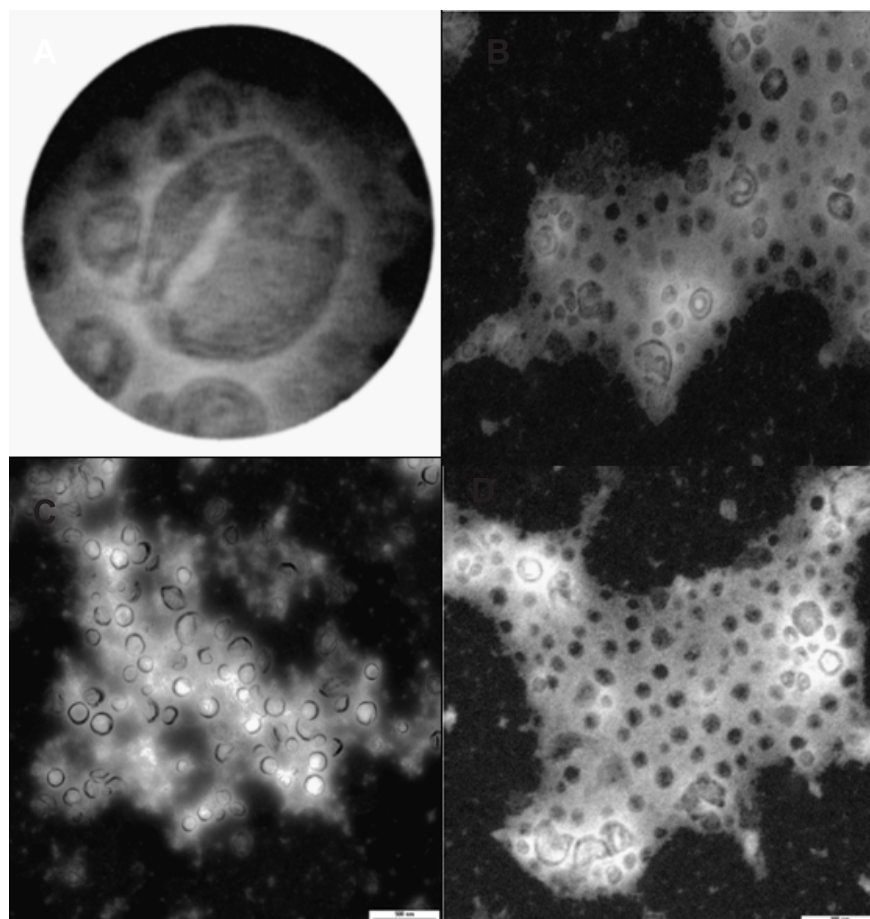


Figura 23: Imagens da Microscopia de Transmissão da formulação lipossomal varridas em diversas posições do stub. A- Imagem em maior aumento da vesícula lipossomal; B – Imagem de alguns lipossomas colapsados; C e D – Imagem da parte externa da vesícula lipossomal.

Foram analisadas diversas amostras, e em todas, observou-se a presença de estruturas esféricas, e algumas delas estando na sua forma colapsada. Não foi possível diferenciar entre lipossomas e levofloxacino, provavelmente devido a uma alteração estrutural na amostra durante o preparo da mesma.

Há uma série de inconvenientes para a técnica de MET. Muitos materiais requerem extensa preparação da amostra para produzir uma amostra fina o suficiente para ser transparente aos elétrons, o que torna análise por MET um processo relativamente demorado com um baixo volume de amostras (GLAESER, 2008). A estrutura da amostra também pode ser alterada durante o processo de preparação. Além de o campo de visão ser relativamente pequeno, aumentando a possibilidade de que a região analisada não pode ser característica de toda a amostra. Há um potencial que a amostra possa ser danificada por um feixe de elétrons, especialmente no caso de materiais que apresentem características biológicas, como o lipossoma (constituição de lipídios e colesterol) (RAJENDRAN, 2008).

Uma alternativa para se utilizar desta técnica com amostras que sejam sensíveis ao método de preparo seria fazer uso de Microscopia Crioelétrica (METs). Esta técnica permite visualizar moléculas mais sensíveis como estrutura molecular de proteínas e moléculas grandes, pois ocorre o congelamento da amostra, preservando desta forma sua estrutura, em uma grade e obtendo as imagens por detecção de elétrons transmitidos (TIKSHDEEP, 2012).

Por MET se tratar de uma técnica não conclusiva, e a não possibilidade de usufruir da METs, lançou-se mão da microscopia para caracterização das vesículas lipossomais.

5.3.5. Análise por RMN de Fluor

Sabendo-se que apenas na estrutura do Levofloxacino existe átomo de flúor e sua ausência na formulação lipossomal, optou-se por realizar uma análise de RMN de Flúor para verificar que modificações poderiam ser observadas nos espectros de levofloxacino encapsulado e não encapsulado.

Em ANEXOS 8.11 e 8.12 encontram-se os espectros obtidos do levofloxacin e da formulação lipossomal contendo o levofloxacin encapsulado. Para que o sinal do ^{19}F pudesse ser observado no espectro desta última, foram necessárias 128 varreduras, enquanto que para a amostra de levofloxacin, em mesma concentração que a anterior, foram necessárias apenas 8 varreduras.

Embora não possa ser utilizada para quantificação direta, esta observação sugere que a quantidade de levofloxacin livre na preparação lipossomal era muito baixa, pois foi necessário o acúmulo de detecção do flúor em 128 varreduras.

Nos Espectros combinados de RMN- ^{19}F em D_2O do Levofloxacin e da formulação contendo o ativo (Figura 24), existe uma observação importante a ser ressaltada que é o alargamento na base do sinal no espectro da formulação contendo o levofloxacin encapsulado, em relação ao levofloxacin puro. Esse alargamento do sinal está relacionado a um tempo de relaxação curto típico de materiais com baixa mobilidade, como no caso de macromoléculas (LEE, *et.al.*, 1997).

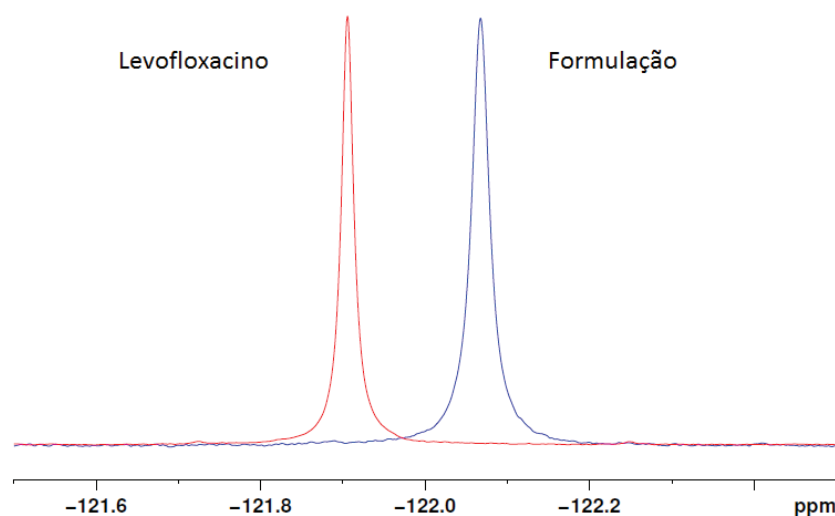


Figura 24: Espectros combinados de RMN- ^{19}F em D_2O do Levofloxacin (em vermelho) e da formulação contendo o levofloxacin (azul)

5.3.6. Eficiência de encapsulamento do Levofloxacino

Além da quantificação do Levofloxacino realizada logo após a obtenção das formulações lipossomais, quantificações posteriores foram realizadas para verificar a reprodutibilidade das mesmas.

A seguir, serão mencionadas as amostras denominadas por LP_30, LP_31, LP_32 e LP_33, todas as formulações são compostas por 33,30% de Fosfatidilcolina de ovo, 16,70% de Colesterol e 50,00% de Levofloxacino. O processo de preparo foi através da: formação do filme lipídico seco a 39 °C, 280 rpm; hidratação e incorporação do ativo a 60 °C por 1 hora redução do tamanho das vesículas por homogeneização de alta pressão a 700 bar, por recirculação de amostra a 5 minutos; retirada do ativo não encapsulado através de interação molecular com polímero.

Para essas formulações, LP_30, LP_31, LP_32 e LP_33 um total de 0,202 µg de Levofloxacino foram detectados em cada, considerando assim esse valor como 100,00% de ativo nas formulações. Os cromatogramas podem ser visualizados em ANEXOS 8.13 à 8.16.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos para as quantificações de levofloxacino que não conseguiram ser encapsulados, os cromatogramas podem ser visualizados nos ANEXOS de 8.17 à 8.20.

Tabela 10: Porcentagem de Levofloxacino não encapsulado

Formulação	Massa detectada (µg)	% de Levofloxacino não encapsulado
LP_30	0,044	21,70 ± 0,65
LP_31	0,044	21,70 ± 0,75
LP_32	0,045	22,30 ± 0,83
LP_33	0,045	22,30 ± 0,57

Para os ensaios de quantificação de levofloxacino que não conseguiram ser encapsulados, as formulações LP_30 e LP_31 apresentaram 0,044 µg de Levofloxacino, correspondendo a 21,7% de Levofloxacino que não foram encapsulados em cada formulação.

Já para as formulações LP_32 e LP_33 foram detectados 0,045 µg de Levofloxacino cada, correspondente a 22,3% de Levofloxacino livre em cada formulação.

Através destes resultados, concluímos que aproximadamente, $(78,00 \pm 0,30)$ % do levofloxacino da formulação foram encapsulados, um valor considerado satisfatório devido à característica hidrofílica do ativo e sua tendência em ficar disperso na fase aquosa da formulação (NOMURA, *et.al.*, 2005; PERKINS, 2000). Uma possível explicação para essa porcentagem de encapsulamento pode ser devido a utilização de alta pressão e velocidade empregadas no momento da redução das vesículas, favorecendo a entrada do levofloxacino ao núcleo do lipossoma, que corresponde à região mais hidrofílica da vesícula (BACHMANN, 1993), e também, pela alta concentração de sólidos no meio de hidratação favorecer que o levofloxacino prefira um meio hidrofílico que esteja menos concentrado, ou seja, no núcleo do lipossoma (BERGER, 2001).

5.3.7. Teste de citotoxicidade

Considerando que o modelo de barreira hemato-encefálica que será utilizado é composto por células da linhagem NG97, é necessário mostrar que a formulação lipossomal preparada não apresenta citotoxicidade para esta linhagem. Assim, o levofloxacino livre, a formulação contendo o mesmo e as vesículas lipossomais foram incubadas na cultura de células, conforme descrito na metodologia e não apresentaram citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular não se alterou em relação ao controle. Essa observação possibilitou a realização do teste com modelo de barreira que mimetiza a barreira hemato-encefálica, a ser discutido a seguir.

5.3.8. Estudo *in vitro* em modelo de barreira que mimetiza BHE

Este estudo teve por objetivo verificar *in vitro* se a formulação lipossomal consegue permear um modelo de barreira que mimetiza a BHE (LANCELLOTTI, 2011).

Sabe-se que a BHE apresenta junções celulares entre células endoteliais adjacentes de dois tipos: junções aderentes e oclusivas (BALLABH *et.al.*, 2004). Nas junções aderentes, proteínas caderinas se ligam ao esqueleto de actina das células endoteliais por meio de proteínas intermediárias, as cateninas (PETTY *et.al.*, 2002; BALLABH *et.al.*, 2004). Essa interação mantém as células adjacentes interligadas e é essencial para a formação das junções oclusivas (ABBOTT *et.al.*, 2010).

As junções oclusivas da BHE consistem num sistema mais complexo de proteínas transmembranas, as claudinas e as proteínas JAM (*Junctional adhesion molecule*), e citoplasmáticas, dentre as quais se destacam a ocludina. Tais proteínas formam um sistema interligado que interage com o esqueleto de actina da célula (BALLABH *et.al.*, 2004; ABBOTT *et.al.*, 2010). Por ser a principal causa da obstrução da via paracelular de transporte de solutos, esse tipo de junção é responsável pela principal função da BHE: o controle da permeabilidade do SNC (ENGELHARDT *et.al.*, 2009; ABBOTT *et.al.*, 2010).

Enquanto as células endoteliais constituem a barreira física de fato, interações que envolvem outros tipos celulares são importantes para uma BHE funcional. Acredita-se que os astrócitos, ou astroglia, são responsáveis pela indução e manutenção das propriedades dessa estrutura. O fato de o meio condicionado por este tipo celular induzir a formação de junções entre células endoteliais *in vitro* sugere a participação de um ou mais fatores solúveis derivados da glia no desenvolvimento da BHE (BALLABH *et.al.*, 2004; HASELOFF *et.al.*, 2005). Ainda, de acordo com o estudo publicado por JANZER e RAFF (1987), astrócitos, células da neurógliia, são capazes de induzir propriedades de BHE em células endotelial não-cerebrais.

Sabendo dessa interação celular, pesquisadores do Instituto de Biologia da UNICAMP, desenvolveram um modelo de barreira que mimetiza a BHE (LANCELLOTTI, 2011; PEREIRA, 2011), Figura 25.

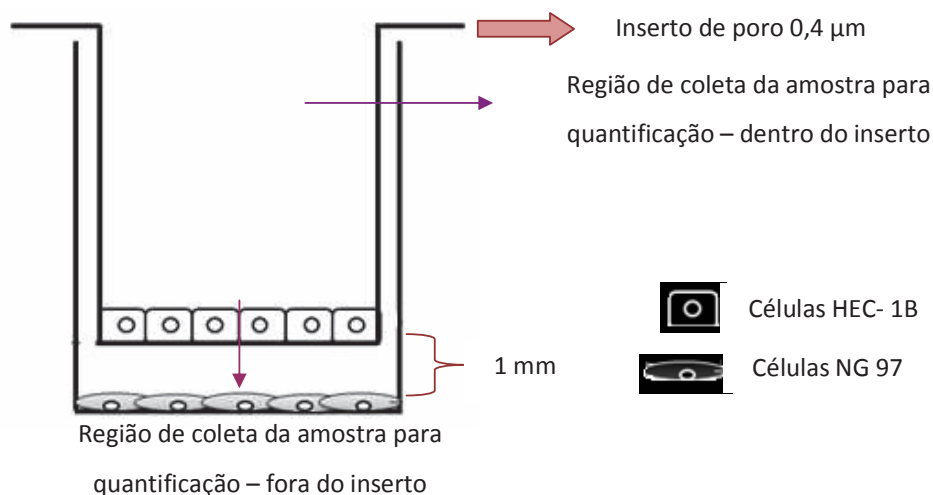


Figura 25: Modelo de barreira que mimetiza a BHE

Por ser um modelo inicial, limitações técnicas estão presentes, como por exemplo, uma das amostras a serem coletadas para quantificação serem retiradas do espaço de 1 mm que separa a camada de célula HEC-1B da camada de célula da NG-97, conforme pode ser visualizado na Figura 25.

