

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PARA A  
ADMINISTRAÇÃO POR INALAÇÃO DE COMPOSTOS  
TERAPÊUTICOS UTILIZADOS NA TERAPIA DA  
TUBERCULOSE.**

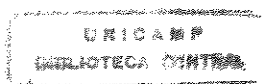
**Eng. Oselys Rodriguez Justo**

**AUTORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Maria Moraes**

**ORIENTADORA**

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



UNIDADE	B.C.
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	R618p
V.	Ex.
TOMBO BC/	40849
PROC.	278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	\$11,00
DATA	04/09/00
N.º CPD	

CM-00139671-2

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

R618p

Rodriguez Justo, Oselys

Preparação e caracterização de lipossomas para a administração por inalação de compostos terapêuticos utilizados na terapia da Tuberculose. / Oselys Rodriguez Justo.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Ângela Maria Moraes

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Tuberculose. 2. Microencapsulação. 3. Lipossomos. 4. Membranas (Tecnologia). I. Moraes, Ângela Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PARA A  
ADMINISTRAÇÃO POR INALAÇÃO DE COMPOSTOS TERAPÊUTICOS  
UTILIZADOS NA TERAPIA DA TUBERCULOSE.**

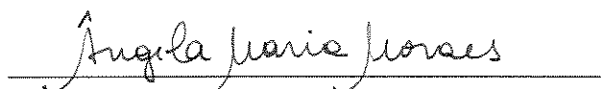
Oselys Rodriguez Justo

AUTORA

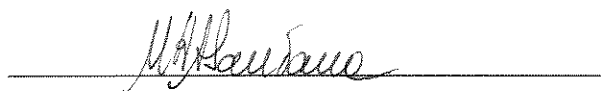
Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Maria Moraes

ORIENTADORA

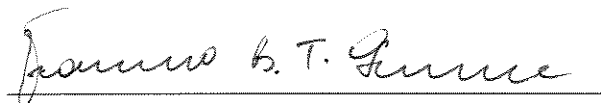
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em dia 19 do mês de Agosto do ano de 1999 pela  
Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Maria Moraes

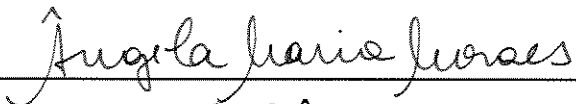


Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA DEFENDIDA POR OSELYS RODRIGUEZ JUSTO E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA EM 19 DE AGOSTO DE 1999.**

A handwritten signature in cursive script, reading "Ângela Maria Moraes", is written over a horizontal line.

**Profª Drª Ângela Maria Moraes**

*A mis padres y hermana querida, a Victor y a Jessi*

## AGRADECIMENTOS

A culminação deste trabalho está indissolúvelmente ligada ao apoio e ajuda de muitas pessoas, às quais estarei eternamente agradecida. Assim sendo, gostaria de agradecer:

A mi madre, mi padre, mi hermana querida y toda mi familia por sus grandes estímulos y apoyo en todos los momentos, a pesar de la distancia de estos años.

A Victor por todo el amor, el cariño, el estímulo de venir para el Brasil y por la ayuda de siempre.

A mi bella y querida hijita por ser tan importante y darle mas un gran sentido a mi vida. Por todo su amor. Muchas gracias.

Especialmente a minha professora Dra. Ângela Maria Moraes pela aceitação, ajuda, compreensão, respeito e confiança nos momentos de dificuldades e particularmente pela orientação científica durante estes anos. Muito obrigada.

À professora Dra. Maria Helena Santana pelas discussões científicas, pela disposição e ajuda durante todo o trabalho desenvolvido e por ter nos permitido o uso do seu Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Ao Professor Dr. Cesar Costapinto Santana pelo uso dos Laboratórios de Biosseparações e de Propriedades Reológicas e Coloidais.

A todos os meus Professores e aos colegas da turma, especialmente à Paula, à Roberta, à Rosana, à Juliana, à Sandra, à Denise, ao Marcelo V., ao Marcelo S., ao Rodrigo e a todos aqueles que me ajudaram desde o primeiro dia em que cheguei à UNICAMP.

A todos os meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pelo companheirismo e estímulo, ao Heron, ao Igor, à Fernanda, à Carla, à Samantha, à Maria Helena, à Elaine, à Terezinha e à Francine.

A todos meus colegas de Pós-Graduação do Departamento de Processos Biotecnológicos que de alguma forma contribuíram para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer à FAPESP pela concessão da Bolsa e o apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao MCT/PRONEX Núcleo de Excelência em Biomateriais pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos os que me acompanharam e foram parte deste processo. Muito obrigada.

# SUMÁRIO

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	viii
Nomenclatura.....	ix
Abreviações.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
 <i>CAPÍTULO I</i> .....	 1
INTRODUÇÃO .....	1
 <i>CAPÍTULO II</i> .....	 5
OBJETIVOS .....	5
 <i>CAPÍTULO III</i> .....	 7
REVISÃO DA LITERATURA .....	7
3.1 A Tuberculose e as Características de seu Tratamento.....	7
3.2 Características Gerais das Drogas Utilizadas nos Tratamentos Primário e Secundário da Tuberculose.....	13
3.3 Considerações Gerais sobre Lipossomas .....	17
3.3.1 Mecanismos de Formação de Lipossomas.....	20
3.3.2 Preparação de Lipossomas .....	22
3.4 Incorporação de Compostos Terapêuticos em Lipossomas.....	25
3.4.1 Técnicas de Encapsulamento de Compostos Terapêuticos em Lipossomas.....	28
3.5 Lipossomas como Veículos na Liberação Controlada de Medicamentos.....	32
3.5.1 Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos .....	33
3.5.2 Lipossomas Estericamente Estabilizados.....	34



3.6 Aplicação de Lipossomas na Terapia da Tuberculose.....	35
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	43
MATERIAIS E METODOLOGIA.....	43
4.1 Materiais.....	43
4.2 Metodologia.....	43
4.2.1 Avaliação da Solubilidade dos Compostos Terapêuticos a 1 mM nos Solventes Utilizados.....	43
4.2.2. Determinação dos Coeficientes de Partição dos Compostos Terapêuticos.....	44
4.2.3 Determinação da Concentração dos Compostos Terapêuticos Livres em Solução.....	45
4.2.4 Preparação dos Lipossomas.....	47
4.2.5 Encapsulamento Passivo das Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina e Etionamida.....	49
4.2.6 Encapsulamento Ativo das Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina. ....	49
4.2.7 Remoção da Droga não Encapsulada em Lipossomas.....	50
4.2.7.1 Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel .....	51
4.2.7.2 Remoção por Diálise .....	52
4.2.8 Caracterização dos Lipossomas.....	52
4.2.8.1 Determinação da Concentração de Lipídios .....	53
4.2.8.2 Determinação da Concentração de Composto Terapêutico Encapsulado.....	54
4.2.8.3 Determinação do Diâmetro Médio das Vesículas .....	56
4.2.8.4 Avaliação da Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas .....	57
4.2.8.5 Avaliação da Estabilidade das Vesículas em Soluções do Tensoativo Não- Iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> .....	57
<b>CAPÍTULO V</b> .....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Caracterização Preliminar das Drogas .....	59
5.1.1 Comportamento dos Compostos Terapêuticos quanto à Solubilidade.....	59

5.1.2 Comportamento dos Compostos Terapêuticos quanto à Partição nos Sistemas Testados.....	61
5.2 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva.....	72
5.2.1 Considerações Gerais.....	72
5.2.2 Avaliação da Eficiência de Remoção da Isoniazida não Encapsulada.....	72
5.2.3 Determinação da Concentração de Isoniazida Encapsulada .....	74
5.2.4 Efeito da Variação da Razão Molar Inicial Isoniazida/Lipídio nos Lipossomas..	75
5.2.5 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C.....	77
5.2.6 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva em Soluções do Tensoativo Não-Iônico $C_{12}E_5$ .....	80
5.3 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva .....	83
5.3.1 Avaliação da Eficiência de Remoção da Pirazinamida não Encapsulada.....	83
5.3.2 Caracterização dos Lipossomas encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva.....	84
5.3.3 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C.....	85
5.3.4 Estabilidade dos Lipossomas encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva em soluções de tensoativo não-iônico $C_{12}E_5$ .....	87
5.4 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Rifampicina e Etionamida por Incorporação Passiva.....	89
5.4.1 Avaliação da Eficiência de Remoção das Drogas Rifampicina e Etionamida não Encapsulada .....	89
5.4.2 Caracterização dos Lipossomas encapsulando Rifampicina e Etionamida por Incorporação Passiva .....	92
5.4.3 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Etionamida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C.....	93
5.4.4 Estabilidade dos Lipossomas encapsulando Etionamida por Incorporação Passiva em soluções de tensoativo não-iônico $C_{12}E_5$ .....	95

<i>5.5 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Ativamente as Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Streptomicina .....</i>	<i>96</i>
<i>5.5.1 Remoção da Droga Streptomicina não Encapsulada por Cromatografia de Permeação em Gel. ....</i>	<i>97</i>
<i>5.5.2 Características dos sistemas encapsulando as drogas através do uso de gradiente de pH nos Lipossomas.....</i>	<i>98</i>
<i>5.6 Comparação do Encapsulamento Passivo e Ativo das Drogas Estudadas.....</i>	<i>103</i>
<i>CAPÍTULO VI.....</i>	<i>107</i>
CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	107
6.1 Conclusões.....	107
6.2 Sugestões .....	108
<i>CAPÍTULO VII.....</i>	<i>111</i>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

## Lista de Figuras

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1 - Fórmulas moleculares estruturais de drogas tuberculostáticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (baseado no Merck Index, 1996).....	14
Figura 2 - Representação esquemática de lipossomas como veículos para encapsulamento de compostos hidrofílicos, hidrofóbicos ou de natureza anfifílica (adaptado de RIBAS, 1997). ....	18
Figura 3 - Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lipídios em soluções aquosas.....	18
Figura 4 - Classificação dos lipossomas quanto à morfologia e o tamanho das vesículas.....	19
Figura 5 - Encapsulamento ativo de drogas em vesículas lipídicas unilamelares. ....	29
Figura 6 - Coeficientes de partição de Isoniazida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.....	63
Figura 7 - Coeficientes de partição de Pirazinamida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano. ....	64
Figura 8 - Coeficientes de partição de Rifampicina nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano. ....	65
Figura 9 - Coeficientes de partição de Etionamida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol.....	66
Figura 10 - Coeficientes de partição de Estreptomicina nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.....	68
Figura 11- Perfil de eluição cromatográfico das soluções de lipossomas a 2 mM (0,75 mL) e de Isoniazida a 2,42 mM (0,75 mL) em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4.....	73
Figura 12 - Variações nos diâmetros hidrodinâmicos com o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira, dos lipossomas contendo o composto terapêutico Isoniazida preparados a diferentes razões molares iniciais droga/lipídio.....	78

Figura 13 - Variações nas razões molares finais droga/lipídio com o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira, dos lipossomas contendo o composto terapêutico Isoniazida preparados a diferentes razões molares iniciais droga/lipídio. ....	79
Figura 14 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Isoniazida na razão molar final droga/lipídio de 0,33 em soluções do tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> . ....	82
Figura 15 - Perfil de eluição cromatográfico das soluções de lipossomas a 3 mM (0,75 mL) e de Pirazinamida a 10 mM (0,75 mL) em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4. ....	84
Figura 16 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Pirazinamida preparados a uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3. ....	86
Figura 17 - Variações na razão molar final droga/lipídio durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Pirazinamida preparados a uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3. ....	87
Figura 18 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Pirazinamida na razão molar final droga/lipídio de 0,24 em soluções do tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> . ....	88
Figura 19 - Perfil de eluição cromatográfico das amostras de lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Rifampicina a 0,05 mM em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4 (1,5 mL). ....	90
Figura 20 - Perfil de eluição cromatográfico das amostras de lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Etionamida a 5 mM em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4 (1,5 mL). ....	91
Figura 21 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Etionamida incorporado na razão molar inicial droga/lipídio de 0,1. ....	93
Figura 22 - Variações na razão molar final droga/lipídio durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Etionamida incorporado na razão molar inicial droga/lipídio de 0,1. ....	94

Figura 23 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Etionamida na razão molar final droga/lípido de 0,034 em soluções do tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> . ....	95
Figura 24 - Perfil de eluição cromatográfico das soluções de Lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Estreptomicina a 6 mM (1,5 mL) em tampão Hepes 10 mM a pH 7,4. ....	98
Figura 25 - Variação no Diâmetro Médio das Vesículas Lipídicas preparadas pela metodologia de encapsulamento ativo incubadas com tampão Hepes 10 mM a pH 7,4 durante uma hora após adição de Etanol. ....	102