Segundo LANCELLOTTI, *et.al.*, o ideal, seria que essas células HEC-1B e NG-97 estivessem em contato, ou seja, no lado de dentro do inserto ter uma camada de células endoteliais, e no lado de fora do inserto uma camada de células neuronais, em um arranjo do tipo sanduiche, separadas apenas pela parede do inserto que apresenta poro de 400 nm, (Figura 26).

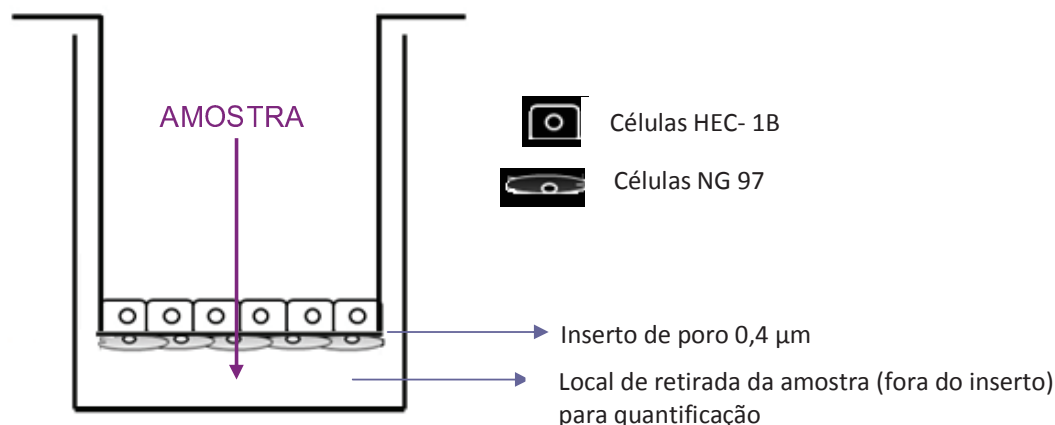


Figura 26: Modelo mimético de BHE, na forma sanduíche

Com esse modelo “sanduíche”, seria possível que a amostra retirada para quantificação fora do inserto representasse a passagem dos lipossomas pelas células HEC-1B e NG-97 concomitantemente e não apenas pela passagem da célula HEC-1B, como foi realizado.

No entanto, devido à dificuldade que as células apresentam para se aderirem na parte inferior externa do inserto, até o momento, tecnicamente esse sistema “sanduíche”, não se mostra viável.

Frente a essa inviabilidade e mesmo com a limitação apresentada pelo sistema atual, optamos por realizar o ensaio com o modelo desenvolvido por LANCELOTTI, *et.al.*, pois se percebe que essas células HEC-1B e NG-97 quando presentes no sistema, apesar de não estarem em contato direto, ocorre algum tipo de interação e as células passam a se comportar como uma barreira. Essa conclusão pode ser tirada através de um ensaio por infecção por *N. meningitidis*. A passagem do meningococo pelo modelo de barreira, proporcionou uma maior expressão de quimiocinas em células NG97 comparada a expressão de quimiocina a células NG97 e Hec-1B cultivadas isoladamente (LANCELOTTI, 2011).

No ensaio realizado coletamos 2 tipos de amostras: no inserto, ou seja, lipossomas que não conseguiram passar pela barreira, e fora do inserto, ou seja, lipossomas que permearam a barreira.

Na parte superior da Figura 27 pode-se evidenciar as amostras coletadas dos insertos, no tempo zero, visualizadas em luz UV 365 nm. Na parte inferior desta imagem, pode-se visualizar as amostras coletadas fora dos insertos (no espaço de 1 mm compreendido entre as células HEC-1B e NG-97), após 8 horas de início do teste, ou seja, que passaram pela barreira nesse período.

Nessa leitura, observa-se de forma qualitativa, que apenas a amostra contendo levofloxacino encapsulado em lipossomas, denominado por LP_14, fluoresce em ambos os compartimentos, ou seja, dentro e fora do inserto. Enquanto que o levofloxacino livre se mostra presente na amostra do inserto, mas não é visível na amostra fora do inserto. Essa informação corrobora com discussões que se tem na literatura quanto a dificuldade que o levofloxacino sozinho possui para passar pela BHE (FORLENZA, 2005; ZHANG, 2009).



Figura 27: Fotografia dos eppendorfs com os conteúdos e insertos (0 h) e dos poços (8 h) visualizados ultravioleta 365 nm.

Os resultados obtidos são promissores, indicando que o levofloxacino livre apresenta dificuldades para permear a barreira (ZHANG, *et.al.*, 2009), enquanto que na formulação lipossomal, esse transporte pareceu estar facilitado.

No entanto, a certeza de que a formulação lipossomal conseguirá atravessar a BHE através das junções justapostas só será possível, mediante teste *in vivo*, mas ainda não existe nenhum modelo desenvolvido (VU, *et.al.*, 2013).

Frente aos resultados qualitativos obtidos com esse ensaio, as amostras retiradas no inserto e fora dele foram quantificadas e os resultados serão apresentados a seguir.

5.3.9. Quantificação por HPLC das amostras estudadas *in vitro* pelo modelo de barreira hemato-encefálica

Ao término do ensaio da passagem pela barreira que mimetiza a BHE, as amostras foram coletadas fora e dentro do inserto no período de 1, 3, 8 e 24 h após o início do experimento e quantificadas por Cromatografia Líquida de alta eficiência.

Esta metodologia foi escolhida por ser bem difundida para quantificação de pequenas e grandes moléculas, por ser versátil, relativamente rápida e que não necessita de grande quantidade de amostra.

O cálculo para a quantidade correspondente a 100,00% de levofloxacino foi feito da seguinte maneira:

Cada inserto, continha 175 μL de suspensão lipossomal a 13000 $\mu\text{g/mL}$ de levofloxacino encapsulado, ou seja, 2275 μg de Levofloxacino.

Ao acrescentar 175 μL do meio, a concentração de levofloxacino em cada inserto passou a ser de 6500 $\mu\text{g/mL}$.

Após a coleta da amostra para quantificação as amostras de lipossomas foram rompidas com metanol, e posteriormente, diluições foram feitas, conforme descrito no item 4.5.7.1, de forma a se obter uma concentração de Levofloxacino teórica de 0,202 $\mu\text{g/mL}$, valor esse considerado como 100% para efetivação dos cálculos.

Conforme podemos visualizar na Tabela 11, após 1 hora do início do teste, apenas 0,025 μg de levofloxacino foram encontrados fora do inserto, correspondendo a 12,37% dos lipossomas contendo Levofloxacino que passaram pela barreira, restando, portanto 0,176 μg de levofloxacino encontrados no inserto antes da passagem (87,12%).

Após 3 horas, 0,045 μg de levofloxacino foram encontrados após a passagem pela barreira, fora do inserto, correspondendo a 22,27%, enquanto, 0,157 μg de levofloxacino foram encontrados no inserto, correspondendo a 77,72% que não conseguiram atravessar a barreira.

Com 8 horas de teste, 50,00% da formulação, (0,101 µg de levofloxacino) haviam conseguido passar pela barreira, e após 24h aproximadamente 69,00%, 0,140 µg de levofloxacino, havia passado pela barreira.

Tabela 11: Quantificação da amostra LP_14 obtida no teste de barreira

Tempo de coleta da amostra	Local da retirada da amostra	Massa (µg)	% de Levofloxacino encontrado
1 hora	Inserto*	0,176	87,12 ± 0,97
1 hora	Fora do inserto**	0,025	12,37 ± 0,76
3 horas	Inserto*	0,157	77,72 ± 0,93
3 horas	Fora do inserto**	0,045	22,27 ± 0,85
8 horas	Inserto*	0,102	50,49 ± 0,64
8 horas	Fora do inserto**	0,101	50,00 ± 0,57
24 horas	Inserto*	0,064	31,68 ± 1,00
24 horas	Fora do inserto**	0,140	69,31 ± 0,98

*Inserto: onde estavam alocadas as células HEC-1B

** Fora do inserto: espaço de 1mm entre a célula HEC-1B e NG-97

Esse resultado se mostrou satisfatório para o proposto, já que o Levofloxacino que não estava encapsulado pelo lipossoma apresentou dificuldades para permear a barreira, enquanto que o levofloxacino encapsulado pareceu estar facilitado à permeação.

Frente a essa informação, e sabendo que apenas 78% dos 650 mg de levofloxacino adicionados a 50 mL de formulação conseguem ser encapsulados, tem-se que 10,14 mg/mL (0,028 mmol/L) de levofloxacino estão disponíveis para passar a barreira. Desses, apenas 69,31% se mostraram factíveis de permearem a barreira, ou seja, 7,02 mg/mL (0,019 mmol/L). Como a concentração observada para inibir a agregação/fibrilogênese do peptídeo β-amilóide é de aproximadamente 0,200 mmol/L (HUBER, 2012), espera-se que um volume de

aproximadamente 10 mL da formulação seja suficiente para inibir a agregação de forma representativa.

Os Cromatogramas das análises temporais realizadas para cada uma das amostras retiradas dos insertos e fora dos insertos estão representadas nos ANEXOS 8.21 à 8.28.

5.3.10. Estabilidade do lipossoma frente ao seu tamanho

Alterações físicas, como agregação de vesículas, fusão entre bicamadas lipídicas e extravasamento de fármacos são fatores que afetam a vida útil de amostras lipossomais (ZHANG, 2005; ZUIDAM, 2003).

Um dos parâmetros importantes a ser acompanhado para vesículas lipossomais é sua estabilidade quanto ao tamanho inicial, pois quanto menor o tamanho da vesícula, maior é sua instabilidade e tendência a se agregar (MONKKONEN, *et.al.*, 1994).

Sabe-se que é possível promover a estabilização das vesículas lipossomais contra a agregação/fusão, adotando diferentes estratégias. Dentre elas, podemos citar a inclusão de lipídeos carregados negativamente, como fosfatidilglicerol e afins, na bicamada, ou ainda, o acoplamento de polímeros sintéticos hidrofílicos as bicamadas, como o poli(etileno glicol), formando lipossomas peguados (HASHIZAKI, 2003).

As vesículas lipossomais preparadas neste trabalho apresentam carga negativa, de acordo com os valores de potencial zeta, sugerindo então estabilidade. Entretanto, como o tamanho das partículas é pequeno (~100nm), um requisito para atravessar a BHE, estas poderiam então sofrer um processo de agregação, indicando assim uma baixa estabilidade. Desta forma, julgamos necessário fazer um estudo de estabilidade dessas vesículas de forma a garantir a melhor forma de armazenamento da formulação.

O estudo consistiu em medir periodicamente (período de 3 a 30 dias) o tamanho das vesículas lipossomais. Os resultados se encontram visualizados na Tabela 12.

Tabela 12: Tamanhos das vesículas lipossomais no período de 30 dias para estudo de estabilidade

Dias após preparo da amostra	Tamanho da vesícula lipossomal (nm)
0	90,56 ± 0,70
3	91,28 ± 1,25
10	105,40 ± 0,90
20	114,82 ± 1,12
30	116,32 ± 0,75

A primeira análise foi realizada imediatamente após o término da etapa de redução do tamanho das vesículas por homogeneização de alta pressão, conseguindo um tamanho médio de (90,56 ± 0,70) nm.

As demais análises foram realizadas 3 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias após a homogeneização, obtendo um tamanho médio de vesícula lipossomal de (91,28 ± 1,25) nm, (105,40 ± 0,90) nm, (114,82 ± 1,12) nm e (116,32 ± 0,75) nm, respectivamente.

O aumento das vesículas durante esses 30 dias foi de 25,76 nm. Através desta análise evidenciamos que não houve aumento considerável no tamanho das vesículas, indicando certa estabilidade do lipossoma (HEATH, *et.al.*, 1995). Essa estabilidade pode ser justificada pela carga superficial negativa que os lipossomas apresentam.

Os testes tiveram que ser interrompidos com 30 dias após o preparo da amostra, pois houve crescimento de micro-organismo, o que pode ser explicado por tal amostra não ter sido armazenada em frasco estéril.

Devido a essa interrupção, não foi possível concluir a melhor forma de armazenamento da formulação.

Nos ANEXOS 8.29 à 8.33, podem-se visualizar as curvas de distribuição de tamanhos das vesículas lipossomais obtidas.

6. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram preparadas diferentes formulações lipossomais contendo o antimicrobiano Levofloxacino.

Dentre todas as formulações estudadas, as que apresentaram eficiências de encapsulação de Levofloxacino mais elevadas foram às formulações com composição de Fosfolipídio (33,30%): Colesterol (16,70%): Levofloxacino (50,00%).

De forma a conseguir um filme lipídico delgado utilizou-se do método de preparo: a técnica da formação do filme lipídico seco e incorporação do levofloxacino de forma passiva sendo que os parâmetros estabelecidos nesta etapa do processo consistem de uma velocidade de rota-vapor para evaporação do clorofórmio de 280 rpm e temperatura de evaporação de 39 °C.

Para hidratação e incorporação do ativo, uma temperatura de 60°C em um tempo de 1h foi suficiente para permitir um encapsulamento de 78,00%.

A redução do tamanho das vesículas inicialmente formadas foi feita por homogeneização de alta pressão (700 bar). O tamanho médio das partículas foi próximo a 100,00 nm, atingindo desta forma o proposto para o projeto.

Os lipossomas preparados mostraram-se estáveis quanto à auto-agregação, por um período de 30 dias, de acordo com medidas temporais de tamanho de partícula. Esta estabilidade, apesar do tamanho pequeno ser favorável, pode ser atribuída à carga negativa das partículas -15,1 mV, por conterem fosfolipídeos em sua composição.

Estudos *in vitro* em modelo de barreira contendo células HEC-1 e NG97, mimetizando a BHE, mostraram que a formulação atravessa a barreira formada por essas células, sugerindo que a entrega de levofloxacino para o SNC é factível de ser estudada de forma mais específica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A., "Alzheimer's Disease". *Nature*, **(2011)**, 475, S2.