## Lista de Tabelas

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
Tabela 1 - Dados de solubilidade e de comprimento de onda de máxima absorção das drogas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (Florey, 1976, 1977, 1978; Merck Index, 1996). .....	16
Tabela 2 - Métodos de preparação e tipos de vesículas obtidas (adaptado de MORAES, 1996). .....	24
Tabela 3 - Possível localização e possíveis técnicas de encapsulamento nos lipossomas das drogas Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida e Estreptomicina.....	31
Tabela 4 - Solubilização das drogas de primeiro tratamento da Tuberculose analisadas no trabalho (concentração de droga igual a 1mM) nos diversos solventes empregados..	60
Tabela 5 - Solubilização das drogas de segundo tratamento da Tuberculose analisadas no trabalho (concentração de droga igual a 1mM) nos diversos solventes empregados. .	60
Tabela 6 - Possíveis técnicas de encapsulamento das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina, com base nos resultados obtidos dos coeficientes de partição das drogas. ....	70
Tabela 7 - Incorporação passiva de Isoniazida em lipossomas para as distintas concentrações iniciais da droga estudadas. ....	
Tabela 8 - Variações na absorbância relativa a 340 nm da solução de Isoniazida a 0,33 mM incubada com diferentes percentuais de C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> . ....	82
Tabela 9 - Incorporação ativa das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina nas vesículas lipídicas a uma razão molar inicial droga/lipídio de 0,2.....	99
Tabela 10 - Dados comparativos do encapsulamento passivo e ativo das drogas avaliadas. ....	103
Tabela 11 - Dosagem diária requerida das drogas em estudo na forma livre para pacientes pesando mais de 45 kg (Ministério da Saúde, 1995) e massa de droga calculada para amostras de 10 mL de lipossomas a 10 mM encapsulando os compostos terapêuticos em estudo passiva ou ativamente.....	105

## Nomenclatura

$p$ : Parâmetro de empacotamento

$V$ : Volume molecular da porção hidrofóbica

$a_o$ : Área superficial ótima

$l_c$ : Comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarbonato

$[HA^+]_{\text{interna}}$ : Concentração interna do composto protonado

$[HA^+]_{\text{externa}}$ : Concentração externa do composto protonado

$[H^+]_{\text{interna}}$ : Concentração interna de prótons

$[H^+]_{\text{externa}}$ : Concentração externa de prótons

$E$ : Eficiência de encapsulamento

$R_h$ : Raio hidrodinâmico médio

$k$ : Constante de Boltzmann

$T$ : temperatura absoluta

$D$ : Coeficiente de difusão médio da vesícula

$\mu$ : Viscosidade do solvente

%  $C_{12}E_5$ : Porcentagem de tensoativo

$A$ : Absorbância a diferentes concentrações de tensoativo

$A_o$ : Absorbância na concentração de tensoativo igual zero



## Abreviações

DSPC: Distearoilfosfatidilcolina

Col: Colesterol

P: Coeficiente de partição

D/L: Razão molar droga/lipídio

VOL: Vesícula Oligolamelares

VML: Vesícula Multilamelar

VMV: Vesícula Multivesicular

VUP: Vesícula Unilamelar Pequena

VUG: Vesícula Unilamelar Grande

VUGI: Vesícula Unilamelar Gigante

PEG: Polietilenoglicol

SER: Sistema Retículo-endotelial

$t_{1/2}$ : Tempo de meia vida de circulação

MAC: *Mycobacterium Avium*

PC: Fosfatidilcolina

DCP: Dicetilfosfato

DSPE-PEG: Distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol

O-SAP: O-estearoilamilopectina

HIV: Virus de Imunodeficiência Humana

Tc: Temperatura de transição gel/liquído cristalino dos fosfolipídios

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

## RESUMO

Rodriguez, O. J. - Preparação e Caracterização de Lipossomas para a Administração por Inalação de Compostos Terapêuticos Utilizados na Terapia da Tuberculose. Tese (Mestrado)  
Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999

A Tuberculose, atualmente, é um dos mais sérios problemas de saúde pública mundiais, especialmente em países em desenvolvimento, estando associada à morte de pelo menos três milhões de pessoas por ano. Dentro deste contexto, o presente trabalho visou a preparação e caracterização de lipossomas (vesículas lipídicas) destinados ao aumento da eficácia de drogas freqüentemente utilizadas nas terapias primária e secundária da Tuberculose, para a liberação controlada por inalação das mesmas. Lipossomas unilamelares foram preparados a partir de 60 mol % de Distearoilfosfatidilcolina e 40 mol % de Colesterol. As drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina e Etionamida, foram incorporadas nos lipossomas por encapsulamento passivo no cerne aquoso ou na bicamada lipídica das vesículas. As preparações, foram caracterizadas quanto às concentrações finais de lipídios e de drogas, ao diâmetro médio dos lipossomas, e à estabilidade de estocagem na forma de suspensão a 5°C. Para as amostras com melhores desempenhos quanto ao encapsulamento e à estabilidade de estocagem, foram realizados ensaios complementares de avaliação da estabilidade das vesículas quando em presença do tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$ . Ensaios similares foram também realizados para as mesmas drogas, além da Estreptomicina, empregando-se a técnica de incorporação ativa estabelecendo-se um gradiente de pH na bicamada lipídica de 3,4 unidades. Os resultados indicaram uma forte associação entre os protocolos experimentais utilizados, a eficiência de encapsulamento e a estabilidade dos sistemas obtidos. As drogas Isoniazida, Pirazinamida e Etionamida foram passivamente incorporadas em lipossomas, em razões molares finais droga/lipídio (D/L) de 0,33, 0,29 e 0,04 respectivamente. Os diâmetros médios das vesículas variaram de 286 a 329 nm. Estas vesículas apresentaram boa estabilidade de estocagem na temperatura de 5°C pelo período de 3 semanas e foram estáveis na presença de  $C_{12}E_5$ . Não se verificou a incorporação de Rifampicina pelo uso desta metodologia. Através da incorporação ativa pôde-se encapsular todas as drogas em lipossomas, obtendo-se valores de D/L de 0,21 para a Isoniazida e a Pirazinamida, de 0,04 para a Rifampicina e de 0,22 para a Etionamida e a Estreptomicina. Para estas vesículas, os diâmetros médios variaram de 322 a 404 nm. Assim, os resultados indicaram que o encapsulamento estável das drogas testadas em lipossomas é factível, e que a incorporação ativa, embora tenha conduzido a menores D/L em algumas situações, resulta em eficiências de encapsulamento mais elevadas.

Palavras-chave: lipossomas, encapsulamento, terapia de tuberculose, tuberculostáticos

## ABSTRACT

Rodriguez, O. J. - Preparação e Caracterização de Lipossomas para a Administração por Inalação de Compostos Terapêuticos Utilizados na Terapia da Tuberculose. Tese (Mestrado)  
Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999

Nowadays, Tuberculosis, is one of the most serious problems of public health worldwide, specially in development countries, being associated to the death of at least three million people yearly. In this context, the present work aimed the preparation and characterization of liposomes (lipid vesicles) designed to increase the effectiveness of drugs frequently used in Tuberculosis primary and secondary therapy, through the controlled release of these drugs by inhalation. Unilamellar liposomes were prepared with 60 % mol of distearoylphosphatidylcholine and 40 % mol of cholesterol. The drugs Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampin and Ethionamide were incorporated in the liposomes by passive loading in vesicle aqueous core or in its lipid bilayer. The formulations obtained were characterized in terms of their final lipid and drug concentrations, vesicle mean diameter, and stability during storage at 5°C as an aqueous suspension. The samples presenting the best encapsulation efficiencies and storage stability were also characterized concerning to their stability when in contact with the non-ionic surfactant C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Similar encapsulation studies were also accomplished for the same drugs, besides Streptomycin, using the active loading technique based on imposing a transmembrane pH gradient of 3.4 units. The results indicated a strong association among the experimental protocols, the trapping efficiency and the stability of the obtained systems. The drugs Isoniazid, Pyrazinamide and Ethionamide were passively incorporated in liposomes at final drug to lipid molar ratios (D/L) of 0.33, 0.29 and 0.04, respectively. The mean diameters of the vesicles varied from 286 to 329 nm. These vesicles presented good storage stability at 5°C for 3 weeks and they were also stable in the presence of C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Rifampin was not incorporated in liposomes the use of this methodology. The active loading technique allowed the encapsulation of all drugs tested in liposomes, at final D/L values of 0.21 for Isoniazid and Pyrazinamide, 0.04 for Rifampin and 0.22 for Ethionamide and Streptomycin, respectively. For these vesicles, the mean diameters varied from 322 to 404 nm. Therefore, the results indicate that the stable incorporation of the tested drugs in liposomes is feasible, and that the active loading technique results in higher encapsulation efficiencies, in spite of giving lower D/L values in some cases.

Key-words: liposomes, encapsulation, tuberculosis therapy, tuberculostatics

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a terapia da Tuberculose tem despertado grande interesse em nível mundial, pois embora já existam drogas eficazes para seu tratamento, a taxa de mortalidade ainda continua muito elevada. Além disto, pacientes portadores de AIDS e de Hanseníase têm sido infectados mundialmente em números expressivos com o *Mycobacterium tuberculosis*.

Esta doença, erroneamente tida como controlada e, portanto, negligenciada desde o início dos anos 60, é hoje uma ameaça entre as doenças infecciosas, sendo no mundo a primeira causa de morte em pessoas acima de 5 anos de idade. Em 1993, a Tuberculose foi declarada pela Organização Mundial da Saúde como uma emergência mundial, com o anúncio de sua magnitude na próxima década de 90 milhões de casos e de 30 milhões de mortes em todo o mundo.

Nos últimos 10 anos esta doença apresentou declínio, sendo considerada como sob controle, tendo atualmente recrudescido nos mais diferentes contextos sócio-econômicos, desde áreas bastante pobres da África, até regiões industrializadas como os EUA e vários países europeus, onde a doença tem sido a causa de mais de 25 % das mortes de adultos que poderiam ter sido evitadas. Os avanços no seu conhecimento e a tecnologia disponível para seu controle não têm sido suficientes para reduzir significativamente a sua morbidade e mortalidade.

O Brasil conta com quase 40 milhões de infectados pelo bacilo de Koch, sendo que cerca de 90 mil casos novos são notificados por ano, o que o coloca como o sexto país do mundo em incidência de Tuberculose. Cerca de 6 % dos acometidos morrem com ou devido à Tuberculose e um número não estimado sobrevive com problemas respiratórios ou outros problemas de saúde em consequência de seqüelas da doença (FIÚZA, 1997).

Estima-se que diariamente ocorram cerca de 10 novos casos e que 14 doentes morram no Brasil devido a esta enfermidade. A incidência da doença ocorre em curva ascendente a partir dos 15 anos de idade, atingindo seu ápice nas faixas etárias de maior atividade produtiva. Os prejuízos para a nação são elevadíssimos e, paradoxalmente, provocados por uma doença evitável e reconhecida com uma das mais baixas relações de custo-efetividade para seu controle.

Quando conduzida de maneira adequada, a terapia da Tuberculose, pode resultar em praticamente 100 % de eficiência de cura. No entanto, a terapia da doença, de acordo com os programas oficiais de saúde, não tem tido o sucesso esperado, contando-se com apenas 75 % de cura no país, quando pelo menos 85 % deveriam ser atingidos para um controle adequado da Tuberculose. Uma das maiores causas do insucesso da terapia é a alta taxa de abandono do tratamento, que pode chegar a 25 %, e que reflete no desenvolvimento de resistência do organismo causador da doença, o *Mycobacterium tuberculosis*, aos antibióticos geralmente usados.

As principais características do tratamento convencional da Tuberculose são: os efeitos colaterais, toxicidade a células normais, longo tempo de terapia, desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos medicamentos, necessidade de doses freqüentes e de obtenção de concentrações adequadas de drogas nos compartimentos onde o *Mycobacterium tuberculosis* se aloja. Tais características indicam uma necessidade premente do desenvolvimento de novas técnicas de tratamento que possam aumentar o índice terapêutico das drogas comumente utilizadas neste tratamento.

A relevância deste trabalho de pesquisa reside no fato de que formulações de vesículas lipídicas contendo compostos terapêuticos encapsulados, apresentam um bom potencial de aplicação na terapia da Tuberculose. Pois, além de aumentar a razão entre a eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos pela modificação de sua farmacocinética e biodistribuição, grande parte dos problemas associados à terapia convencional da doença poderiam ser minimizados.

Os lipossomas descobertos no ano de 1961 pelo cientista inglês Alec D. Bangham, embora tenham tido valorizado seu potencial de aplicação nas áreas médicas e farmacêuticas somente cerca de 15 anos depois, representam uma opção relevante no rejuvenescimento de compostos terapêuticos e nas pesquisas básicas sobre modelos de membranas celulares, despertando interesse dos pontos de vista comercial e científico.