ABBOTT, N. J., PATABENDIGE, A. A. K., DOLMAN, D. E. M., "Structure and function of the blood-brain barrier", *Neurology of Disease*, **(2010)**, 37: 13-25.

AGASHE, H., LAGISETTY, P., AWASTHI, S., AWASTHI, V., "Improved formulation of liposome-encapsulated hemoglobin with an anionic non-phospholipid", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **(2010)**, 75 573–583.

ALZ, <http://www.alz.org/> (acesso em 20/01/2013).

ALZ FORUM, www.alzforum.org (acesso em 02/09/2012).

ALZHEIMER MED, <http://www.alzheimermed.com.br> (acesso em 10/01/2013).

ASHBURN, T., THOR, K., "Drug repositioning: identifying and developing new uses for Existing Drugs", *Nature Reviews Drug Discovery*, **(2004)**, 3, 8: 673–83.

BACHMANN, D.; BRANDL, M.; GREGORIADIS, G., "Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer", *International Journal of Pharmaceutics*, **(1993)**, 91, 69-74.

BALLABH, P., BRAUN, A., NEDERGAARD, M., "The blood-brain barrier : an overview Structure, regulation, and clinical implications", *Neurobiology of Disease*, **(2004)**, 16 :1-13.

BARENHOLZ, Y., BOMBELLI, C., BONICELLI, M.G., PROFIO, P., GIANANTI, L. MANCINI, G., PASCALE, F., "Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes", *Journal of Colloid and Interface Science*, **(2011)**, 356 46–53.

BASU, S., C., BASU, M., "Liposome Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, **(2002)**, 199, 3-23.

BEHERA, T., SWAIN, P., SAHOO, S.K., "Antigen in chitosan coated liposomes enhances immune responses through parenteral immunization", *International Immunopharmacology*, **(2011)**, 11 907–914.

BERGER, N.; SACHESE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M., "Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics", *International Journal of Pharmaceutics*, **(2001)**, 223, 55-68.

BHOSLE, D.; BHARAMBE, S.; GAIROLA, N.; DHANESHWAR, S. S., "Mutual Product Concept: Fundamentals and Applications", *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, **(2006)**, 68 (3), 286-294.

BIBL, M., WILTFANG, J., "Diagnostic and prognostic needs in neurodegenerative disorders: focus on proteomics", *Expert Review of Proteomics*, **(2008)**, 5(2), 153.

CABEÇA, L. F., "Topologia de Complexos Formados entre Drogas/ β -Ciclodextrinas/Lipossomas/Células, Aplicando Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear – RMN", Tese de Doutorado – Unicamp, **(2009)**.

CARRILLO, M. C., BLACKWELL, A., HAMPEL, H., LINDBORG, J., SPERLING, R., SCHENK, D., SEVIGNY, J. J., FERRIS, S., BENNETT, D. A., CRAFT, S., HSU, T., KLUNK, W., "Early risk assessment for Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, **(2009)**, 5, 182.

CHAPMAN, C.J.; ERDAHL, W.L.; TAYLOR, R.W.; PFEIFFER, D.R., "Factors affecting solute entrapment in phospholipids vesicles prepared by the freeze-thaw

extrusion method: a possible general method for improving the efficiency of entrapment”, *Chemistry and Physics of Lipids*, **(1990)**, 55, 73-83.

CHEN, Y. R., HUANG, H. B., CHYAN, C. L., SHIAO, M. S., LIN, T. H., CHEN, Y. C., “The effect of Abeta conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy”, *The Journal of Biochemistry*, **(2006)**, 139(4), 733.

CHEOW, W.S.; HADINOTO, K., “Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspect*, **(2010)**, 370, 79–86.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I., “O processo de latenciação no planejamento de fármacos”, *Química Nova*, **(1999)**, 22, doi: 10.1590/S0100-40421999000100014.

CONTESTABILE, A., “Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives”, *Current Pharmaceutical Design*, **(2001)**, 1, 553.

DAHLGREN, K. K., MANELLI, A. M., STINE, W. B. JR., BAKER, L. K., KRAFFT, G. A., LADU, M. J., “Endocytic pathways mediating oligomeric A β 42 neurotoxicity”, *Journal of Biological Chemistry*, **(2002)**, 277 (35), 32046.

EVANS C. G.; WLSÉN, S.; GESTWICKI, J. E., “Heat shock proteins 70 and 90 Inhibit early stages of Amyloid β -(1-42)”, *The Journal of Biological Chemistry*, **(2006)**, 281 (44), 33182.

EVERTS, R. J., SPEERS, D., GEORGE, S. T., “*Neisseria lactamica* Arthritis and Septicemia Complicating Myeloma”, *Journal of Clinical Microbiology*, **(2010)**, 48 (6): 2318.

FORLENZA, O. V., "Tratamento farmacológico da doença de Alzhemeir", *Revista de Psiquiatria Clínica*, **(2005)**, 32(3), 137.

FORLONI, G.; LAURA COLOMBO, L.; GIROLA, L.; TAGLIAVINI, F.; SALMONA, M., "Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies *in vitro*", *FEBS Letters*, **(2001)**.

GABRIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, N., "Synthesis, characterization and pharmaceutical application of selected copolymer nanoparticles", *Journal Biochemical Biophysical Methods*, **(2003)**, 56, 189-217.

GAETA, A.; Hider, R. C., "The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy", *British Journal of Pharmacology*, **(2005)**, 146, 1041-1059.

GAGGELLI, E.; KOZLOWSKI, H.; VALENSIN, D.; VALENSIN, G., "Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis)", *Chemical Reviews*, **(2006)**, 106(6).

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F., "Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters", *European Journal Pharmaceutics. Biopharmaceutics*, **(2008)**, 69, 1-9.

GLAESER, R.M., "Cryo – electron microscopy of biological nanostructures", *Physics Today*, **(2008)**, 61, i1, 48.

GOBBI, M.; RE, F.; CANOVI, M.; BEEG, M.; GREGORI, M.; SESANA, S.; SONNINO, S.; BROGIOLI, D.; MUSICANTI, C.; GASCO, P.; SALMONA, M.; MASSERINI, M. E., "Lipid-based nanoparticles with high binding affinity for amyloid-b1e42 peptide", *Biomaterials*, **(2010)**, 31, 6519 e 6529.

GOTTSCHALDT, M., SCHUBERT, U. S., "Prospects of Metal Complexes Peripherally Substituted with Sugars in Biomedical Applications", *Chemistry A European Journal*, DOI: 10.1002/chem.200802013.

GUO, L., FAN, L., PANG, Z., REN, J., REN, J., LI, J., CHEN, J., WEN, Z., JIANG, Z., "TRAIL and doxorubicin combination enhances anti-glioblastoma effect based on passive tumor targeting of liposomes", *Journal of Controlled Release*, **(2011)**, 154 93–102.

GUO, Q.; LI, S.; GADDAM, S. S. K.; JUSTICE, N. J.; ROBERTSON, C. S.; ZHENG, "Amyloid precursor protein revisited Neuron-specific expression and highly stable nature of soluble derivatives", *The Journal of Biological Chemistry*, **(2012)**, 287(4), 2437.

HANUS, L.H.; PLOEHN, H.J. "Conversion of Intensity-Average Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Average Particle Size Distributions", *Theoretical Development Langmuir*, **(1999)**, 15, 3091 – 3100.

HASELOFF, R. F., BLASIG, I. E., BAUER, H., C., "In search of the astrocyte factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro", *Cellular and Molecular Neurobiology*, **(2003)**, 25 (1): 25-39.

HASHIZAKI, K., MORAN, R., "Effects of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposomal bilayer membranes." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **(2003)**, 51, 815.

HEATH, T.D.; LOPEZ, N.G., PAPAHAZIOPOULOS, D., "The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-y-aspartate to cells *in vitro*", *Biochimica et Biophysica Acta*, **(1985)**, 820, 74-84.

HEBERT, L. E., SCHERR, P. A., BIENIAS, J. L., BENNETT, D. A., EVANS D. A., "Alzheimer Disease in the US Population", *Archives of Neurology*, **(2003)**, 60, 1119.

HUBER, P.C., "Avaliação do efeito de agentes antimicrobianos na inibição da agregação do peptídeo β -amilóide", Dissertação de Mestrado IQ - Unicamp, **(2012)**.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO 10993), **(2013)**, Part 1, 13.

JANOFF, A.S., "Liposomes – Rational Design", *Marcel Dekker*, **(1999)**, 220-259.

JANZER, R. C., RAFF, M. C., "Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells", *Nature*, **(1987)**, 325: 253-257.

JENABIOSCIENCE, <http://www.jenabioscience.com> (Acesso em 20/01/2012).

JIN, P., KIM, J.-A., CHOI, D.-Y., LEE, Y.-J., JUNG, H. S., HONG, J. T., Anti-inflammatory and anti-amyloidogenic effects of a small molecule, 2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal in Tg2576 Alzheimer's disease mice model", *Journal of Neuroinflammation*, **(2013)**, 10(1), 1-13.

KERNS, E. H.; DI L., "Drug-like properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization", *Academic Press*, **(2008)**, 426-438.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L., "Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs", *Structure*, **(1999)**, 7, 3.

KUNG, H. F. "Biomarkers for the early diagnosis of Alzheimer's disease: The challenge of XXI century", *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **(2012)**, 3, 265.

LANCELOTTI, M ; PEREIRA, R. F. C. “ Kit de Mimetismo de barreira hematoencefálica humana”, Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI018110022861, data de depósito: 17/06/2011, **(2011)**, Brasil.

LEE, M.; DURST, R.A.; Wong, R.B., “Comparison of liposome amplification and fluorophor detection in flow-injection immunoanalyses”, *Analytica Chimica Acta*, **(1997)**, 354, 23-28.

LEE, S., KIM, S.H., PARK, M., BAE, S., “High prevalence of multiresistance in levofloxacin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **(2013)**, 76,227–231.

LEE, Y.J., CHOI D.Y., CHOI I.S., KIM K.H., KIM Y.H., KIM H.M., LEE K., CHO W.G., JUNG J.K., HAN S.B., HAN J.Y., NAM S.Y., YUN Y.W., JEONG J.H., OH K.W., HONG J.T., “Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB *in vitro* and *in vivo* models”, *Journal of Neuroinflammation*, **(2012)**, 9, 35.

LESCHER, G. Y.; FROELICH, E. D.; GRUET, M. D.; BAILEY, J. H.; BRUNDAGE, R.P., “1,8 – Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents”, *Journal of Medicinal Pharmaceutical Chemistry*, **(1962)**, 5, 1063.

LEVCHENKO, T.S., RAMMOHAN, R., LUKYANOV, A.N., WHITEMAN, K.R., TORCHILIN, V.P., “Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating”. *International Journal of Pharmceutics*, **(2002)**, 240, 95-102.

LI, W.Y.; XUAN, C.S., “Study of fluorescence characteristics of the charge-transfer reaction of quinolone agents with bromanil”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **(2009)**, 71, 1769-1775.

LV ,Q., LI , L. , HAN, M., TANG, X., YAO, J., YING, X., LI, F., GAO, J., “Characteristics of sequential targeting of brain glioma for transferrin-modified cisplatin liposome”, *International Journal of Pharmaceutics*, **(2013)**, 444 1– 9.

MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W., “Liposomes applied in pharmacology: a review”, *Estudos de Biologia*, **(2007)**, 29(67), 215-224.

MANCINO, A. M.; HINDO, S. S.; KOCHI, A.; LIM, M. H. “Effects of Clioquinol on Metal-Triggered Amyloid- β Aggregation Revisited”, *Inorganic Chemistry*, **(2009)**, 48, 9596.

MASSING, U.; CICKO, S.; ZIROLI, V., “Dual asymmetric centrifugation (DAC) – A new technique for liposome preparation”, *Journal of Controlled Release*, **(2008)**, 125, 16-24.

MEDICINA GERIÁTRICA, www.medicinageriatrica.com.br (acesso em 11/07/2013).

MINEUR, Y.S., “Genetic Models of Alzheimer’s Disease”, *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, **(2008)**, 539-544.

MIRAHMADI, N., BABAEI, M.H., VALI , A.M., DADASHZADEH, S., “Effect of liposome size on peritoneal retention and organ distribution after intraperitoneal injection in mice”, *International Journal of Pharmaceutics*, **(2010)**, 383 7–13.

MOHAMMED, A. A., “Analytical profile of drugs and Substances”, **(2009)**, 34, 265-298.

MOJTAHEDZADEH, M. , PANAHI, Y., FAZELI, M. R., NAJAFI, A., PAZOUKI, M. , NAVEHSI, B. M. , BAZZAZ, A. , NAGHIZADEH, M. M., BEIRAGHDAR, F., “ Intensive care unit-acquired urinary tract infections in patients admitted with

sepsis: etiology, risk factors, and patterns of antimicrobial resistance”, *International Journal of Infectious Diseases*, **(2008)**, 12, 312—318.

MONKKONEN, J.; VALJAKKA, R.; HAKASALO, M.; URTTIGO, A. “The effects of liposome surface charge and size on the intracellular delivery of clodronate and gallium *in vitro*”, *International Journal of Pharmaceutics*, **(1994)**, 107, 189-197.

MOURTAS, S.; CANOVI, M.; ZONA, C.; AURILIA, D.; NIARAKIS, A.; FERLA, B. L.; SALMONA, M.; NICOTRA, F.; GOBBI, M.; ANTIMISIARIS, S. G., “Curcumin-decorated nanoliposomes with very high affinity for amyloid-b1-42 peptide”, *Biomaterials*, **(2011)**, 32, 1635 e1645.

NATIONAL INSTITUTE OF AGING (Crédito da Figura), <http://www.nia.nih.gov/> (Acesso em 06/04/2013).

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. <http://www.nih.gov/> (acesso em 12/04/2013).

NAZEM, A.; MANSOORI, G. A., “Nanotechnology Solutions for Alzheimer’s. Disease: Advances in Research Tools, Diagnostics Methods and Therapeutic Agents”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, **(2008)**, 13, 199-223.

NOMURA, S.M., MIZUTANI, Y., KURITA, K., WATANABE, A., AKIYOSHI, K., “Changes in the morphology of cell-size liposomes in the presence of cholesterol: Formation of neuron-like tubes and liposome networks”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **(2005)**, 1669 164– 169.

NOTEBOOK SCIENCE,

<http://lxsrv7.oru.edu/~alang/onsc/solubility/allsolvents.php?solute=cholesterol>
(Acesso em 10/02/2012).

PARK, S.; LEE, E.O.; JUNG, B.K.; KIM, J.D., "The microfluidity and dissolution of hydrogenated PC liposome anchored with alkyl grafted poly(amino acid)s", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **(2011)**, 391, 170-178.

PEREIRA, R. F.C., "Estabelecimento de modelos celulares para análise *in vitro* dos mecanismos de virulência de *Neisseria Meningitidis*", Dissertação de Mestrado IB – UNICAMP, **(2011)**.

PERKINS, W.R., "Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds", *International Journal of Pharmaceutics*, **(2000)**, 200, 27-39.

PETTY, M. A., LO, E. H., "Junctional complexes of the blood-brain barrier permeability changes in neuroinflammation", *Progress in Neurobiology*, **(2002)**, 68, 323.

PHARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª. Edição, **(2010)**.

PRICE, K. A.; CROUNCH, P. J.; DONNELLY, P. S.; MASTERS, C. L.; WHITE, A. R.; CURTAIN, C. C. , "Membrane-targeted strategies for modulating APP and A β -mediated toxicity", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **(2009)**, 13(2), 249.

PROX, J.; RITTGER, A.; SAFTIG, P. "Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin", *Experimental Brain Research*, **(2012)**, 217, 331.

QUINN, P.J., "The effect of tocopherol on the structure and permeability of phosphatidylcholine liposomes", *Journal of Controlled Release*, **(2012)**, 160 158–163.

RAJENDRAN, V., "*Engineering Physics*", McGraw-Hull Education, **(2008)**.

RAPOPORT, S. I., NELSON, P. T., "Biomarkers and evolution in Alzheimer disease", *Progress in Neurobiology*, **(2011)**, 95(4), 510–513.

RODRÍGUEZ, R.B.; SABÉS, M., "Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer", *International Journal of Pharmaceutics*, **(2001)**, 213,175-186.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S., "Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias", *Materials Research Bulletin*, **(2003)**, 6(3), 317.

SAKAMOTO, A.; IDO, T., "Liposome targeting to rat brain:effect of osmotic opening of the blood-brain barrier", *Brain Research*, **(1993)**, 629, 171-175.

SÁNCHEZ, T.S.; ARMESTO, I.D., "Participation of interleukin 1 and interleukin 6 in the aetiopathogenesis of Alzheimer's disease", *Reviews Neurology*, **(2001)**, 33(7), 648-652.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B., "Lipossomas: a bala mágica acertou?", *Química Nova*, **(2002)**, 25, 1181-1185.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., "Princípios da Análise Instrumental", 5ª. Ed., São Paulo: Artmed editora, **(2002)**, 836.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A., "Fármacos no combate a tuberculose: passado, presente e futuro", *Química Nova*, **(2005)**, 28(4), 678.

SUŁKOWSKI, W.W., PENTAK, D., NOWAK, K., SUŁKOWSKA, A., “The influence of temperature and pH on the structure of liposomes formed from DMPC”, *Journal of Molecular Structure*, **(2006)**, 792–793, 257–264.

TAGLIAVINI, F., MCARTHUR, R.A., CANCIANI, B., GIACCONE, G., PORRO, M., BUGIANI, M., LIEVENS, P.M.-J., BUGIANI, O., PERI, E., DALL'ARA, P., ROCCHI, M., POLI, G., FORLONI, G., BANDIERA, T., VARASI, M., SUARATO, A., CASSUTTI, P., CERVINI, M.A., LANSEN, J., SALMONA, M. AND POST, C.; “Effectiveness of Anthracycline Against Experimental Prion Disease in Syrian Hamsters”, *Science*, **(1997)**, 276, 1119-1122.

TAYEB, H. O.; YANG, H. D.; PRICE, B. H.; TARAZI, F., “Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors”, *Pharmacology & Therapeutics*, **(2012)**, 134, 8.

TIKSHDEEP, C.; SONIA, A. BHARAT, P. ABHISHEK, C., “Liposome Drug Delivery: A Review”, *Internacional Journal of Pharmaceutical and Chemical sciences*, **(2012)**, 1(3) – 754 -764.

VU, H.T., SHIMANOUCHI, T., ISHIKAWA, D., MATSUMOTO, T., YAGI, H., GOTO, Y., UMAKOSHI, H., KUBO, R., “Effect of liposome membranes on disaggregation of amyloid _ fibrils by dopamine”, *Biochemical Engineering Journal*, **(2013)**, 71 118– 126.

WANG, X.Y., ISHIDA, T., ICHIHARA, M., KIWADA, H., “Influence of the physicochemical properties of liposomes on the accelerated blood clearance phenomenon in rats”, *Journal of Controlled Release*, **(2005)** 104 91–102.

WILQUET, V.; DE STROOPER, B., “Amyloidy-beta precursor protein processing in neurodegeneration”, *Current Opinion in Neurobiology*, **(2004)**, 14, 582.

WILSON, C. O.; GISVOLD'S, O.; BLOCK, J. H.; BEALE, J. M., " *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*", Philadelphia: Ed. Lippincott Williams e Wilkins, **(2004)**, 11.

WONG, J.P.; YANG, H.; BLASETTI, K.L.; SCHNELL, G.; CONLEY, J.; SCHOFIELD, L.N., "Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection", *Journal of Controlled Release*, **(2003)**, 92, 265-273.

ZATTA, P.; DRAGO, D.; BOLOGNIN, S.; SENSI, S. L." Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy". *Trends Pharmacological Sciences*, **(2009)**, 30(7), 346.

ZHANG, H., WANG, Z., GONG, W., LI, Z., MEI, X., LV, W., "Development and characteristics of temperature-sensitive liposomes for vinorelbine bitartrate", *International Journal of Pharmaceutics*, **(2011)**, 414, 56– 62.

ZHANG, X., SCHERPHOF, G.L., KAMPS, J.A., "Liposome opsonization" *J. Liposome Research*, **(2005)**, 15, 109 -139.

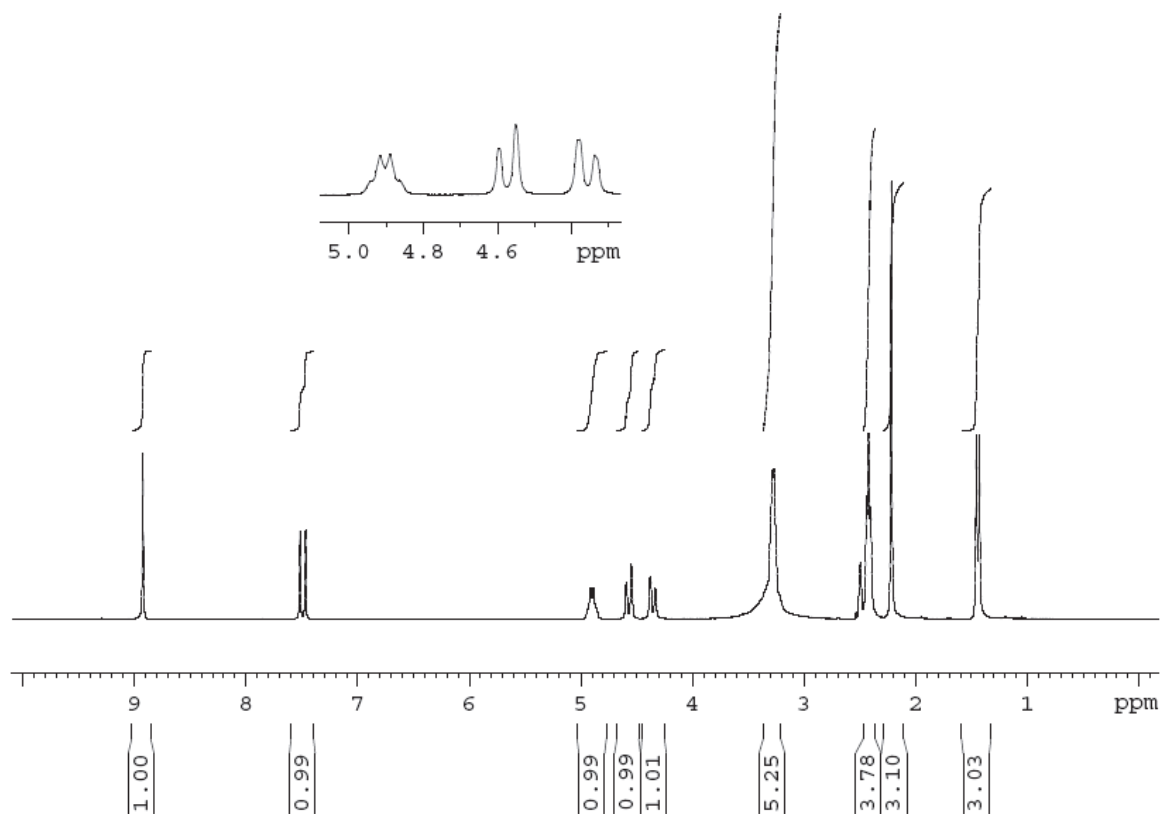
ZHANG, X.; SUN, P.; BI, R.; WANG, J. ZHANG, N.; HUANG, G., "Targeted delivery of levofloxacin-liposomes for the treatment of pulmonary inflammation", *Journal of Drug Targeting*, **(2009)**, 17(5), 399-407.

ZUIDAM, N.J., "Stability, storage, and sterilization of liposomes em: Torchilin, V.P. and Weissig, V., *Liposomes*", Oxford University Press, Oxford, **(2003)**, 2nd ed., 149-165.

8. ANEXOS

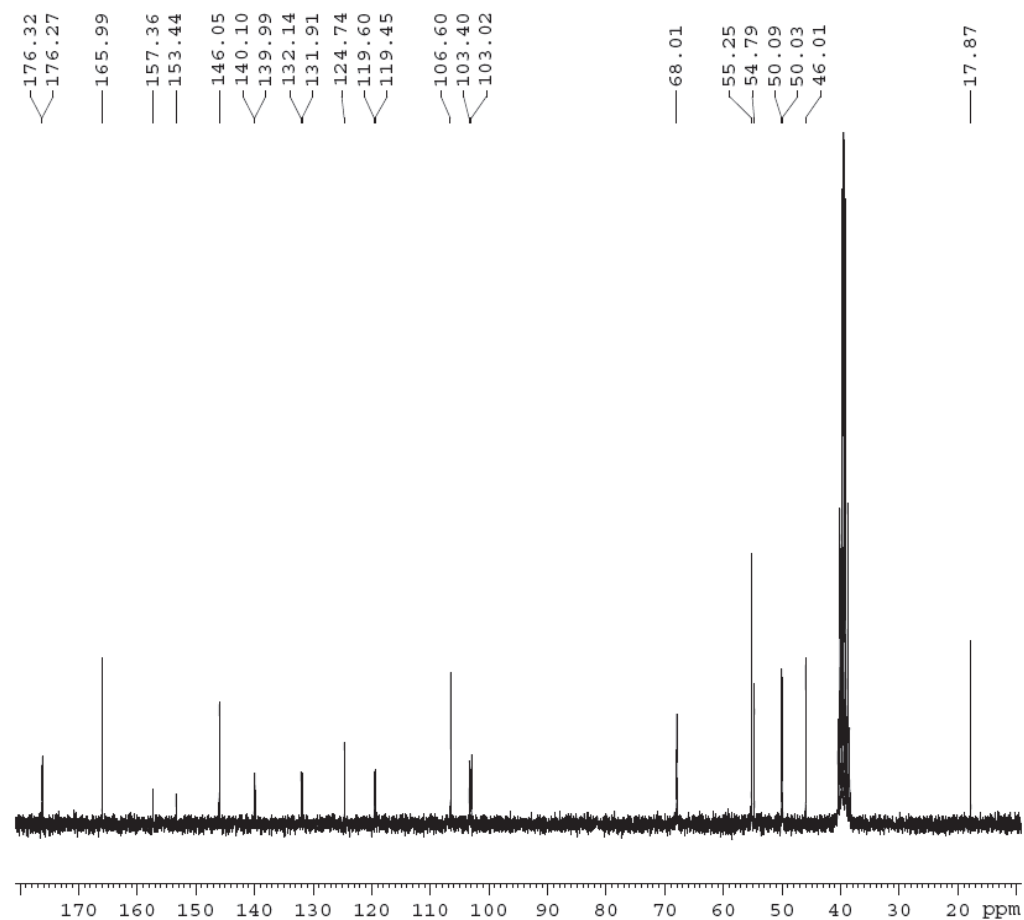
8.1. Espectro de RMN – ^1H do Levofloxacin (250 MHz, CDCl_3)