Drogas encapsuladas em lipossomas têm tido variadas aplicações onde o encapsulamento e a proteção de substâncias são requeridos, principalmente para a liberação controlada de compostos terapêuticos *in vivo*. Estas vesículas lipídicas têm sido testadas com sucesso como transportadores de drogas, material genético, enzimas e outras macromoléculas para o interior de células vivas (LASIC, 1988; 1992).

Em estudos pré-clínicos foi demonstrada a potencialidade do uso de compostos terapêuticos encapsulados em lipossomas no tratamento de diversas doenças, entre elas a Leishmaniose, a Artrite e especialmente o Câncer (OSTRO, 1987a; 1987b; LASIC, 1992; CROMMELIM e SCHREIER, 1994; LASIC e MARTIN, 1995). O desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao encapsulamento em vesículas lipídicas de drogas ou vacinas aliado ao recente avanço na tecnologia de lipossomas culminou no desenvolvimento de diversas formulações de lipossomas injetáveis com uso licenciado em humanos (GREGORIADIS, 1995; LASIC e MARTIN, 1995).

Além das razões de importância farmacológica, a administração controlada de medicamentos pelo uso de lipossomas tem se mostrado economicamente interessante para companhias farmacêuticas. Estima-se que o desenvolvimento de veículos para a administração de compostos terapêuticos já existentes envolva verbas de 10 a 20 milhões de dólares, por períodos de 4 a 6 anos, em contrapartida aos custos elevados da pesquisa e comercialização de novas drogas (entre 100 e 200 milhões de dólares, por períodos de 8 a 10 anos).

O progresso em aplicações médico-farmacêuticas das formulações de lipossomas encapsulando compostos terapêuticos está diretamente associado à metodologia de preparação das vesículas lipídicas. As características físico-químicas e o impacto biológico final associado à sua administração é determinado pela adequada seleção do tamanho das vesículas, do

método utilizado para a incorporação do agente terapêutico nos lipossomas e da composição em lipídios das vesículas, tendo-se sempre em consideração o custo e disponibilidade dos materiais selecionados.

A grande versatilidade e disponibilidade de métodos de preparação de lipossomas possibilita uma seleção racional de protocolos adequados às necessidades farmacológicas específicas, tendo em conta a dosagem necessária e a rota de administração.

Estabelecidas as melhores metodologias segundo os objetivos no campo farmacológico, o uso de estratégias de otimização é imprescindível para garantir, entre outras características, a incorporação eficiente e econômica do composto terapêutico, bem como a estabilidade química e física do sistema obtido (MORAES, 1996).

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

O objetivo global deste trabalho foi o de contribuir para o estudo do aumento do índice terapêutico de drogas utilizadas no tratamento da Tuberculose, através de seu encapsulamento em lipossomas. O objetivo global compreendeu os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação do potencial de encapsulamento e retenção em lipossomas de compostos utilizados nas terapias primária e secundária da Tuberculose pela determinação dos coeficientes de partição destes compostos em sistemas óleo/soluções aquosas e octanol/soluções aquosas, com a fase aquosa apresentando diferentes valores de pH e de concentrações em sais, simulando os ambientes aquosos interno e externo aos lipossomas;
- Aplicação e avaliação de metodologias para a preparação e caracterização de lipossomas encapsulando drogas para o tratamento primário e secundário da Tuberculose (Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina), em formulações potencialmente adequadas para a administração por inalação. Os efeitos das condições de encapsulamento na incorporação dos compostos terapêuticos em lipossomas unilamelares extrudados por membranas com diâmetro de poro de 400 nm foram estudados, bem como a influência de variáveis como a razão molar inicial droga/lipídio na estabilidade dos sistemas;
- Avaliação do comportamento dos lipossomas quanto à estabilidade das formulações obtidas. Dos pontos de vista de estabilidade de estocagem a 5 ° C por 3 semanas e de integridade da bicamada lipídica após a incorporação dos compostos terapêuticos frente à adição do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>.



## CAPÍTULO III

### REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A Tuberculose e as Características de seu Tratamento

No ano de 1882 o cientista Robert Koch anunciou a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo causador da Tuberculose, doença infecto-contagiosa que pode apresentar caráter crônico e uma elevada taxa de mortalidade quando ineficientemente tratada. Embora o *M.tuberculosis* tenha preferência pelo tecido pulmonar, pode se apresentar nas mais variadas manifestações e localizações (pulmões, sistema nervoso, intestino, rins, etc.). O *Mycobacterium tuberculosis* é encontrado na forma de bacilos aeróbios estritos, medindo entre 0,3-0,6 por 0,5-4,0  $\mu\text{m}$ , caracterizados por seu lento crescimento. Seu desenvolvimento requer várias semanas, com uma duplicação apenas a cada 16 a 20 horas, proporcional às tensões de oxigênio do meio e à elevada proporção de mutantes (LACAZ, 1969).

Inicialmente, a terapia da Tuberculose fundamentava-se no aumento da resistência do paciente através do repouso e dietas (GAENSLER, 1982). Antes da descoberta de medicações efetivas, dois terços dos pacientes com Tuberculose pulmonar ativa morriam em até 5 anos após o desenvolvimento da doença. O marco inicial da terapêutica medicamentosa foi a descoberta da Estreptomicina por WAKSMAN, em 1944, seguida em 1949, do Ácido p-Aminosalicílico e particularmente, da introdução de Isoniazida em 1952 (TOMAN, 1980).

A terapia de infecções causadas por organismos do gênero *Mycobacterium* é ainda um desafio. Quando estes microrganismos entram especificamente nos pulmões, são fagocitados por macrófagos, podendo se multiplicar no interior das células e localizando-se em um compartimento denominado fagossomo. Normalmente, o fagossomo se funde a outro

compartimento do macrófago, denominado lisossomo, que contém substâncias como enzimas que degradam o material contido no fagossomo. Esta fusão não ocorre no caso do *M. tuberculosis* e o microrganismo sobrevive no interior do macrófago. Com a multiplicação da bactéria, o macrófago morre, liberando os microrganismos, que serão absorvidos por mais macrófagos. A presença destas células e também de células T no sítio infectado origina um granuloma e em 5 % dos casos a infecção se espalha por outras partes do pulmão (ROUHI, 1999).

Atualmente tem-se observado um aumento no número de casos de Tuberculose, em decorrência principalmente de fatores como desnutrição, aglomeração de pessoas, pobreza, co-infecção com o vírus HIV e desorganização e ineficiência dos serviços ligados à área de saúde pública. Estes fatores reforçam as tendências de detecção tardia e o abandono precoce do tratamento, que por sua vez, intensificam o grave problema da multirresistência aos antibióticos, reduzindo a efetividade do tratamento primário da Tuberculose (Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida), altamente eficaz quando adequadamente seguido e de baixo custo (R\$75,00 em medicamentos por paciente).

Um grave problema para o controle da Tuberculose é o surgimento da multirresistência às drogas, freqüentemente incurável. Embora previstos regimes de retratamento para recaídas, recidivas e falências após uso total ou parcial do esquema do tratamento primário, pode-se esperar, neste contexto, um aumento progressivo de pacientes portadores de Tuberculose multirresistente às drogas usuais. Esquemas terapêuticos para esses casos vêm sendo testados e comprovados no país, porém com eficácia aquém dos regimes normativos e custo muito alto, estimado em R\$3.000,00 em medicamentos por paciente (FIÚZA, 1997).

No Brasil, um estudo realizado no período de 1986 a 1988 mostrou que os níveis de resistência primária detectados foram baixos, porém não há dados recentes que permitam conclusões mais precisas sobre a situação atual da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a uma ou várias drogas (multirresistência).

A Tuberculose é uma doença que se espalha muito facilmente entre os membros da sociedade através do ar. Quando uma pessoa tosse, espirra, fala ou expectora, os bacilos são propelidos dos pulmões para o ar, e se a pessoa contaminada não é tratada, ela pode então infectar pela respiração de 10 a 15 pessoas no período de um ano. O crescimento gradativo da resistência aos medicamentos tem sido bem documentado através do mundo e representa um desafio real e direto aos segmentos não infectados de toda a população (SBARBARO, 1997).

No Brasil, especificamente em 1995, teve-se uma incidência de Tuberculose de aproximadamente 91.000 casos (RUFINO NETO, 1997), onde um dos problemas mais graves foi a resistência adquirida aos antibióticos, devido à alta taxa de abandono da terapia, que foi nesse ano de cerca de 17,5 % (FIUZA, 1997). As estatísticas mostram que o abandono do tratamento atinge proporções alarmantes no país, indicando valores entre 16 % e 25 % nas capitais (FIUZA, 1997). Em 1996, segundo a OMS, o Brasil apareceu no quarto lugar no mundo com maior número de doentes (85.860 notificações), seguido pela Índia, China e Filipinas (FIUZA, 1999).

O quadro atual mostra que a incidência desta doença é de 53,4 casos novos registrados para cada 100 mil habitantes. Estima-se que dezesseis brasileiros são infectados por dia e que 6.000 doentes faleçam, por ano, no Brasil, devido a esta doença. Algumas regiões do Brasil possuem uma taxa de incidência superior à de algumas cidade da África e da Ásia, ou seja mais de 300 casos por 100.000 habitantes.

No estado de São Paulo ocorrem cerca de 18 a 19 mil casos novos por ano, com um coeficiente de incidência em torno de 55 por  $10^5$  habitantes. De acordo com estatísticas parciais, foram registrados no estado 18.378 casos da doença em 1998, com 1.500 mortes, o que o coloca como líder brasileiro em casos notificados (FIUZA, 1999). Deste total de casos, cerca de 8.000 são da forma pulmonar bacilífera, responsável por manter a cadeia de transmissão. Os dados de incidência da doença são obtidos dos casos notificados pelo sistema nacional de saúde, nem sempre representando portanto o universo dos casos.

Cerca de 10 % dos casos ocorrem em menores de 20 anos, sendo os adultos de 20 a 49 anos a faixa etária mais atingida, justamente a faixa onde ocorrem os casos de co-infecção Tuberculose/HIV. A faixa etária acima de 50 anos representa 20 % do total de casos. Em relação ao gênero, a proporção de casos do sexo masculino em relação ao feminino tem sido de três homens para uma mulher.

Em Campinas identifica-se uma incidência anual entre 60 e 80 casos novos por 10<sup>5</sup> habitantes, com taxas de letalidade ao redor de 10 % (como causa básica ou associada), que superou a média do estado nos anos de 1993, 1994, 1996 e 1997. Observa-se uma tendência de aumento da associação Tuberculose e HIV/AIDS, com aproximadamente 20 % dos casos de Tuberculose positivos para HIV quando de sua notificação. Estudos mostram que o indivíduo co-infectado tem um risco de 6 a 100 vezes maior de adoecer por Tuberculose que o indivíduo HIV negativo, de modo que a médio prazo isto pode configurar uma situação explosiva da Tuberculose na população.

Em 1994, em nível mundial, dos aproximadamente 14 milhões de pessoas positivas para HIV, acredita-se que 5,6 milhões estavam infectadas com Tuberculose. Cerca de um terço das mortes de pessoas HIV positivas é decorrente da Tuberculose.

O tratamento convencional da Tuberculose caracteriza-se pelo fato de que os compostos terapêuticos ainda são administrados ao paciente de maneira arcaica e pouco eficiente, envolvendo uma combinação de drogas, empregadas necessariamente em associações para evitar o desenvolvimento de resistência às drogas, sendo que a resistência apresentada a uma droga é independente da resistência à outra (GROSSET, 1979; DAVID, 1981). As drogas devem ser capazes também de se acumular em concentrações relativamente elevadas no interior das células hospedeiras para atingir as células patogênicas.

Dentre outras características da terapia destacam-se a toxicidade das drogas a células normais, dependente da dosagem e da duração do tratamento, as freqüentes reações alérgicas caracterizadas por lesões cutâneas, intolerância gástrica, náusea e febre, além do longo tempo da terapia, que varia de acordo com a forma de Tuberculose.

Entretanto, raramente se justifica a interrupção da terapia antes de seis meses mesmo nas formas mais benignas, período em que infelizmente, parte dos doentes abandona o tratamento tão logo apresentam uma melhora. Nas formas mais graves, a terapia deve ser prolongada por dois anos ou mais e, depois de iniciada, deve ser mantida sem interrupções, mesmo após a cura aparente que ocorre dentro de poucos dias (LACAZ, 1969), para prevenir recidivas.

A terapia caracteriza-se, também, pelo desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos diversos antibióticos, que constitui o mais sério obstáculo ao tratamento do tuberculoso e, por último, a influência do psiquismo do paciente no aparecimento da intolerância medicamentosa, o que o leva a se desestimular com a terapia, interrompendo-o. As principais causas de abandono podem ser atribuídas ao tempo longo de tratamento, à deficiência no sistema de atendimento aos doentes, à falsa impressão de cura após algumas semanas de tratamento e a fatores individuais, como o alcoolismo.