Cibele "LV01" $\text{cdcl}_3/250\text{mhz}$ ago26wanH1

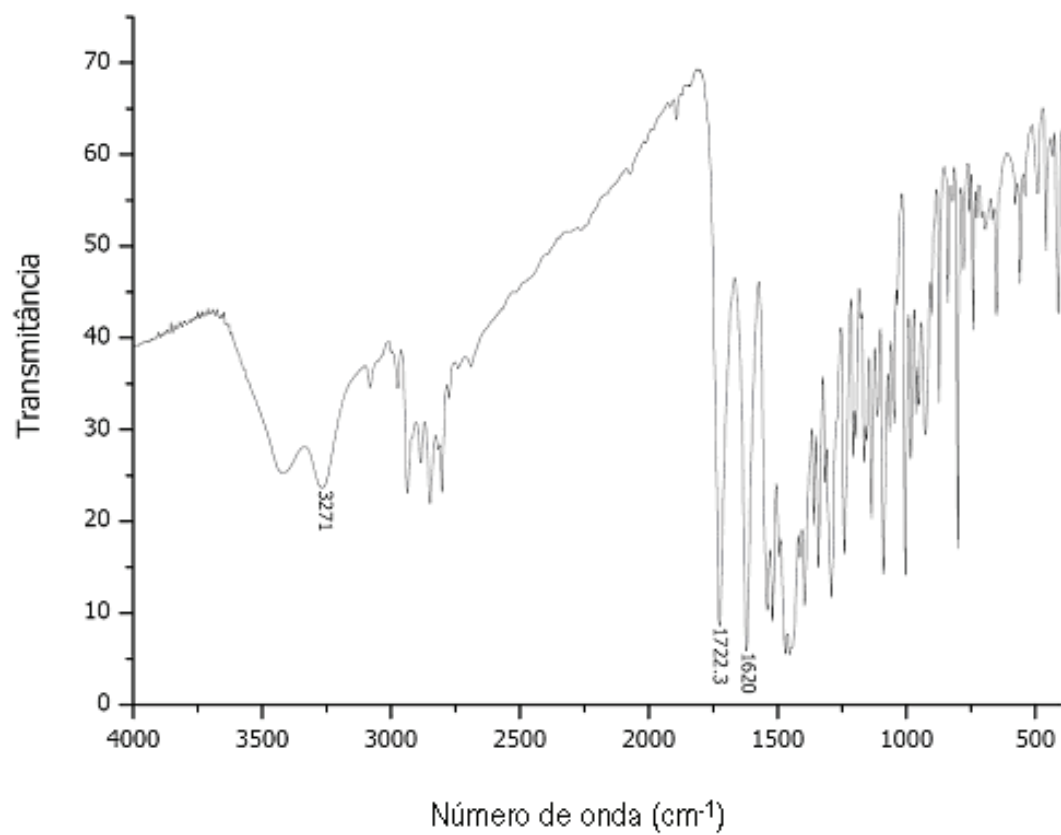


8.2. Espectro de RMN- ^{13}C do Levofloxacin em (62,5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

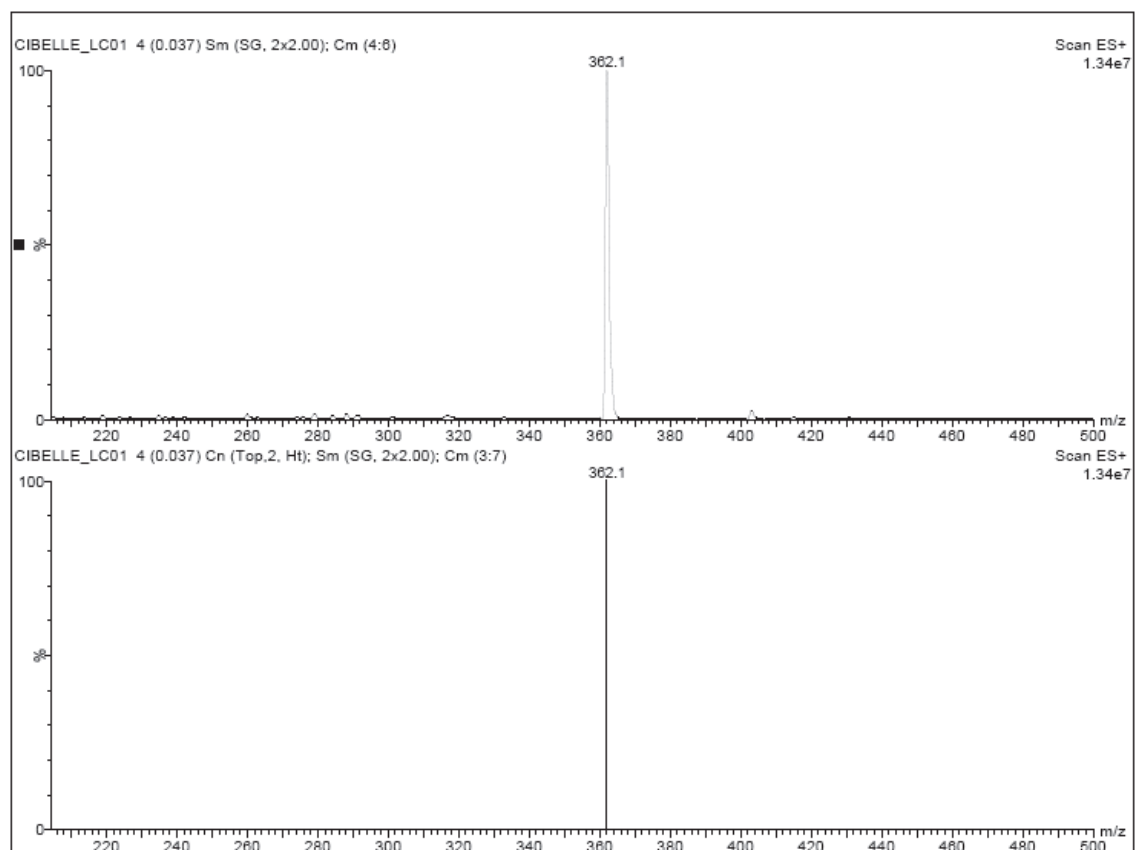
Cibelle LV-01 - DMSO - Bruker 250 MHz - ago30wanC1



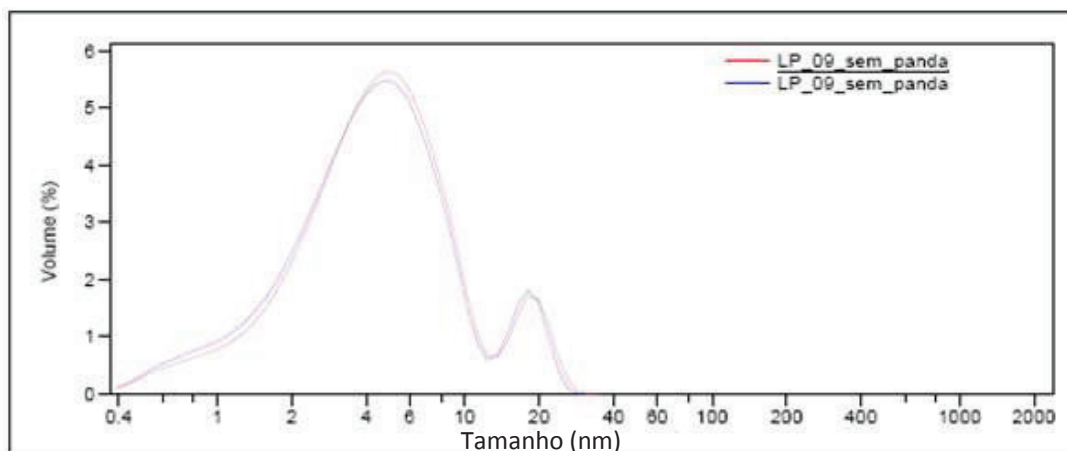
8.3. Espectro de infravermelho (KBr, cm^{-1}) do Levofloxacin



8.4. Espectro de Massas (baixa resolução) do levofloxacin: amostra (superior), padrão (inferior)

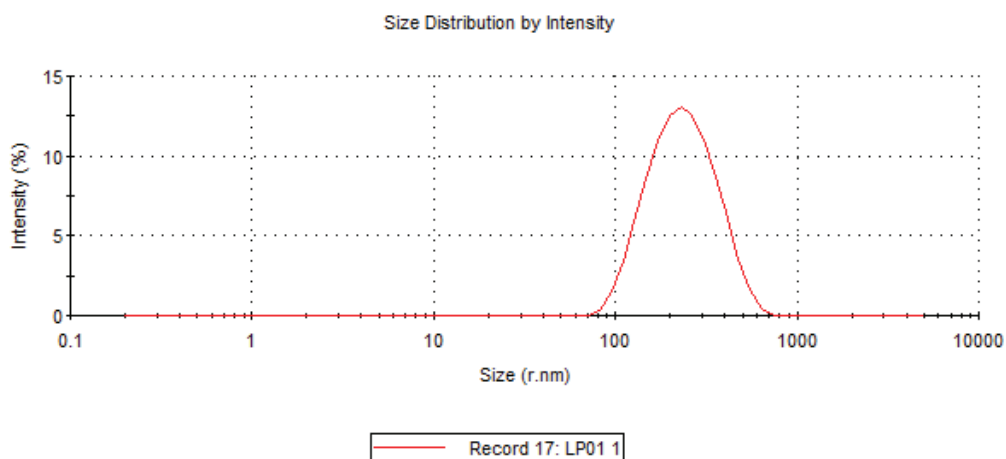


8.5. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal sem a redução do tamanho da vesícula, logo após o momento de hidratação

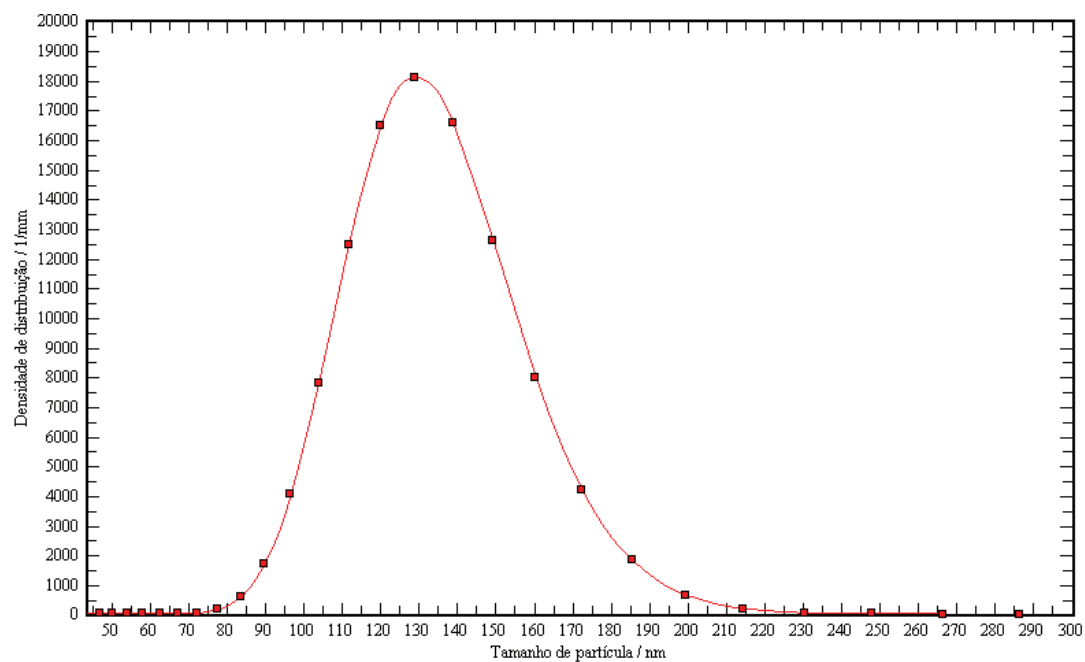


8.6. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal da formulação obtida através da redução do tamanho das vesículas por Mini extrusora, membrana de 400 nm

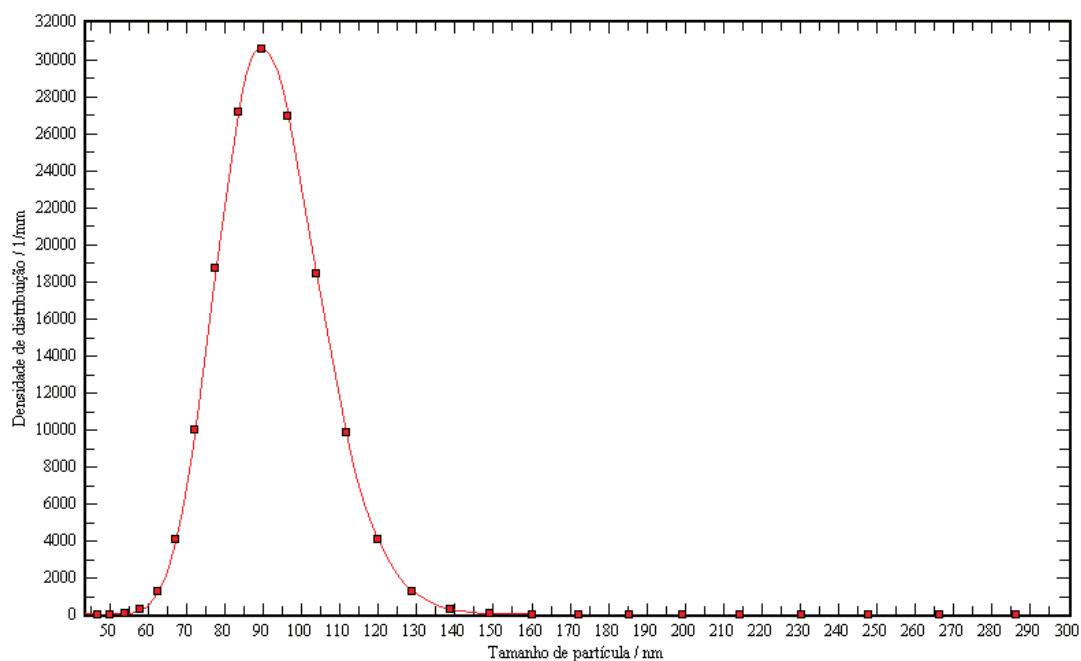
	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 195,6	Peak 1: 250,3	100,0	104,3
Pdl: 0,204	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,841	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



8.7. Distribuição de tamanho da vesícula lipossomal da formulação obtida através da redução do tamanho das vesículas por Extrusora a vácuo, membrana de 100 nm

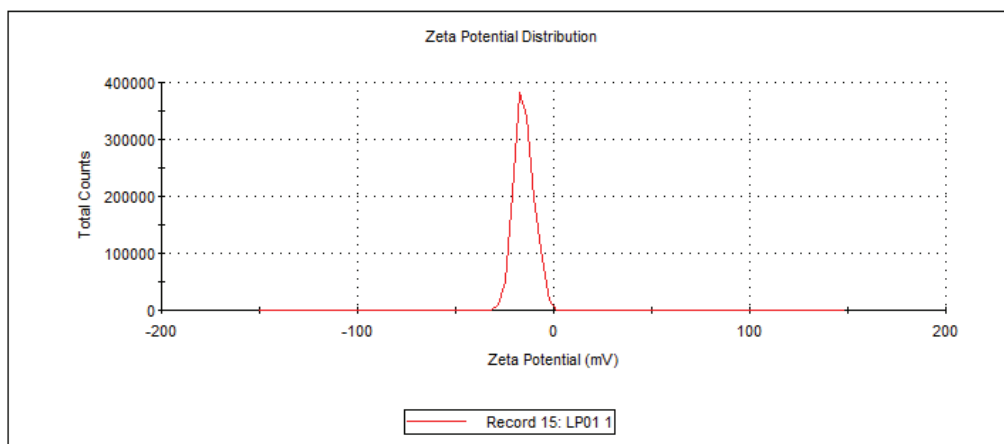


8.8. Distribuição de Tamanho de vesícula lipossomal obtida pelos processos ML_E para a formação do filme lipídico seco, método ML_08 para a etapa de hidratação do filme lipídico e incorporação do Levofloxacino e método ML_11.3 para a redução do tamanho das vesículas lipossomais