Um projeto da OMS (1994 a 1997) reportou que uma média de 9,9 % de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes, seriam resistentes a pelo menos uma das drogas usadas na terapia da Tuberculose. A resistência à Isoniazida (7,3 %) e Estreptomicina (6,5 %) foram mais comuns que à Rifampicina (1,8 %), ou ao Etambutol (1,9 %). A média de prevalência de cepas multirresistentes (à Isoniazida e Rifampicina) foi de 1,4 % (MÉNDEZ, 1997).

O tratamento da Tuberculose baseia-se na inativação e/ou eliminação do *Mycobacterium* do organismo humano, sendo feita reforçando-se as defesas naturais de combate a organismos invasores, inibindo-se o desenvolvimento (multiplicação) do organismo invasor através de agentes químicos (fármacos) de modo a permitir que as defesas naturais possam atuar e eliminar o agente causador da doença e inibindo-se processos vitais do organismo invasor através de agentes químicos que causam a sua morte.

Assim, embora curável, a doença vem se desenvolvendo de forma alarmante no país, sendo agravada por fatores sociais como o adensamento populacional e a favelização na periferia de grandes centros, pela crescente resistência bacteriana, pela disseminação da AIDS e também por conta de aspectos técnicos, políticos e administrativos comuns a qualquer programa da saúde pública. Infelizmente não há, atualmente, nenhuma vacina curativa ou

preventiva de uso geral para a Tuberculose além da BCG para prevenção de formas graves em crianças.

Recentemente, pesquisadores da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto anunciaram o desenvolvimento de uma nova vacina gênica contra a Tuberculose com resultados animadores segundo testes realizados em camundongos (FAPESP, 1999). Nos animais, a vacina de DNA apresentou, além da característica profilática, atividade curativa, eliminando a doença estabelecida e impedindo sua reativação.

O controle desta enfermidade necessariamente implica em ações com uso de tecnologia e pesquisa apropriada, estrutura sanitária básica, enfoque epidemiológico, decisão política e participação da sociedade. A rápida identificação de doentes, nos estágios iniciais quando ainda não há sintomas mas há contaminação, seguida de tratamento efetivo, é o principal método de prevenção da propagação da doença. Os métodos de diagnóstico existentes hoje são, embora simples, lentos e de difícil realização em condições precárias, como as que podem ocorrer em alguns centros públicos de saúde. Esta situação acaba por resultar no retardo no diagnóstico, protelando o início do tratamento, criando condições para o abandono primário e contribuindo para a manutenção de altos níveis de transmissão da doença no país.

A necessidade de esquemas de tratamento curtos tornou-se então mais evidente e a utilização da quimioterapia de curta duração com associação de drogas representou um dos maiores avanços no controle da Tuberculose (FOX e MITCHISON, 1975). O desenvolvimento da quimioterapia para o tratamento da Tuberculose foi então estruturado considerando-se o conhecimento sobre as populações bacterianas e os fundamentos bacteriológicos do mecanismo de ação dos medicamentos (GROSSET, 1979).

As ações de combate à Tuberculose nas últimas décadas, em decorrência desta resistência a antibióticos desenvolvida pelos agentes infecciosos, poderiam ser resumidas no desenvolvimento de pesquisas de modalidades terapêuticas que possibilitem o aumento da eficácia de compostos terapêuticos já existentes e na produção de novas drogas (específicas ou pelo menos mais seletivas) que proporcionem melhores resultados terapêuticos a custos

relativamente menores do que geralmente têm o desenvolvimento das drogas comumente utilizadas na terapia da Tuberculose.

### ***3.2 Características Gerais das Drogas Utilizadas nos Tratamentos Primário e Secundário da Tuberculose***

Diversos fármacos podem ser utilizados no combate à Tuberculose. As drogas de primeiro tratamento compreendem a Isoniazida, a Pirazinamida e a Rifampicina. As drogas geralmente utilizadas em caso de falência do primeiro tratamento são o Etambutol, a Etionamida e a Estreptomicina. As drogas empregadas nos casos de resistência são o Ácido p-Amino-salicílico, Capreomicina, Canamicina, Ciclosserina, Ciprofloxacina, Clofazimina, Ofloxacina, Norfloxacina, Sulfato de Rifabutina, Sparfloxacina, Terizidona e Tiacetazona. Além destes medicamentos outros fármacos em estado de prospeção tecnológica capazes de atuar como bacteriostáticos ou bactericidas.

A administração destas drogas, geralmente feita por via oral, está associada a diversos efeitos colaterais indesejáveis, como náuseas, vômitos, icterícia, diarreia, alterações visuais e toxicidade a tecidos normais (Ministério da Saúde, 1995), o que leva o paciente a se desestimular com o tratamento, interrompendo-o, o que contribui substancialmente com o aumento do número de casos de Tuberculose multirresistente.

O desenvolvimento de novas drogas, com maior efetividade e menor toxicidade, apresenta poucas perspectivas, além de alto custo associado. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas pesquisas para a obtenção de drogas mais eficazes para o tratamento da Tuberculose. Entretanto, até o momento não há nenhum medicamento de eficácia semelhante à dos já utilizados. Isto reforça a necessidade de evitar que o microorganismo se torne resistente a estes compostos. A resistência a muitas drogas antituberculose é atribuída à baixa permeabilidade das células às drogas e aos baixos níveis de retenção intracelular (DAVID, 1981; GANGADHARAM et al., 1986; 1987).

A Figura 1 ilustra as fórmulas moleculares estruturais de compostos terapêuticos do primeiro e segundo tratamento da Tuberculose utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

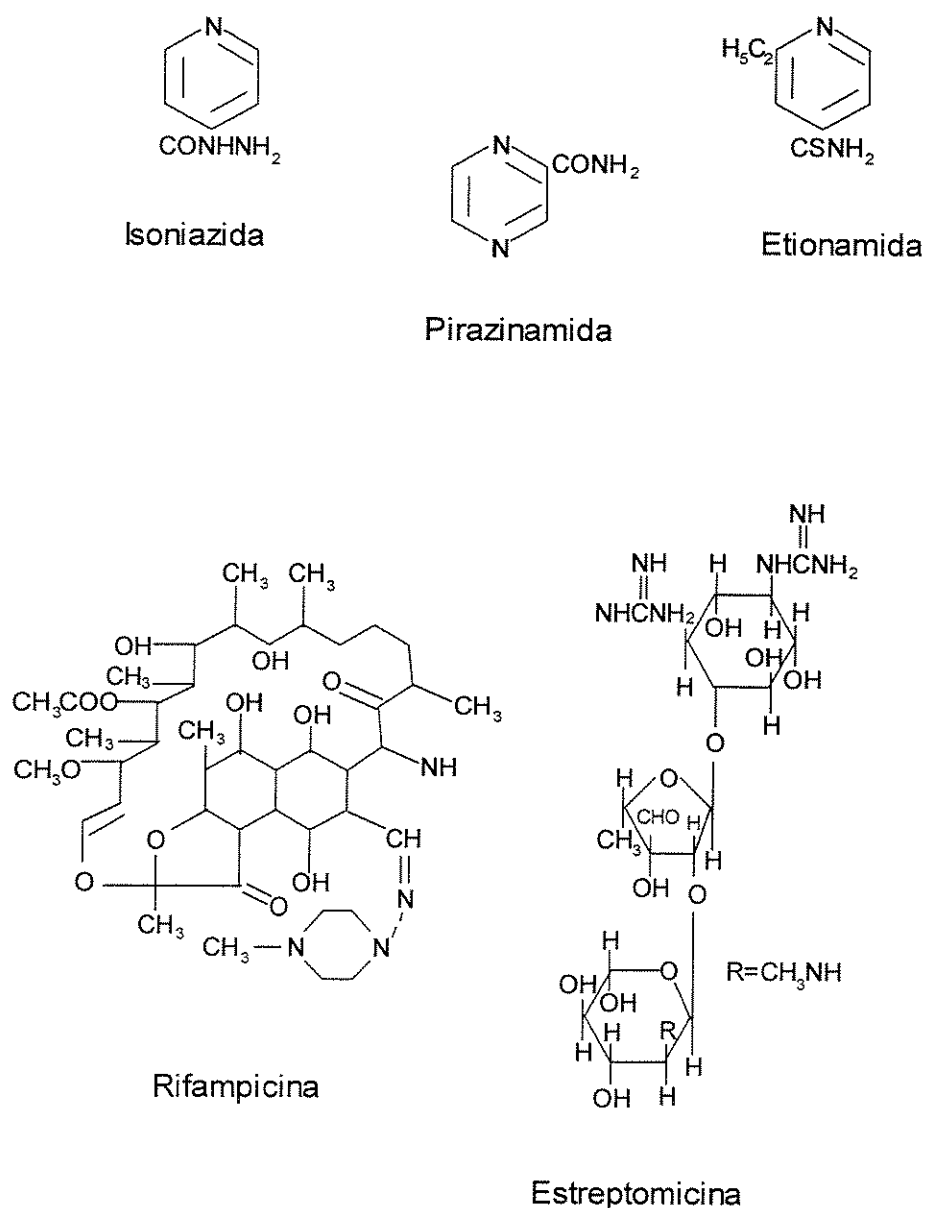


Figura 1 – Fórmulas moleculares estruturais de drogas tuberculostáticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (baseado no MERCK INDEX, 1996).



Nos EUA, assim como no Brasil, o esquema terapêutico indicado para casos novos de todas as formas de Tuberculose pulmonar e extrapulmonar, exceto meningite, são Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida por dois meses, seguida de Isoniazida e Rifampicina por quatro meses. Esta forma de tratamento se deve ao fato de que, ao atingirem o pulmão, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos, cujo meio intracelular é ácido e desfavorável para a atividade microbiana. Nesta etapa, a população bacteriana intracelular é pequena e sua multiplicação é muito reduzida. Sendo assim, é relevante a utilização da Pirazinamida, capaz de atuar em pH menor que 7,0.

Com a evolução da lesão forma-se uma estrutura denominada caseum sólido, cujo pH é aproximadamente igual a 7,0 e onde o teor de oxigênio é baixo. A população bacteriana é extracelular e pequena, com períodos episódicos de atividade metabólica. Neste caso, a droga que melhor age é a Rifampicina. A liquefação do caseum e sua drenagem através dos brônquios forma a lesão cavitária, onde o pH é alto (maior que 7,0) e a tensão do oxigênio elevada, condições ideais para o crescimento do bacilo. Como a população bacteriana é numerosa, as drogas que melhor agem nestas condições são a Rifampicina, a Isoniazida e a Estreptomicina. Assim, existem no mesmo momento bacilos intracelulares com baixa velocidade de duplicação e extracelulares com multiplicação rápida, obrigando o uso de drogas que atuem em todas estas condições. A manutenção das drogas por um período longo visa atingir principalmente aqueles bacilos em estado de quase inatividade metabólica no interior do caseum sólido, responsáveis pela recidiva da doença.

Em decorrência do fato pelo qual o desenvolvimento de novas drogas apresenta poucas perspectivas, diversas tentativas estão sendo feitas para se elevar o índice terapêutico das drogas de uso consagrado. Este índice pode ser elevado, por exemplo, através do uso de carregadores de droga, como os lipossomas. Os lipossomas constituem parte dos sistemas coloidais de liberação controlada de compostos terapêuticos da medicina moderna, representando uma opção relevante para o transporte e deposição específica de drogas na terapia de alguns tipos de câncer, de infecções fúngicas e de leishmaniose (DEOL et al., 1997).

O encapsulamento destes fármacos em lipossomas poderia reduzir o número e a intensidade dos efeitos colaterais, poupando tecidos saudáveis, como os rins e o fígado.

O conhecimento das características físico-químicas das drogas é fundamental para seu posterior encapsulamento em lipossomas. As fórmulas moleculares estruturais dos agentes terapêuticos e o tipo de solvente onde os mesmos são solúveis podem servir como indicativos da possível localização das drogas nas vesículas lipídicas, determinando a técnica mais adequada para sua incorporação nos lipossomas. Dados relacionados com a solubilidade e as características de absorbância destes compostos terapêuticos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de solubilidade e de comprimento de onda de máxima absorção das drogas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (FLOREY, 1976, 1977, 1978; MERCK INDEX, 1996).

Composto Terapêutico	Características de Solubilidade	Comprimento de onda de máxima absorção
Isoniazida $C_6H_7N_3O$ MM: 137,5 Da	Solúvel em Água: T= 25 °C: 40 %= 1 M, T=40 °C: 26 %= 1,9 M Solúvel em Álcool: T= 25 °C: 2 % Solúvel em Clorofórmio aproximadamente 0,1 %. Praticamente insolúvel em Éter e Benzeno.	266 nm, para solução aquosa. 265 nm, em solução a 0,01 N de HCl
Pirazinamida $C_5H_5N_3O$ MM: 123,1 Da	Solúvel em: Água: 15 mg/mL=0,12 M; Metanol: 13,8mg/mL; Etanol: 5,7mg/mL Isopropanol: 3,8mg/mL; Clorofórmio: 7,4mg/mL; Iso-octano: 0,01mg/mL	269 nm, para solução aquosa
Rifampicina $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ MM: 823,0 Da	Pouco solúvel em Água a pH<6, Acetona e Tetracloreto de Carbono. Solúvel em $CH_3Cl$ , Acetato de Etila e Metanol.	Absorção máxima (pH 7,38): 237, 255, 334 e 475 nm
Etionamida $C_8H_{10}N_2S$ MM: 166,2 Da	Pouco solúvel em Água, Metanol, Etanol, Propilenoglicol. Solúvel em Acetona quente, Dicloroetano e Piridina.	—
Estreptomicina $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ MM: 581,6 Da	Muito solúvel em Água (>20mg/mL, Cloridrato de Estreptomicina). Pouco solúvel em solventes orgânicos: Álcool, Clorofórmio e Éter.	—

MM: massa molecular

Se o composto é mais solúvel em água que em solventes orgânicos, há maior probabilidade de que ele seja preferencialmente acumulado em regiões hidrofílicas, como no cerne aquoso de lipossomas. Se o composto terapêutico for mais solúvel em solventes orgânicos, provavelmente irá se acumular mais substancialmente em regiões hidrofóbicas, como na bicamada lipídica dos lipossomas. Se o composto for solúvel em ambos os tipos de solventes, poderá se acumular em ambas as regiões ou ficar parcialmente imerso na bicamada lipídica.

### *3.3 Considerações Gerais sobre Lipossomas*

Os lipossomas (vesículas lipídicas), são estruturas formadas a partir da hidratação de bicamadas lipídicas. Durante sua formação, podem ser simultaneamente encapsuladas substâncias presentes na solução e, dependendo de suas características físico-químicas, estas podem se acumular em diferentes regiões dos lipossomas.

Nas vesículas formadas o volume aquoso central é completamente circundado por uma membrana composta de lipídios (normalmente, fosfolipídios e Colesterol), podendo apresentar diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. O caráter anfifílico das moléculas de fosfolipídios, constituintes primários dos lipossomas, confere-lhes a importante capacidade de encapsulamento de compostos com características físico-químicas distintas e a permeação de compostos hidrofílicos encapsulados através da membrana lipídica formada (OSTRO, 1987a; LASIC, 1992), conforme ilustrado na Figura 2.

Os fosfolipídios, constituídos de uma parte polar ou cabeça hidrofílica (grupo fosfato), ligada a uma cauda hidrofóbica apolar (geralmente formada por duas cadeias longas de ácidos graxos), exibem propriedades anfifílicas e tendem a agregar-se em estruturas ordenadas com diferentes morfologias acima de uma concentração crítica, onde o tipo de empacotamento é determinado pelos tamanhos relativos das cabeças polares e das caudas apolares das moléculas envolvidas, como ilustrado na Figura 3.

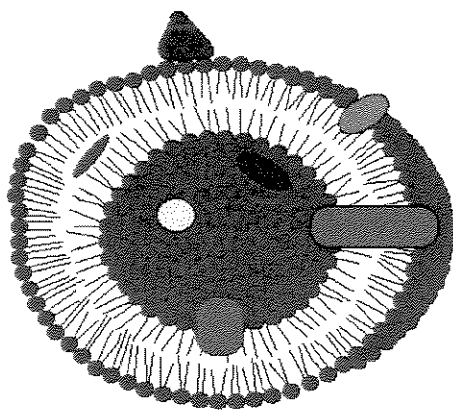


Figura 2 - Representação esquemática de lipossomas como veículos para encapsulamento de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela), ou ligados à superfície interna/externa (lilás), hidrofóbicos no interior da bicamada (azul) ou de natureza anfifílica (verde) (adaptado de RIBAS, 1997).

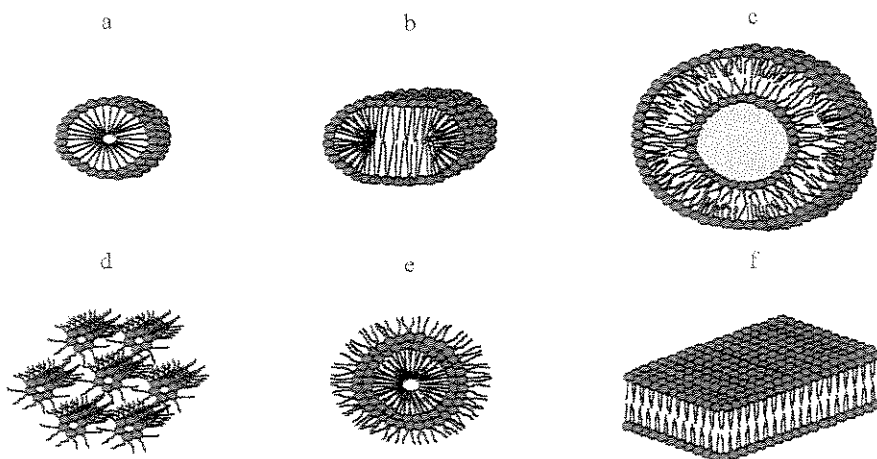


Figura 3 - Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lipídios em soluções aquosas. Lipídios com cabeças polares relativamente grandes formam estruturas com elevados raios de curvatura (a, b, c), as misturas de lipídios com cabeças polares grandes e pequenas podem também formar vesículas (c), lipídios com cabeças polares pequenas e caudas apolares grandes formam estruturas com cadeias apolares na camada externa (d, e) e lipídios com partes polares e apolares de tamanho similar têm como tendência à formação de bicamadas achatadas (f) que podem se fechar sobre si mesmas, formando os lipossomas (adaptado de MORAES, 1996).

Segundo ISRAELACHVILI (1994), a morfologia das estruturas formadas pode ser predita em função de suas propriedades geométricas de empacotamento, as quais podem ser representadas pelo parâmetro de empacotamento,  $p$ , de acordo com a equação 1:

$$p = \frac{V}{a_0 l_c} \quad (1)$$

onde  $V$  é o volume molecular da porção hidrofóbica,  $a_0$  é a área superficial ótima (definida como a área ocupada pela porção hidrofílica quando a energia de interação entre lipídios é mínima) e  $l_c$  é o comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto, não podendo ultrapassar o comprimento máximo efetivo que as cadeias assumiriam quando completamente distendidas.

Dependendo do tipo de lipídio e da temperatura, as bicamadas estarão num estado de gel, com as cadeias de hidrocarboneto bem organizadas, ou de líquido-cristalino, onde as cadeias estariam desordenadas. A formação dos lipossomas geralmente requer condições onde as bicamadas se formem no estado de líquido-cristalino, reduzindo o aparecimento de defeitos de empacotamento que possam alterar a estrutura do lipossoma (MORAES, 1996).

Os lipossomas são classificados com base em parâmetros estruturais e em seu método de preparação, podendo apresentar distintos tamanhos e número de bicamadas, Figura 4.

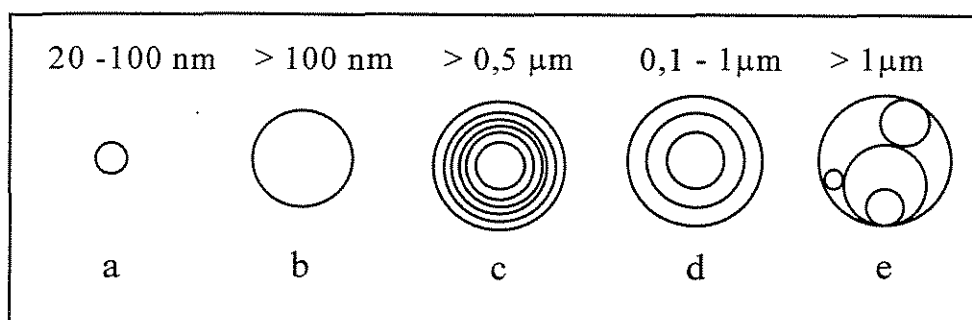


Figura 4 - Classificação dos lipossomas quanto à morfologia e o tamanho das vesículas; (a)VUP; (b)VUG; (c)VML; (d)VOL; (e)VMV.

Os lipossomas compostos por diversas bicamadas sucessivamente separadas por compartimentos fluidos são denominados vesículas oligolamelares (VOL) ou multilamelares (VML), enquanto aquelas cujos interiores apresentam outros lipossomas de tamanhos variados são classificados como vesículas multivesiculares (VMV). Já as vesículas unilamelares apresentam uma única bicamada circundando o cerne aquoso, podendo ser pequenas (VUP), grandes (VUG) ou gigantes (VUGI).

As estruturas formadas pela associação de moléculas de compostos anfifílicos e lipídios podem ser afetadas pela estrutura das moléculas envolvidas, pelo tamanho da porção hidrofílica, pela presença de ramificações e insaturações nas cadeias hidrofóbicas, pela força iônica do meio aquoso e pela temperatura (ISRAELACHVILI, 1994).

### ***3.3.1 Mecanismos de Formação de Lipossomas***

Os mecanismos de formação das vesículas lipídicas ainda são pouco esclarecidos, principalmente pelo fato dos métodos físicos e químicos de análise existentes não conseguirem ainda caracterizar detalhadamente as estruturas intermediárias.

A formação dos diferentes tipos de vesículas (VML, VUP e VUG) foi descrita em 1988 por LASIC. Segundo este autor, a hidratação da monocamada mais externa do filme lipídico seco por adição de uma fase aquosa capaz de permear a bicamada, possibilita também a hidratação das monocamadas mais internas, ainda que em menor extensão. Este evento provoca o aumento do tamanho das cabeças polares dos lipídios e da área superficial externa, permitindo a formação de bolhas convexas a partir das quais crescem as bicamadas. Quando é atingido um certo distanciamento entre as bicamadas formadas, essa transformação cessa. Com a agitação do sistema, formam-se vesículas multilamelares ovais que, posteriormente, mudam para formas aproximadamente esféricas.

A distribuição e o tamanho das VML são influenciados pela intensidade da agitação aplicada, pela espessura do filme lipídico e mesmo pela capacidade volumétrica do frasco onde se preparam as vesículas. De acordo com este mecanismo, para a formação dos lipossomas, as moléculas anfifílicas devem estar necessariamente primeiro organizadas em lamelas ou bicamadas.

Embora a bicamada lipídica seja um dos arranjos estruturais mais simples, não é estável. Suas extremidades laterais hidrofóbicas ficam expostas a moléculas de água, o que resulta no enrolamento das bicamadas em estruturas esféricas fechadas que retêm um cerne aquoso, formando os lipossomas (LASIC, 1992).

As vesículas lipídicas formadas geralmente têm formas ovais, determinadas pelo número de moléculas de fosfolipídios da monocamada externa e pela natureza de sua formação. Com o decorrer do tempo, estas estruturas ovais transformam-se em esféricas que apresentam um volume retido maior e energias de curvaturas menores. Assim, a partir das bicamadas lipídicas previamente formadas podem ser gerados lipossomas unilamelares, com base em um mecanismo de brotamento ou pela produção de fragmentos de bicamada.

No primeiro caso, lipossomas unilamelares formam-se provavelmente devido a tensões no interior ou através das membranas, que alteram a forma da vesícula (WINTERHALTER e LASIC, 1993). No segundo caso os fragmentos de bicamada são produzidos através da dissipação de energia no sistema, como no caso dos tratamentos mecânicos. As bordas destes fragmentos ficam expostas ao meio aquoso e a tendência a minimizar a exposição da parte hidrofóbica das moléculas leva a um rearranjo do empacotamento das mesmas nesta região, o que gera a curvatura do fragmento da bicamada que, fechado, forma a vesícula unilamelar.

Outro mecanismo proposto envolve a coalescência das estruturas reversas após a retirada de um solvente orgânico com geração de bicamadas, quando a preparação do lipossoma é iniciada a partir de emulsões de água em óleo. A bicamada (fase gel) é rompida pela adição da fase aquosa, formando-se vesículas unilamelares (LASIC, 1992; WINTERHALTER e LASIC, 1993).

Um outro mecanismo é baseado na remoção de um detergente colocado em contato com os fosfolipídios e a eles associado em micelas por técnicas como a diálise. Neste caso, ocorre a desestabilização das micelas e a formação espontânea de vesículas unilamelares. A perda das moléculas de detergente das micelas aumenta o contato das cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios com a fase aquosa, o que induz ao arqueamento e diminuição do tamanho das estruturas para reduzir a área de contato entre as porções hidrofóbicas e a fase aquosa, culminando na formação das vesículas.