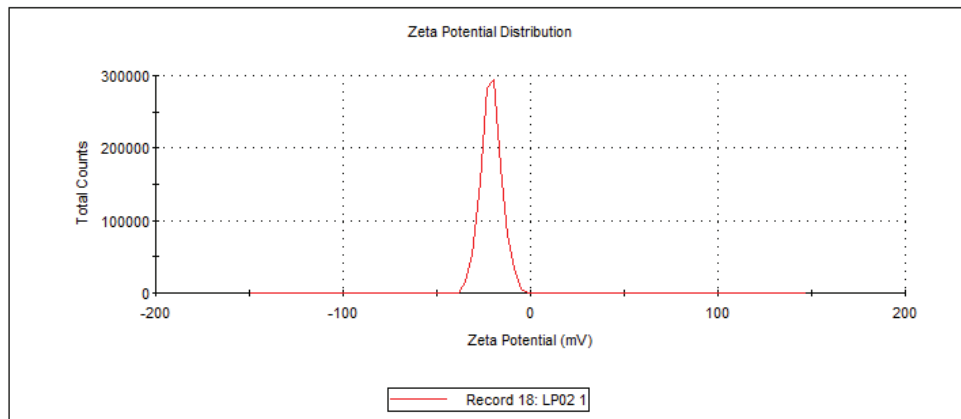
8.9. Potencial Zeta – Formulação lipossomal

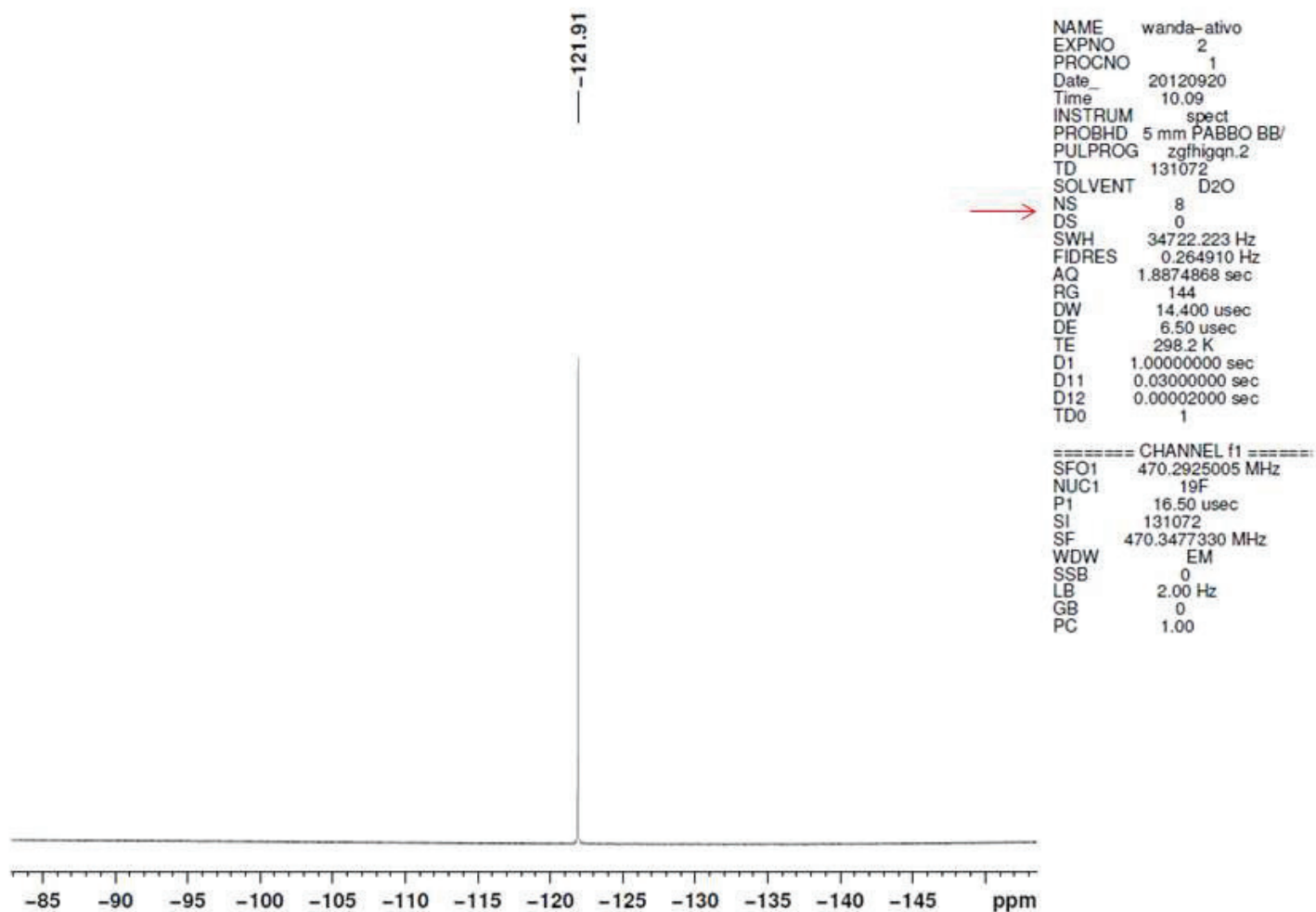
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -15,1	Peak 1: -15,1	100,0	4,90
Zeta Deviation (mV): 4,90	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,236	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			

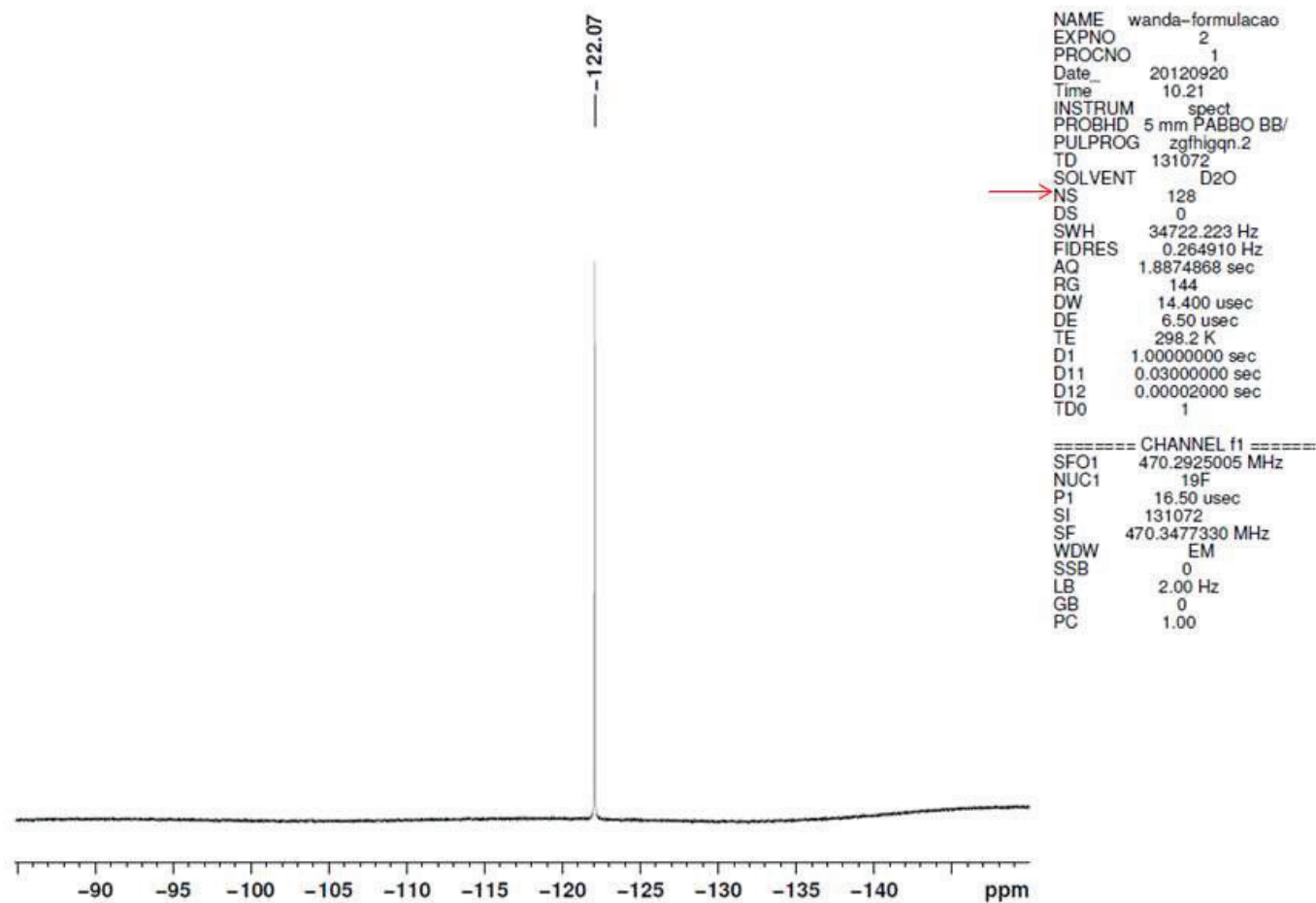


8.10. Potencial Zeta – Lipossomas vazios

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -20,9	Peak 1: -20,9	100,0	5,50
Zeta Deviation (mV): 5,50	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0996	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



8.11. Espectro de RMN-19F do Levofloxacinó em D₂O. Em destaque o número de varreduras realizadas (NS = 8)

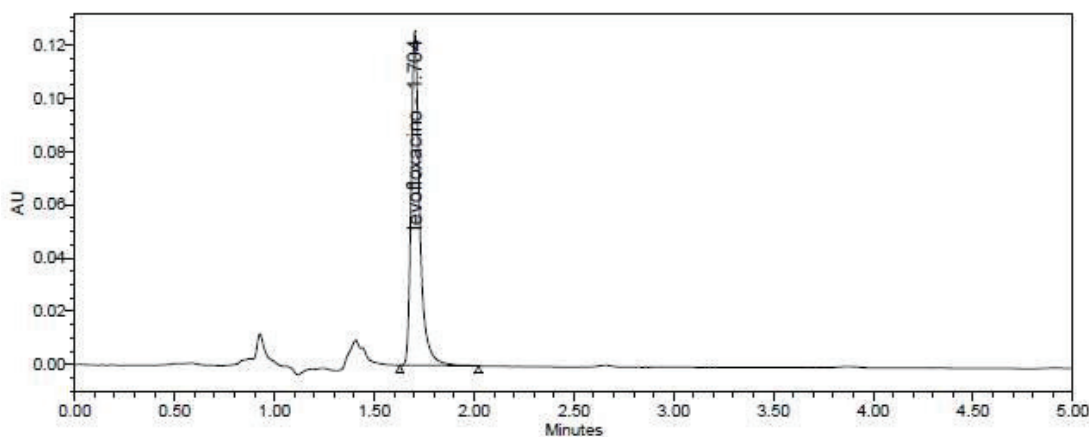
8.12. Espectro de RMN-19F da formulação em D₂O. Em destaque o número de varreduras realizadas (NS = 128)

8.13. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total da amostra LP_30

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	19fev-am1	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	1	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm

Date Acquired: 2/19/2013 8:57:41 AM BRT
Date Processed: 2/19/2013 12:03:29 PM BRT



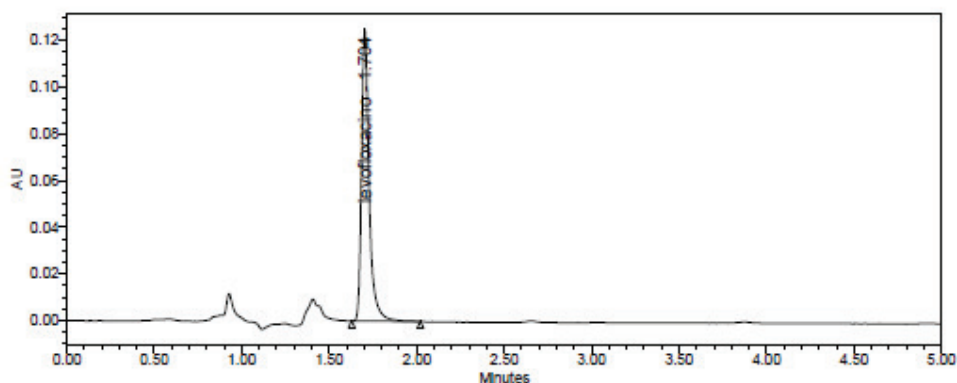
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1732;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.704	376910	100.00	125152	0.202	ug

8.14. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total da amostra LP_31

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am12	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	12	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 10:00:58 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		

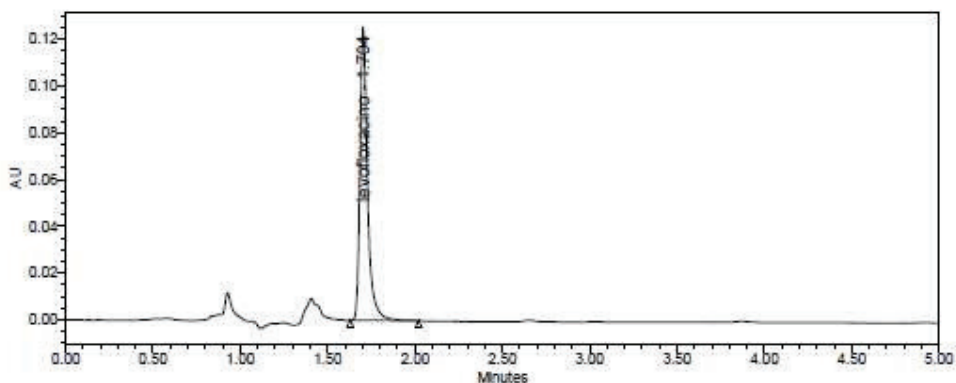


Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1721;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm								
	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.704	378910	100.00	125152	0.202	ug

8.15. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total de amostra LP_32

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am13	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	13	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 10:06:44 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



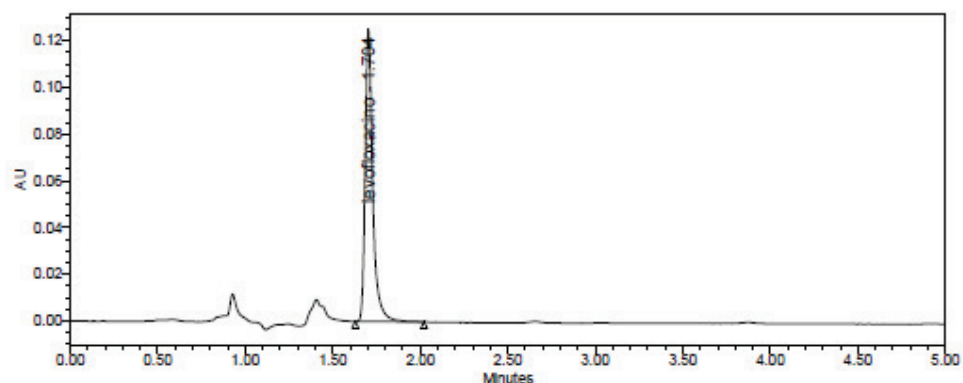
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1720;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.704	376910	100.00	125152	0.202	ug