### *3.3.2 Preparação de Lipossomas*

A preparação dos lipossomas constitui uma das etapas mais importantes para o sucesso da formulação das vesículas, estando estritamente relacionada à correta seleção do método de preparação e da composição lipídica da bicamada. Diversas características físicas e físico-químicas dos lipossomas, como o tamanho, o número de lamelas, o volume encapsulado, a estabilidade, a permeabilidade e a capacidade de incorporação de compostos são diretamente relacionados à metodologia de preparação das vesículas (TALSMA e CROMMELIN, 1992b).

Para a formação dos lipossomas, diversos tipos de lipídios e outros compostos anfífilos podem ser utilizados. De maneira geral, os fosfolipídios são os compostos mais utilizados na preparação dos lipossomas, principalmente quando estas vesículas são destinadas a aplicações terapêuticas. Outro tipo de lipídios usados na preparação dos lipossomas são os esteróis.

Os fosfolipídios podem ser classificados em cinco categorias distintas: fosfolipídios de fontes naturais, fosfolipídios naturais modificados, fosfolipídios semi-sintéticos, fosfolipídios completamente sintéticos e fosfolipídios com grupos polares modificados (CROMMELIN e SCHREIER, 1994).

Os fosfolipídios de fontes naturais são muito utilizados devido ao seu custo relativamente baixo, à sua carga neutra e ao fato de serem quimicamente inertes (NEW, 1990), embora os lipossomas preparados com estes compostos apresentem pouca estabilidade de



estocagem devido às insaturações de suas porções hidrofóbicas. A modificação dos fosfolípidios naturais tem por objetivo diminuir estas insaturações e, conseqüentemente, sua susceptibilidade à oxidação.

No caso dos fosfolípidios semi-sintéticos, as porções hidrofóbicas são substituídas por grupos quimicamente definidos, enquanto nos lípidios sintéticos, sua estrutura é definida integralmente por via química. Quando feitas modificações da parte hidrofílica do fosfolípido, permitindo o acoplamento de outros grupos, tem-se os fosfolípidios com grupamentos polares modificados. Estes lípidios podem ser necessários para aplicações *in vivo* que envolvam determinadas interações moleculares e celulares.

O Colesterol (obtido de células animais) pertencente à categoria dos esteróis é freqüentemente utilizado para aumentar a estabilidade da bicamada lipídica. Este composto, por si só, é incapaz de formar estruturas em bicamadas e pode ser incorporado em membranas de fosfolípidios em proporções elevadas, da ordem de 50 % (MORAES, 1996).

Conforme o alvo de destino, os lipossomas são dimensionados quanto ao tamanho de partícula. Por exemplo, vesículas com diâmetros de até 100 nm são adequadas para a aplicação por via intravenosa. Também segundo seu alvo de destino, pode-se modificar a superfície da vesícula pela conjugação de determinantes moleculares, como anticorpos ou fragmentos destes, e/ou cadeias de polímeros, como de polietilenoglicol (PEG) para aumentar sua capacidade de interagir com células específicas e garantir uma maior estabilidade em fluidos biológicos, respectivamente.

A preparação das vesículas lipídicas geralmente, envolve três etapas: formação de um filme lipídico seco proveniente da evaporação dos solventes orgânicos utilizados na etapa de solubilização dos lípidios; dispersão do filme lipídico seco na fase aquosa e a obtenção de dispersões homogêneas de lipossomas (VUG, VUP ou VML).

NEW (1990) explica os principais detalhes experimentais para a produção de lipossomas em escala de laboratório por várias metodologias. As técnicas mais comumente utilizadas nesta escala e os tipos de vesículas obtidas através de sua implementação são listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Métodos de preparação e tipos vesículas obtidas (adaptado de MORAES, 1996).

<i>Método</i>	<i>Tipo de Vesícula obtida</i>
<b>Etapa de Hidratação</b>	
<i>A. Métodos Mecânicos</i>	
Agitação manual ou por vórtice	VML
Microfluidização	VUP
Borbulhamento de gás inerte	VML, VUG
Homogeneização com alto cisalhamento	VUP
<i>B. Métodos Baseados na Substituição de Solventes Orgânicos por Soluções Aquosas</i>	
Remoção de solventes orgânicos antes da hidratação	VML, VOL, VUP
Evaporação de fase reversa	VUG, VOL, VML
Uso de solventes imiscíveis com água	VML, VOL, VUG
Uso de solventes miscíveis com água	VML, VOL, VUP
<i>C. Métodos Baseados na Remoção de Detergente</i>	
Cromatografia de filtração em gel	VUP
Diálise lenta	VUG, VOL, VML
Diálise rápida	VUG, VOL
Técnicas mistas	VUG, VOL, VUG, VUP
<i>D. Métodos Baseados na Modificação de Tamanho e Fusão</i>	
Fusão espontânea de VUP na fase de gel	VUG
Congelamento/ Descongelação	VML
Liofilização	VML
Desidratação/ Reidratação seguida ou não de ajuste de diâmetro	VUP, VUG
Fusão induzida por íons $\text{Ca}^{2+}$	VUG, VOL, VML
Crescimento de lipossomas induzido por detergente	VUG, VOL
<i>E. Métodos Baseados em Ajuste de pH</i>	VUP, VUG
<b>Etapa de Redução de Tamanho</b>	
<i>A. Extrusão a Alta Pressão</i>	VOL, VUP, VUG
<i>B. Extrusão a Baixa Pressão</i>	VUP, VUG
<i>C. Tratamento Ultra-Sônico</i>	VUP
<b>Etapa de Remoção do Material não Encapsulado</b>	
<i>A. Diálise</i>	
<i>B. Ultracentrifugação</i>	
<i>C. Cromatografia de Permeação em Gel</i>	
<i>D. Resinas de Troca Iônica</i>	

As técnicas de preparação de lipossomas têm sido descritas extensivamente em um número considerável de bibliografias, (LASIC, 1988; NEW, 1990; TALSMA e CROMMELIN, 1992a; BARENHOLZ e CROMMELIN, 1994; CROMMELIN e SCHREIER, 1994). A diferença principal entre elas baseia-se nas maneiras pelas quais são feitas as etapas de preparação, hidratação dos lipídios, redução do tamanho das vesículas e remoção do material não encapsulado.

Entre as principais técnicas que envolvem a preparação das vesículas tem-se: técnicas de dispersão mecânica, de substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas, de remoção de detergente, de mudança de tamanho, de fusão de vesículas e de variações de pH durante a hidratação dos lipídios.

As técnicas de extrusão ou sonicação de vesículas multilamelares, podem ser utilizadas para a redução do tamanho dos lipossomas, o qual, conforme mencionado anteriormente, é dimensionado de acordo com o alvo de destino.

A separação do material não encapsulado nos lipossomas pode ser obtida utilizando técnicas de diálise, ultracentrifugação e cromatografia de filtração em gel, todas com base nas diferenças de tamanho apresentadas entre as vesículas e os compostos nela incorporados, e por remoção com resinas de troca iônica, que explora a diferença de cargas entre as vesículas e o material não encapsulado (NEW, 1990).

### ***3.4 Incorporação de Compostos Terapêuticos em Lipossomas***

Embora pela complexidade do sistema não seja possível prever o comportamento dos lipossomas *in vivo*, um projeto de partícula adequado contribui consideravelmente para que o objetivo de elevação do índice terapêutico do medicamento seja atingido.

Na atualidade, a maior aplicação farmacológica dos lipossomas é a liberação controlada de compostos terapêuticos, destacando-se as aplicações na terapia do câncer, ao lado de doenças infecciosas, inflamações, doenças do sistema imunológico e cardiovasculares.

Assim, é muito importante a obtenção de lipossomas com boa eficiência de encapsulamento, principalmente quando existem dificuldades na recuperação do material não incorporado nos lipossomas ou quando é necessário administrar doses elevadas do medicamento (BARENHOLZ e CROMMELIM, 1994).

A localização dos compostos terapêuticos nos lipossomas é definida principalmente pelas características físico-químicas dos mesmos, que fornecem indícios das técnicas mais adequadas para o seu encapsulamento. Algumas destas características são sua partição entre a bicamada lipídica e o meio aquoso, a solubilidade e a massa molecular da droga (MADDEN et al., 1990).

Os estudos da partição dos compostos terapêuticos comumente utilizados no tratamento da Tuberculose em sistemas óleo/soluções aquosas e octanol/soluções aquosas permitem uma estimativa da distribuição das drogas entre as partes hidrofílica e lipofílica dos lipossomas, possibilitando análises preliminares de otimização da incorporação e retenção destes compostos nas vesículas lipídicas. O coeficiente de partição de uma droga em um solvente orgânico relativamente não polar e a água é geralmente aceito como uma medida adequada da lipofilicidade do composto.

A distribuição de um soluto entre duas fases nas quais este é solúvel é decorrente da sua afinidade com cada solvente imiscível. Após os primeiros estudos sistemáticos realizados por BERTHELOT e JUNGFLAISCH em 1872, que mediram a distribuição de  $I_2$  e  $Br_2$  entre  $CS_2$  e água, pôde-se constatar que a razão entre as concentrações de soluto distribuídas entre dois solventes imiscíveis é uma constante independente dos volumes relativos de solução utilizados.

Durante muitos anos deste século um grande número de trabalhos relacionados a coeficientes de partição foram publicados, a maioria deles objetivando a determinação da constante de ionização de ácidos e bases moderados em meio aquoso. Após outros métodos mais eficazes de determinação desta constante serem desenvolvidos, as medidas de partição começaram a ser utilizadas para calcular a constante de dissociação de ácidos orgânicos em fase não aquosa como uma função da temperatura.

Posteriormente, foram propostas equações matemáticas que relacionavam o coeficiente de partição com o número de extrações necessárias para a remoção de um soluto de uma solução. Recentemente, os coeficientes de partição estão sendo utilizados como um parâmetro de referência para interações hidrofóbicas em bioquímica e farmacologia.

A simples agitação de um soluto em dois solventes imiscíveis e posterior análise da concentração do soluto em uma ou ambas as fases é o método mais utilizado de medida de coeficiente de partição (LEO et al., 1971). No entanto, deve-se mencionar algumas outras técnicas fundamentais para a sua medição. O quociente de solubilidade em duas fases de solventes distintos é medido e chamado coeficiente de partição (P). Entretanto, este está definido apenas para condições de saturação, pois apresenta distinção de valores quando em baixas concentrações de soluto ou, ainda, sem apresentar as fases mutuamente saturadas. A quantidade de água solúvel em vários solventes, por exemplo, pode ser bastante alta, mudando significativamente as características da outra fase.

Na literatura, pode-se encontrar muitos métodos que foram empregados para o simples problema de mistura e separação das duas fases para obter uma distribuição de equilíbrio do soluto. Muitos trabalhos sugerem períodos de agitação de aproximadamente uma hora ou mais. No entanto, apenas a inversão do tubo repetidamente é uma forma eficiente, pois o estabelecimento do equilíbrio se processa em um ou dois minutos. Todavia, deve-se ater ao fato de que agitações muito intensas devem ser evitadas, pois têm a tendência à formação de emulsões.

O coeficiente de partição de uma droga entre solventes aquosos e solventes orgânicos apropriados pode ser usado como ferramenta inicial em estudos de encapsulamento de compostos terapêuticos em lipossomas, dando indícios inclusive da possível localização da droga na vesícula.

### *3.4.1 Técnicas de Encapsulamento de Compostos Terapêuticos em Lipossomas*

A incorporação dos compostos terapêuticos em lipossomas pode ser feita por incorporação passiva ou ativa (MAYER et al., 1986). Na incorporação passiva, o agente terapêutico é encapsulado durante a formação das vesículas ou em uma etapa onde a estrutura dos lipossomas se encontra perturbada. Uma maneira de se realizar este tipo de encapsulamento, no caso de compostos hidrofílicos, é mediante a hidratação das bicamadas lipídicas com uma solução aquosa do composto em estudo. Neste tipo de processo, a eficiência, determinada pela fração de composto terapêutico incorporado na vesícula, é diretamente influenciada pelo volume aquoso retido no cerne da vesícula onde a droga se encontra dissolvida e que, por sua vez, depende do tamanho e do número de lamelas do lipossoma (MORAES, 1996).

Para os compostos predominantemente hidrofóbicos, a incorporação passiva pode ser feita diretamente na bicamada lipídica, dissolvendo-se o composto e os lipídios simultaneamente no mesmo solvente orgânico. Neste caso, a quantidade de droga incorporada será dependente da estabilidade da bicamada lipídica, onde o número de moléculas de composto acomodadas não deverá afetar, de maneira substancial, o empacotamento das moléculas de lipídios.