8.16. Eficiência de Encapsulamento - Cromatograma de quantificação total de amostra LP_33

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am14	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	14	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 10:12:29 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



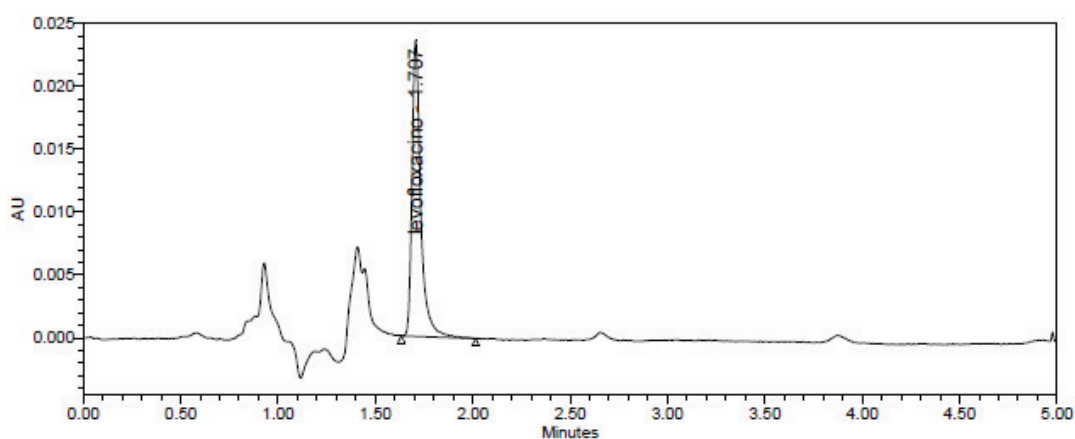
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1719;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.704	378910	100.00	125152	0.202	ug

8.17. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino não encapsulado na formulação LP_30

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am2	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	2	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacino_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:03:26 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



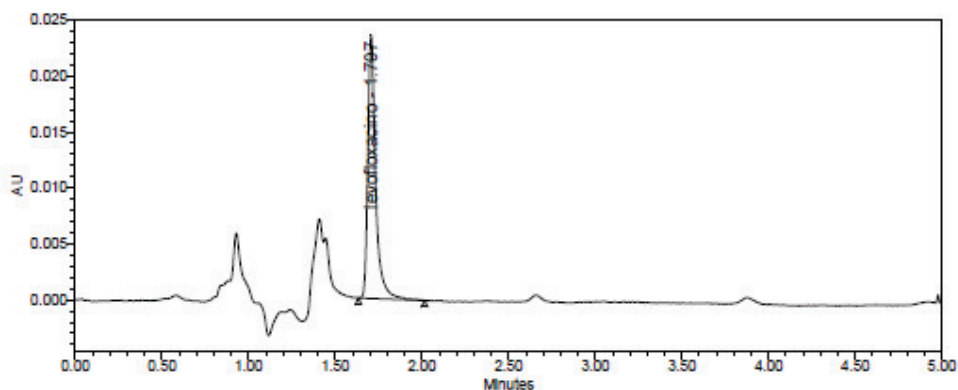
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1731;
Processing Method: Levofloxacino_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacino	1.707	73396	100.00	23540	0.044	ug

8.18. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino livre na formulação LP_31

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am11	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	11	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacino_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:55:13 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



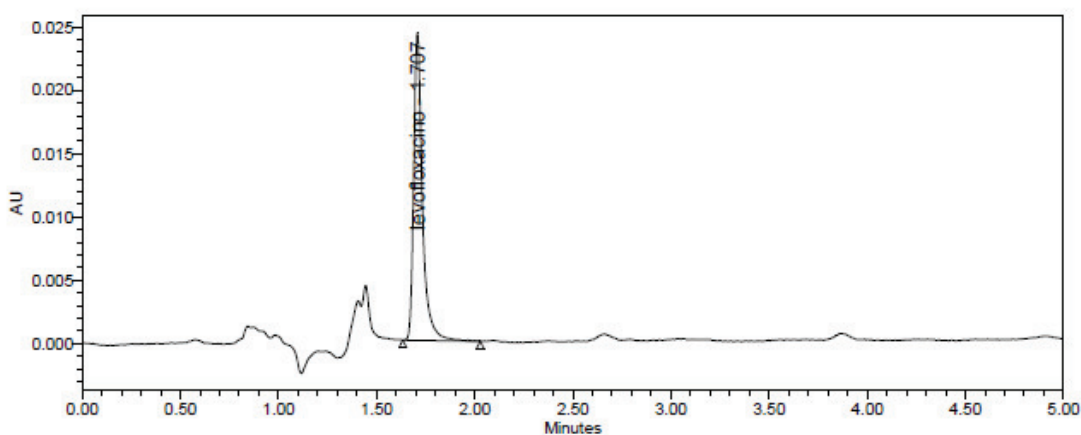
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1722;
Processing Method: Levofloxacino_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacino	1.707	73396	100.00	23540	0.044	ug

8.19. Cromatograma de quantificação do Levofloxacinó livre na formulação LP_32

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am16	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	16	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacinó_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 10:24:00 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



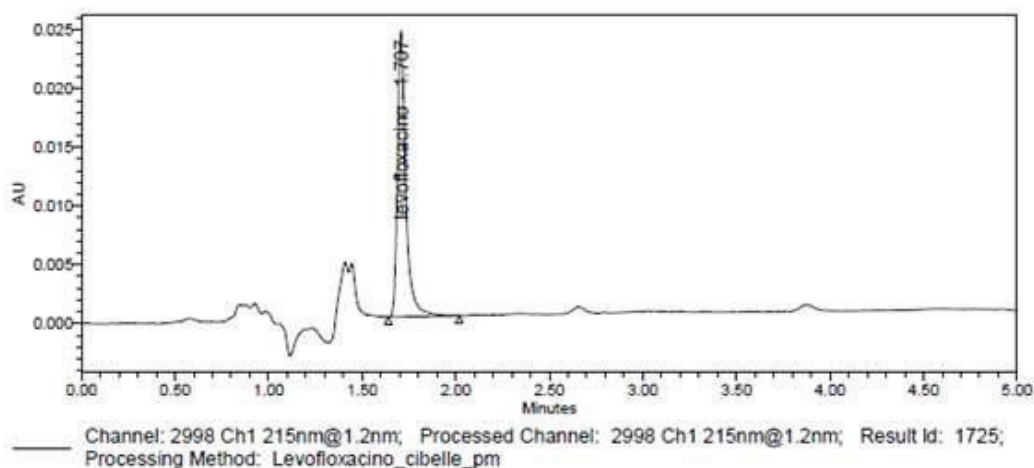
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1717;
Processing Method: Levofloxacinó_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacinó	1.707	75102	100.00	24284	0.045	ug

8.20. Cromatograma de quantificação do Levofloxacino livre na formulação LP_33

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am18	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	18	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacino_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 10:35:31 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		

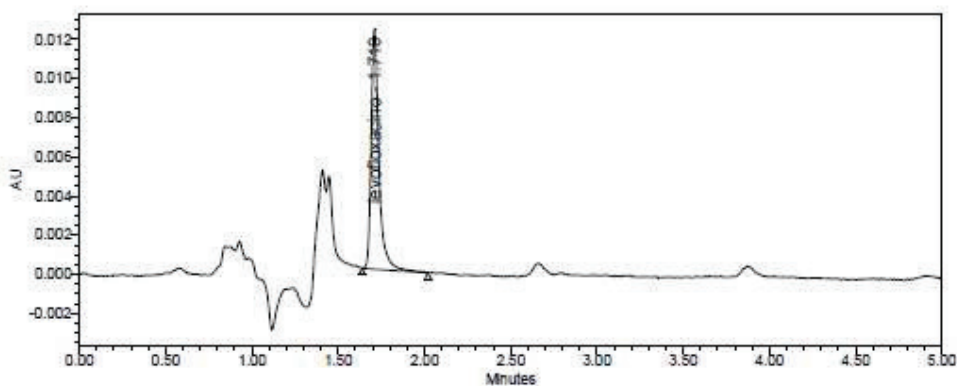


Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacino	1.707	75208	100.00	24313	0.045	ug

8.21. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 1 hora do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am7	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	7	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:32:12 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



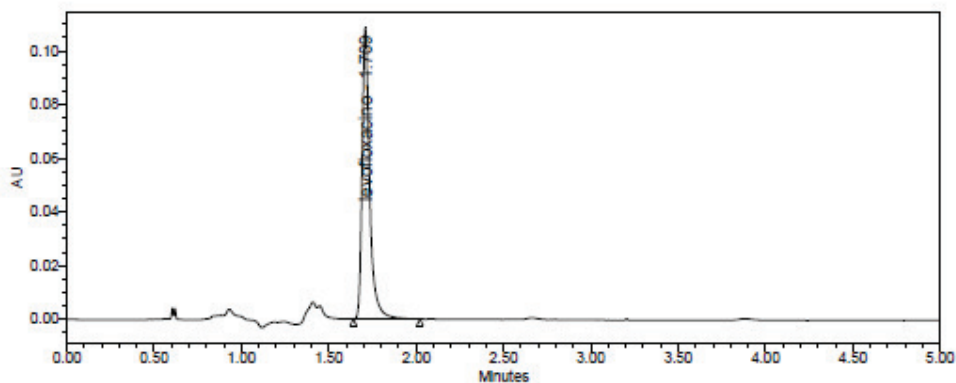
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1726;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.710	38180	100.00	12244	0.025	ug

8.22. Teste Modelo de Barreira- Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 1 hora do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am3	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	3	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:09:11 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		

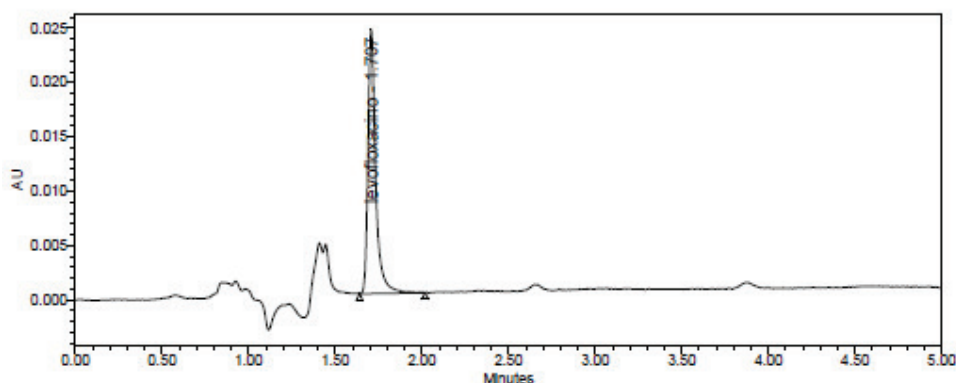


Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.709	327805	100.00	108675	0.176	ug

8.23. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 3 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am8	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	8	Aq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:37:58 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



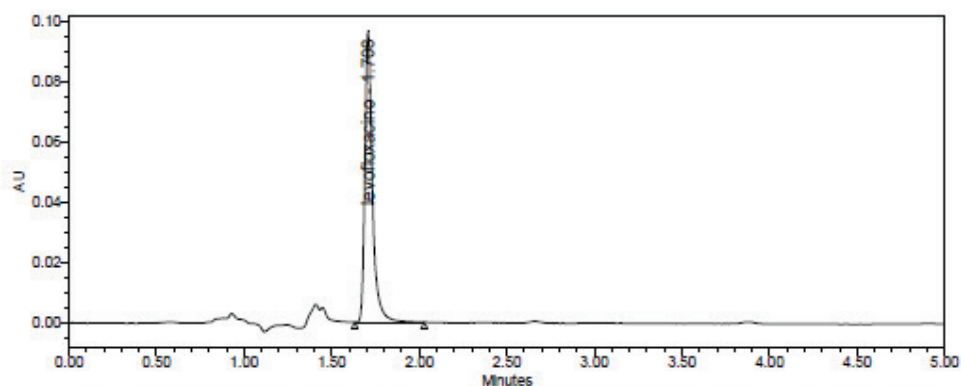
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1725;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.707	75208	100.00	24313	0.045	ug

8.24. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 3 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am4	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	4	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:14:56 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



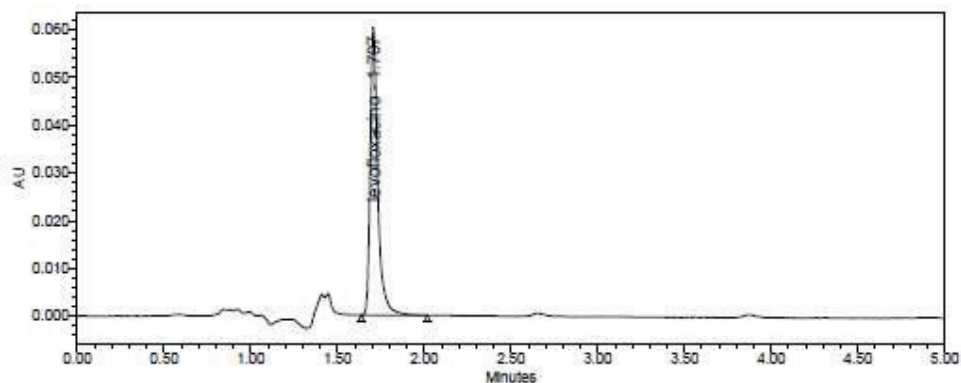
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1729;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.708	289829	100.00	96573	0.157	ug

8.25. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 8 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am9	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	9	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:43:43 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