Na incorporação ativa, o composto que se deseja encapsular é misturado a lipossomas previamente preparados que apresentam um gradiente de prótons estabelecido entre as fases aquosas interna e externa das vesículas (o pH da fase aquosa interna dos lipossomas é normalmente mantido em valores menores que os valores do ambiente externo), conforme ilustrado na Figura 5.

Esta incorporação é especialmente útil no encapsulamento de amins lipofílicas, que são moléculas constituintes de vários compostos terapêuticos. O encapsulamento ativo é baseado no fato de que apenas espécies não protonadas (neutras) podem atravessar a bicamada lipídica dos lipossomas, enquanto que as moléculas carregadas não apresentam esta capacidade.

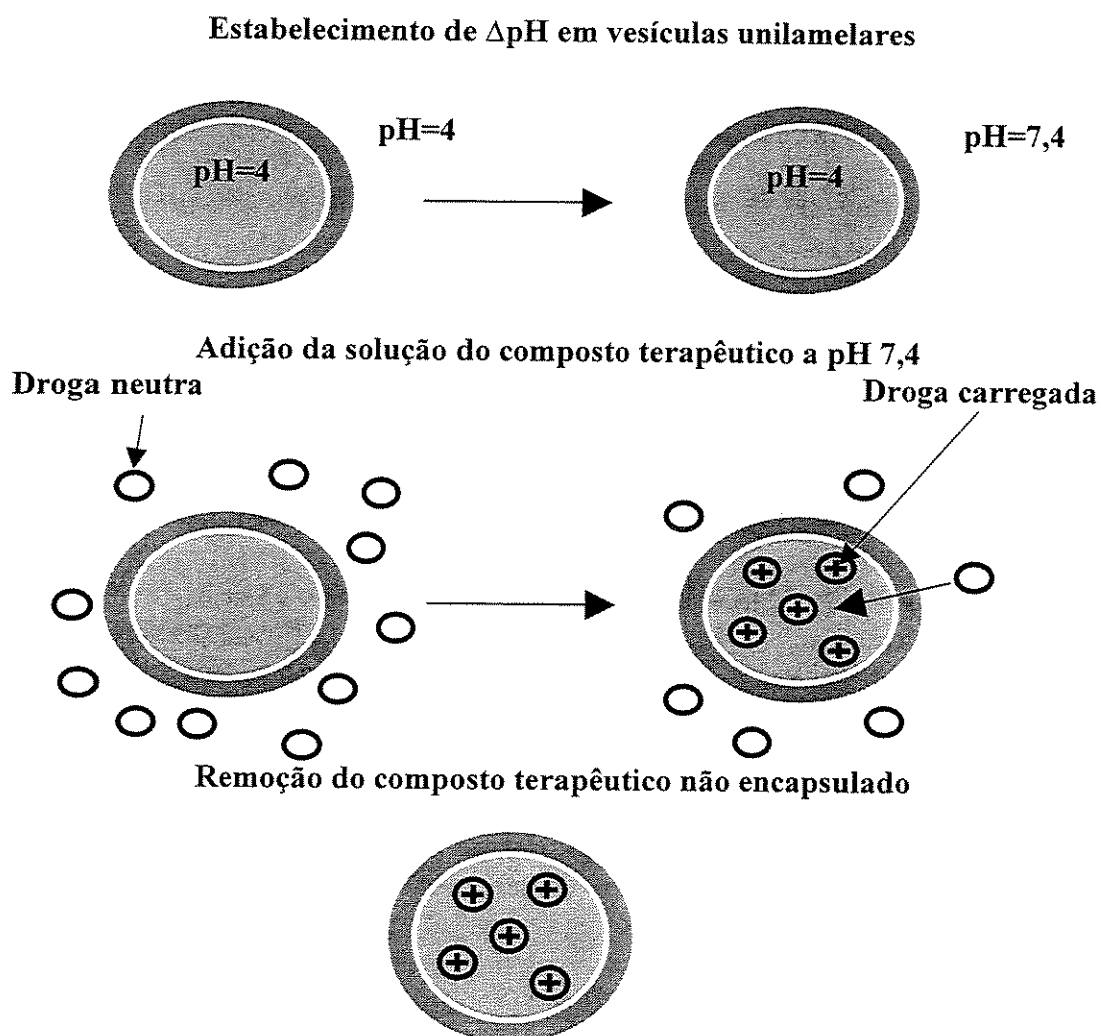


Figura 5 - Encapsulamento ativo de drogas em vesículas lipídicas unilamelares.

Assim, tendo-se um excesso de prótons na fase aquosa interna das vesículas, o composto encapsulado torna-se positivamente carregado, não sendo mais permeado através da bicamada lipídica, o que induz seu acúmulo no interior das vesículas. O efeito do gradiente de prótons nas concentrações do composto terapêutico nos ambientes interno e externo das vesículas é descrito pela equação de Henderson-Hasselbach (2):

$$\frac{[HA^+]_{\text{interna}}}{[HA^+]_{\text{externa}}} = \frac{[H^+]_{\text{interna}}}{[H^+]_{\text{externa}}} \quad (2)$$

MADDEN et al. (1990), MAYER et al. (1990) e MAYER et al. (1993) avaliaram a incorporação de compostos terapêuticos em resposta a gradientes de pH, demonstrando que esta técnica pode ser usada para uma ampla variedade de drogas, com eficiências de encapsulamento próximas a 100 %. Estes autores observaram que ocorre uma considerável variabilidade de respostas ao gradiente de pH entre os diferentes compostos por eles estudados, dependendo das características dos mesmos, tais como o pK, a tendência de interagir com a bicamada e das condições experimentais utilizadas, como a temperatura.

O encapsulamento ativo de compostos em lipossomas apresenta as seguintes vantagens em relação ao encapsulamento passivo: pode-se obter elevadas eficiências de encapsulamento, não é necessária a remoção do material não encapsulado se a eficiência de encapsulamento for de 100 %, evita a exposição do composto encapsulado a solventes orgânicos, detergentes ou a condições onde seja envolvido cisalhamento intenso e, por último, permite que o encapsulamento seja feito imediatamente antes do uso dos lipossomas, evitando a degradação de compostos e desestabilização da vesícula durante períodos de estocagem.

No caso específico do encapsulamento de compostos terapêuticos de tratamento primário e secundário da Tuberculose, as técnicas que mais possivelmente conduziriam a um encapsulamento satisfatório das referidas drogas em lipossomas são listadas na Tabela 3, baseada nos dados de solubilidade apresentados na Tabela 1. Nota-se a factibilidade de encapsulamento passivo para todos os compostos terapêuticos.

Devido à dificuldade em se obter dados na literatura sobre os valores de possíveis constantes de ionização (pKa) das moléculas dos compostos terapêuticos em estudo e às estruturas relativamente complexa de algumas delas, a predição do comportamento com relação à incorporação ativa nas vesículas lipídicas não é imediata. No entanto, supõe-se que das drogas em estudo, a Rifampicina teria menor probabilidade de se acumular em lipossomas



pelo uso de gradientes de pH, devido a não apresentar nitrogênios tão facilmente protonáveis quanto os das outras drogas.

Tabela 3 - Possível localização e possíveis técnicas de encapsulamento nos lipossomas das drogas Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida e Estreptomicina. A incorporação passiva combinada refere-se ao encapsulamento simultâneo no cerne aquoso e na bicamada lipídica.

<b>Drogas</b>	<b>Caráter predominante</b>	<b>Possível localização na vesícula.</b>	<b>Possível técnica de encapsulamento</b>
Isoniazida	Hidrofílico	Cerne aquoso	Incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico.
Pirazinamida	Misto Hidrofóbico e Hidrofílico	Imersa na bicamada e no cerne aquoso.	Incorporação passiva combinada ou incorporação passiva só durante a hidratação do filme lipídico.
Rifampicina	Misto Hidrofóbico e Hidrofílico	Imersa na bicamada e no cerne aquoso.	Incorporação passiva combinada ou incorporação passiva só durante a hidratação do filme lipídico.
Etionamida	Hidrofóbico	Imersa na bicamada.	Incorporação passiva durante a formação do filme lipídico.
Estreptomicina	Hidrofílico	Cerne aquoso.	Incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico.

Os lipossomas utilizados como reservatórios e transportadores de moléculas de interesse terapêutico permitem teoricamente a liberação destes compostos encapsulados sob condições pré-estabelecidas, mantendo as propriedades originais dos lipossomas. A liberação indesejável da droga depende de sua natureza físico-química e da composição dos lipossomas. Uma desestabilização dos lipossomas pode afetar esta liberação controlada e isto poderia acontecer devido a diversos processos químicos e físicos, por reações de degradação que alterariam a permeabilidade da bicamada lipídica, pela agregação e fusão das vesículas e pela interação com moléculas anfifílicas (MORAES, 1996).

### 3.5 Lipossomas como Veículos na Liberação Controlada de Medicamentos

De maneira equivalente a géis e emulsões, os lipossomas são usados como veículos para o encapsulamento de medicamentos, fazendo parte dos sistemas coloidais de administração controlada de drogas da medicina moderna. Estes dispositivos são de especial importância na administração de drogas instáveis e em terapias nas quais a droga deve ser liberada em um alvo específico (KREUTER, 1994).

As aplicações dos lipossomas como veículos para a liberação controlada de drogas representa uma opção promissora para o transporte e deposição específica de compostos terapêuticos em células, baseado em diversas características de importância farmacológica (BARENHOLZ e CROMMELIN, 1994). Os lipossomas podem ser facilmente caracterizados física e quimicamente, além de apresentar baixa toxicidade, sendo biocompatíveis devido à sua biodegradabilidade (composição similar à de membranas biológicas) e à sua reduzida imunogenicidade. Pode-se predefinir uma relação entre as características da vesícula e a rota de administração das drogas, observando-se que os lipossomas são capazes de alterar a farmacocinética e biodistribuição das drogas.

Os sistemas usados no transporte de drogas, especificamente os lipossomas, são capazes de proteger os compostos terapêuticos por eles encapsulados dos processos de diluição e degradação no sangue que normalmente ocorrem quando estas drogas são apresentadas na sua forma livre, de maneira que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento, as vesículas podem liberar doses mais concentradas dos medicamentos. Esta liberação controlada das drogas pode ser levada a cabo tanto em fluidos corpóreos (agindo como micro-reservatórios) quanto no interior de células (após a endocitose), reduzindo a exposição de tecidos sensíveis à ação de drogas tóxicas.

Finalmente, a farmacocinética e a biodistribuição *in vivo* de lipossomas podem ser controladas pela seleção adequada da via de administração, da composição em lipídios e do tamanho da vesícula.

A prescrição da dosagem de um medicamento é o resultado de um compromisso entre a sua eficiência e toxicidade, normalmente expresso como o índice terapêutico. Este índice é definido como a razão entre a eficácia da droga e os seus efeitos colaterais. Assim, as drogas são prescritas em quantidades elevadas o bastante para controlar o problema do paciente, mas em quantidades baixas o suficiente para evitar danos inaceitáveis a tecidos saudáveis (OSTRO,1987a).

O índice terapêutico é uma função complexa de vários parâmetros, dentre os quais os principais são a farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição de uma droga particular. Todos esses fatores podem ser influenciados pela administração das drogas com sistemas liberadores específicos quando comparados à administração das drogas na forma livre.

Em terapias onde sejam utilizados lipossomas, a droga encapsulada pode ter como destino os alvos naturais (sistema imunológico) ou específicos (órgãos, locais ou tumores específicos).

Lipossomas quimicamente modificados com determinantes moleculares superficiais seletivos e de grande afinidade, como anticorpos, são capazes de atingir alvos específicos. Lipossomas desprovidos de modificações na superfície têm como destino as células do sistema imunológico.

### *3.5.1 Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos*

Os lipossomas podem interagir por adsorção com praticamente qualquer tipo de célula. A velocidade com que uma droga é liberada de um lipossoma adsorvido depende do tamanho e composição da membrana lipídica, do tipo de droga encapsulada e da natureza da célula (OSTRO, 1987a). Após a adsorção, as vesículas lipídicas podem sofrer processos de endocitose, sendo englobadas pelas células, de troca de lipídios com a membrana celular, ou de fusão à célula, onde a bicamada lipídica dos lipossomas integra-se à membrana celular e o conteúdo aquoso da vesícula é anexado ao fluido citoplasmático (OSTRO, 1987a).

Outra característica importante do comportamento dos lipossomas *in vivo* é a interação com componentes dos fluidos biológicos, como as proteínas. As opsinas são proteínas capazes de promover o rápido reconhecimento e remoção das vesículas da corrente sanguínea. Esta remoção é feita por células do sistema fagocitário mononucleado, também conhecido como sistema reticuloendotelial (SER). Outras proteínas, tais como as lipoproteínas, quando adsorvidas na superfície dos lipossomas, desestabilizam a bicamada pela troca de lipídios.