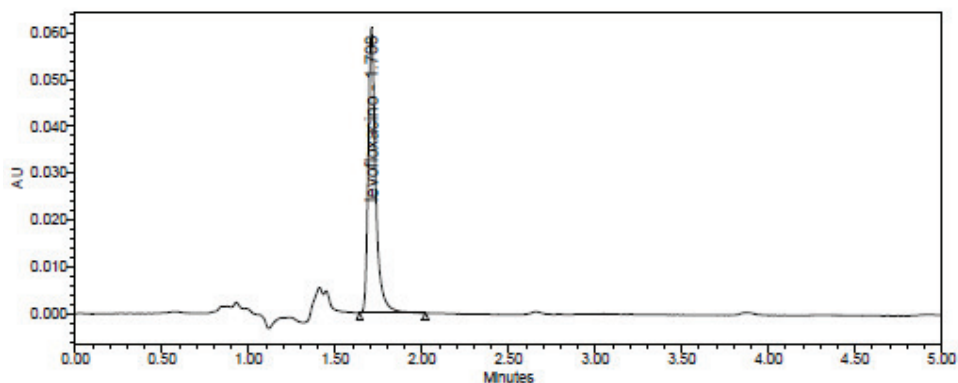
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1724;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.707	182800	100.00	60180	0.101	ug

8.26. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma da amostra retirada do inserto - tempo de 8 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am5	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	5	Aq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:20:42 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



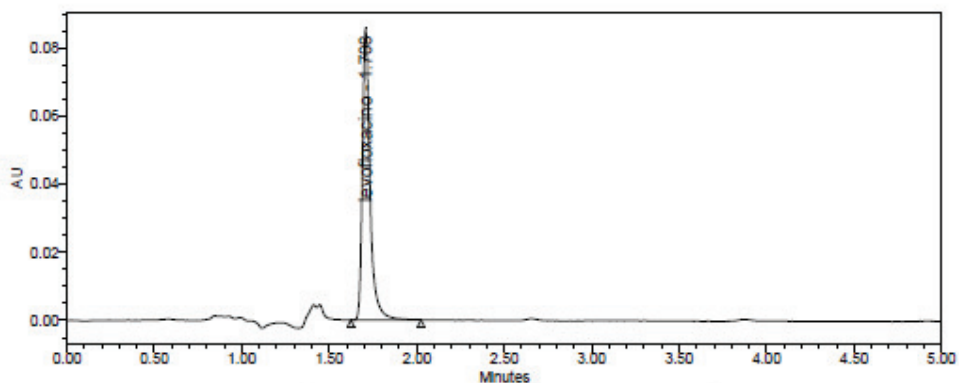
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1728;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.708	184416	100.00	60973	0.102	ug

8.27. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada fora do inserto - tempo de 24 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am10	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	10	Aq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:49:28 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		



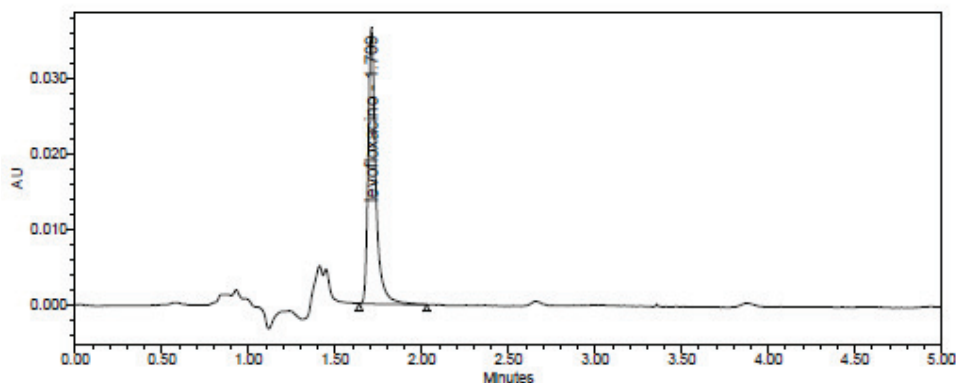
Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1723;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.708	258819	100.00	85753	0.140	ug

8.28. Teste Modelo de Barreira - Cromatograma, amostra retirada do inserto - tempo de 24 horas do teste da barreira

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	19fev-am6	Acquired By:	Ricardo
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	19fev13
Vial:	6	Acq. Method Set:	cib_ms
Injection #:	1	Processing Method:	Levofloxacin_cibelle_pm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Run Time:	5.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 215nm@1.2nm
Date Acquired:	2/19/2013 9:26:27 AM BRT		
Date Processed:	2/19/2013 12:03:29 PM BRT		

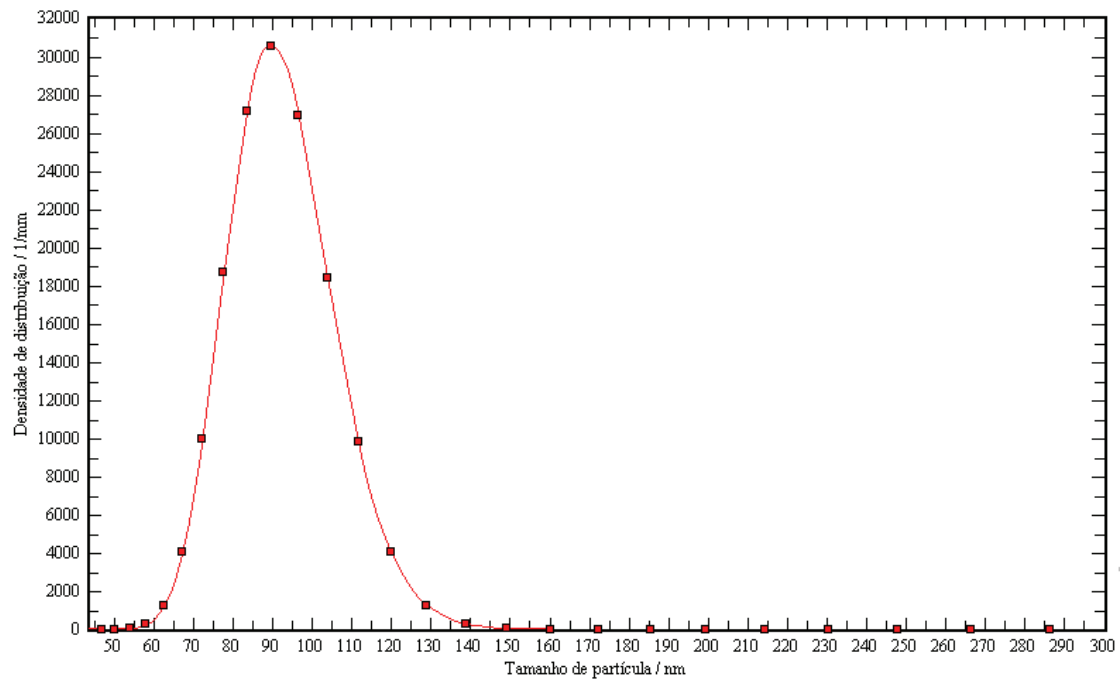


Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Processed Channel: 2998 Ch1 215nm@1.2nm; Result Id: 1727;
Processing Method: Levofloxacin_cibelle_pm

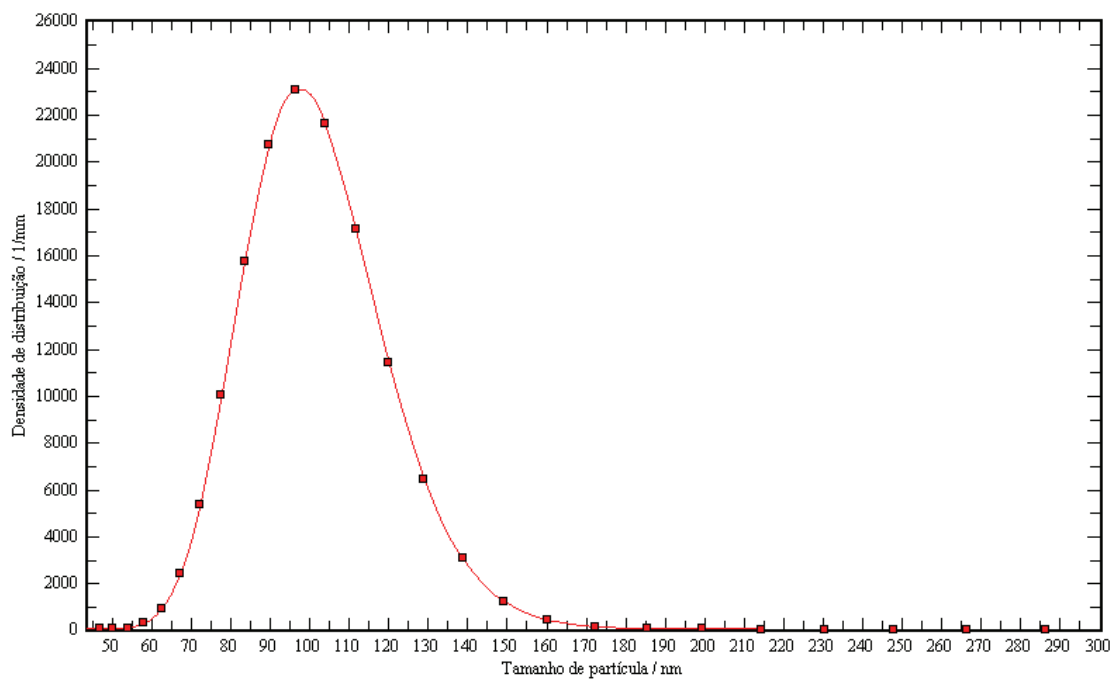
Processed Channel Descr.: 2998 Ch1 215nm@1.2nm

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2998 Ch1 215nm@1.2nm	levofloxacin	1.709	112467	100.00	36460	0.064	ug

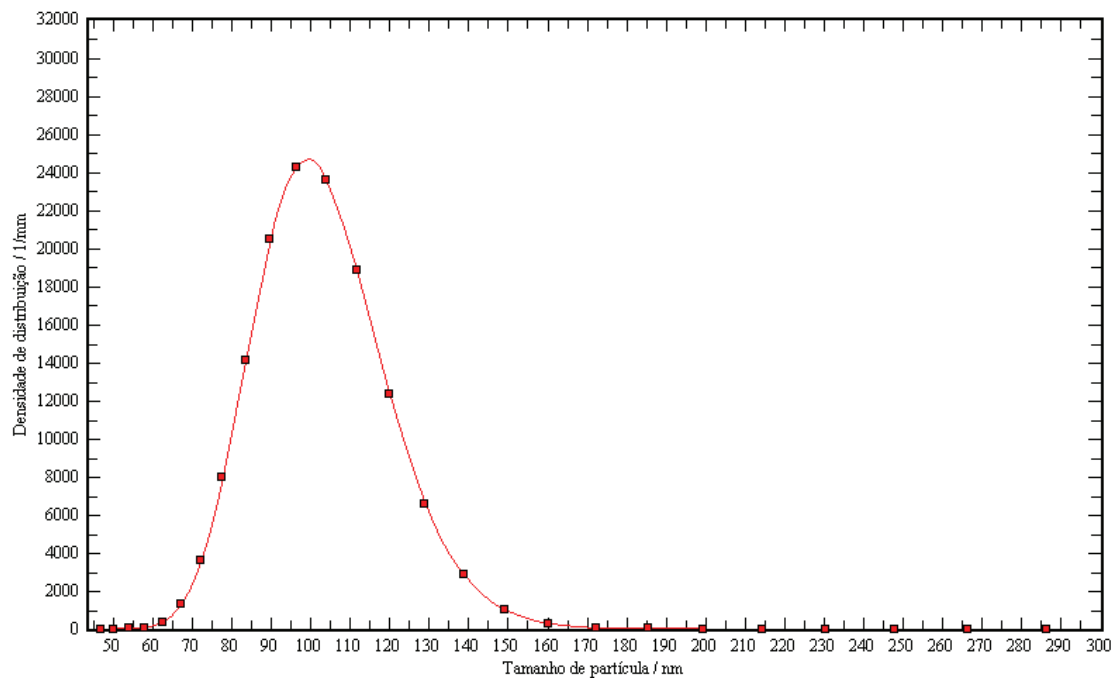
8.29. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após o término da redução da vesícula lipossomal por Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos) - Tempo zero



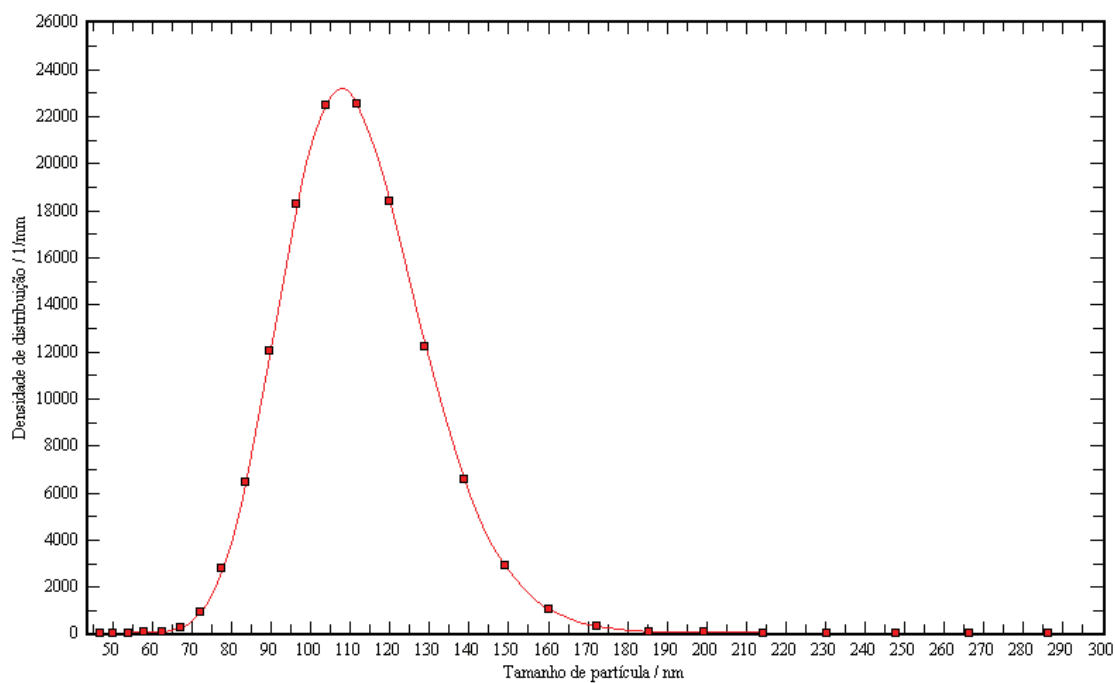
8.30. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 3 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)



8.31. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 10 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)



8.32. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 20 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)



8.33. Estudo de estabilidade - Distribuição de tamanho de vesícula lipossomal obtido após 30 dias de preparo da amostra por redução da vesícula lipossomal através do Homogeneizador de Alta Pressão (700 bar, 5 minutos)