A integridade dos lipossomas é também afetada por sua interação com moléculas apresentando atividade de superfície. Neste caso não apenas o tamanho e a estrutura das vesículas são afetados, mas também a sua permeabilidade. Os efeitos dessas interações têm sido estudados, elucidando alguns aspectos da estabilidade dos lipossomas (SUNAMOTO et al., 1978; NILSSON et al., 1987; RUIZ et al., 1988; URBANEJA et al., 1988; EDWARDS et al., 1989; EDWARDS E ALMGREN, 1990; 1991; 1992).

### 3.5.2 Lipossomas Estericamente Estabilizados

Nos últimos anos, foi desenvolvida uma nova e importante classe de vesículas lipídicas, com valores de tempo de meia vida de circulação ( $t_{1/2}$ ) de até 12 horas após sua administração. Este comportamento específico é obtido pela presença de glicolipídios específicos (GM1, GD, GT) e fosfatidilinositol hidrogenado na membrana dos lipossomas, os quais conferem-lhe caráter neutro ou cargas negativas parcialmente protegidas (ALLEN et al., 1985; ALLEN e CHONN, 1987; ALLEN et al., 1989, 1991; LIU et al., 1991; GABIZON e PAPAHDJOPOULOS, 1988; 1992).

Devido ao alto custo destes compostos, o que praticamente inviabiliza sua utilização terapêutica, sugeriu-se a incorporação de polímeros hidrossolúveis às vesículas fosfolipídicas, uma vez que tem sido observado um decréscimo na imunogenicidade e na antigenicidade de proteínas ligadas a poli-oxietilenos.

Lípidios sintéticos contendo grupos hidrofílicos volumosos resultantes do acoplamento covalente de cadeias de polietilenoglicol (PEG) aos fosfolípidios foram incorporados a esta classe de compostos capazes de aumentar o tempo de circulação e a estabilidade dos lipossomas (KLIBANOV et al., 1990; BLUME e CEVC, 1990; PAPAJOHANNIDIS et al., 1991; LASIC et al., 1991; WOODLE et al., 1992).

A estabilização destes lipossomas contendo PEG e seu aumento no tempo de circulação é explicado por um modelo quantitativo que propõe que estas importantes características são devidas à concentração superficial de grupos altamente hidratados que inibem estericamente as interações eletrostáticas e hidrofóbicas da maioria dos componentes do sangue com a superfície das vesículas lipídicas, constituindo uma opção relevante na estabilização da estrutura de lipossomas destinados à administração por via intravenosa.

### *3.6 Aplicação de Lipossomas na Terapia da Tuberculose*

É de grande importância o desenvolvimento de novas formas ou sistemas de liberação de compostos terapêuticos empregados no tratamento da tuberculose, com o objetivo de diminuir os riscos e as ineficiências dos processos de administração convencionais.

A incorporação destes fármacos em lipossomas reduziria o número e a intensidade dos efeitos colaterais, poupando tecidos saudáveis, como os rins e o fígado, e também poderia diminuir a necessidade de doses frequentes do medicamento que, aliado aos efeitos colaterais nocivos, constituem alguns dos aspectos característicos do tratamento da Tuberculose. Estas vesículas seriam capazes de permanecer no organismo liberando lentamente a droga por intervalos de tempo prolongado.

O encapsulamento dos fármacos antituberculose em lipossomas também teria a vantagem de possibilitar sua administração através de diversas rotas, incluindo as vias pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intravenosa, de acordo com as características dos lipossomas preparados.

A administração por via intravenosa de lipossomas convencionais e estericamente estabilizados com Polietilenoglicol, por exemplo, poderia combater os bacilos alojados no sistema retículo-endotelial, enquanto a administração de lipossomas nebulizados poderia aumentar o tempo de retenção da droga nos pulmões (SHEK et al., 1994).

Os lipossomas são adequados para a administração de drogas por inalação pelo fato de que estas vesículas podem ser preparadas de materiais endógenos aos pulmões, como os componentes do surfatante pulmonar. Este surfatante previne o colapso dos alvéolos, sendo constituído em cerca de 85 % por fosfolípidios, principalmente Dipalmitoilfosfatidilcolina, seguido de Fosfatidilglicerol, contendo também Colesterol, proteínas e carboidratos (TAYLOR e NEWTON, 1992).

Além disto, a administração dos lipossomas por inalação encapsulando os compostos terapêuticos teria como receptor o sistema pulmonar, que é bastante atrativo como portal de entrada de drogas, tanto para a terapia local como para o tratamento sistêmico de infecções, por ser um sistema de fácil acesso, ter elevada área superficial, baixos níveis de enzimas extracelulares e elevado fluxo sanguíneo regional.

Embora o encapsulamento de agentes antituberculose em lipossomas seja bastante promissor, alguns fatores de importância primordial devem ser levados em consideração no projeto racional das vesículas lipídicas e no controle e indução da liberação da droga. Devido ao mecanismo pelo qual alguns organismos, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, não são destruídos no interior das células fagocitárias (pela prevenção da fusão fagolisossômica), a probabilidade de que os antibióticos encapsulados em lipossomas possam ser liberados diretamente aos microrganismos patogênicos diminui. Entretanto, a composição dos lipossomas pode ser selecionada de forma que os mesmos sejam capazes de liberar a droga encapsulada como uma consequência da alteração das condições ambientais, como temperatura e pH.

Em adição, lipossomas com características adequadas para a administração por inalação consistem em boa opção do ponto de vista de nível de conforto do paciente, em comparação, por exemplo, à administração de compostos terapêuticos por via intravenosa. Os efeitos da

administração de lipossomas via inalação foram testados por THOMAS et al. (1991). Estes autores demonstraram que os efeitos agudos da inalação de vesículas pequenas de Fosfatidilcolina de Soja por voluntários saudáveis foram bem tolerados, não resultando em alterações aparentes na função pulmonar, embora a sua administração crônica pudesse resultar em doses cumulativas de fosfolípidios maiores que a normalmente encontrada no surfatante pulmonar.

Também em 1991, GONZALEZ-TOTHI et al. estudaram a toxicidade de lipossomas inalados, não encontrando inibição da atividade ou viabilidade fagocitária após a exposição prolongada de macrófagos alveolares a lipossomas.

O encapsulamento de compostos terapêuticos em lipossomas para aplicação na terapia da Tuberculose já foi analisado por alguns grupos. VLADIMIRSKI et al., 1980, 1983 e VLADIMIRSKI e LADIGINA (1982), trataram ratos usando Isoniazida e Estreptomicina encapsuladas em lipossomas com resultados aparentemente satisfatórios. VLADIMIRSKI e LADIGINA (1982) trataram camundongos infectados com o *M. tuberculosis* com lipossomas de diâmetro entre 40 e 80 nm encapsulando Estreptomicina. Os autores observaram que os lipossomas foram mais efetivos que a droga livre no prolongamento da sobrevivência dos animais e na redução do número de microrganismos no baço, mas não nos pulmões.

Em 1986, OROZCO et al. usaram a combinação de Rifampicina e Isoniazida encapsuladas em lipossomas para o tratamento da Tuberculose e observaram uma melhor eficácia terapêutica das drogas encapsuladas quando comparadas com sua forma livre.

A Ciprofloxacina tem demonstrado bom nível de atividade bactericida *in vitro* para um grande número de patógenos causadores de infecções respiratórias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* (GAY et al., 1984; HEIFETS, et al., 1987). A droga livre administrada por via intravenosa ou oralmente apresenta uma farmacocinética relativamente desfavorável, tendo sido observado o curto tempo de eliminação (de 1 a 1,6 horas) e a pequena área na curva de concentração por tempo de 43 até 113 mg.hora/litro (BERGOGNE-BÉREZIN, 1993). WONG et al. (1993, 1995) descreveram formulações de lipossomas para o encapsulamento de

Ciprofloxacina, demonstrando que, quando administrada a ratos por via intranasal, a retenção da droga nos pulmões era significativamente maior quando comparada com a droga livre, com um tempo de meia-vida de 8 a 10 horas.

Similarmente, as drogas Amikacina (CYNAMON et al., 1989), Rifampicina (SAITO e TOMIOKA, 1989) e Gentamicina (NIGHTINGALE et al., 1993) demonstraram maior eficiência quando encapsuladas em lipossomas.

OROZCO et al., em 1990, estudaram a dinâmica de distribuição dos lipossomas como transportadores de droga para o tratamento da Tuberculose. Três tipos de lipossomas foram usados, variando sua composição e razão molar lipídica, sendo administrados por via intravenosa em ratos saudáveis e em ratos tuberculosos. Quando a distribuição dos lipossomas nos ratos sadios e tuberculosos foi comparada, um acúmulo maior no fígado, no baço e nos pulmões dos ratos saudáveis foi observado, embora o tempo de retenção em ratos tuberculosos fosse mais longo, concluindo-se que a dinâmica da distribuição e a retenção de drogas encapsuladas em lipossomas diferem entre animais normais e infectados. Foi observado, também, um maior acúmulo dos lipossomas compostos por Fosfatidilcolina, Colesterol e Cardiolipina na razão de 7:2:1.

Em 1991, MYERS et al. estudaram a exposição de ratos a lipossomas inalados por um mês de tratamento crônico, não observando alterações no funcionamento dos macrófagos alveolares ou, ainda modificação do tecido pulmonar.

KURUNOV et al., em 1992, estudaram a eficácia de Rifampicina na forma livre e encapsulada em lipossomas multilamelares de Fosfatidilcolina e Colesterol em um modelo de Tuberculose generalizada em ratos BALB/c. A Rifampicina na forma encapsulada não mostrou resultados significativos sobre a dosagem da droga na forma livre.

Em 1992, GANGADHARAM et al. pesquisaram o papel quimioterapêutico da Estreptomicina na progressão da doença causada pelo *Mycobacterium avium* (MAC) em ratos. Em um primeiro experimento, a Estreptomicina (100 mg/kg) administrada intramuscularmente cinco dias por semana durante um mês causou a redução significativa das colônias de células de MAC dos pulmões, do baço e do fígado.



No mesmo experimento, a droga encapsulada em lipossomas multilamelares e administrada (15 mg/kg) em duas injeções intravenosas causou uma redução maior das colônias nos três tecidos. No segundo experimento, o efeito da droga livre (150 mg/kg) administrada durante cinco dias por dois meses, foi comparado com a administração de 15 mg/kg da droga encapsulada em lipossomas unilamelares administrados em quatro injeções (uma por semana), sem tratamento adicional nas quatro semanas seguintes. Resultados similares aos do primeiro experimento foram obtidos. Em ambos, o encapsulamento da droga em lipossomas resultou no aumento da eficácia quimioterapêutica, quando os dados foram expressos como a redução das colônias de MAC por unidade de dose de droga.

METHA et al., em 1993, estudaram a atividade antibacteriana de 19 drogas antituberculose e identificaram sete delas como agentes que poderiam ser potencialmente incorporados em lipossomas. Foram preparados lipossomas multilamelares de Dimiristoilfosfatidilcolina e Dimiristoilfosfatidilglicerol (7:3), incorporando estes compostos terapêuticos com eficiências de encapsulamento na faixa de 62 até 100 %. As drogas Clofazimina e Esparfloxacina mostraram as melhores eficiências. Todas as drogas foram encapsuladas pelo método de hidratação em evaporador rotatório. Quando comparadas as atividades antibacterianas *in vitro* destes compostos em sua forma livre e encapsulados em lipossomas, os resultados mostraram que estas estiveram mantidas depois que as drogas foram incorporadas em lipossomas.

Resultados promissores foram obtidos por AGARWAL et al. (1994) para o uso de lipossomas constituídos de Fosfatidilcolina de ovo encapsulando o agente Rifampicina. A atividade antituberculose dos lipossomas foi aumentada pelo acoplamento do tetrapeptídeo ativador de macrófagos tuftsin na superfície das vesículas. A administração intermitente destes lipossomas (duas vezes por semana) foi mais efetiva na redução do número de bacilos localizados nos pulmões de camundongos que o tratamento contínuo, levando a um aumento da efetividade de pelo menos 2000 vezes em relação à droga livre.

Também em 1994, BERMUDEZ estudou o uso *in vitro* e *in vivo* de preparações de lipossomas contendo antibióticos na terapia de infecções causadas por microrganismos do gênero *Mycobacterium* (*M. avium* e *M. tuberculosis*), confirmando que os lipossomas têm a vantagem de liberar concentrações mais elevadas dos compostos antimicrobianos nas células infectadas, quando comparados com a droga livre.

KOGA et al. (1994) mostraram que maior eficácia no tratamento da Tuberculose em camundongos é obtida pelo uso de Estreptomicina e de Amikacina encapsulada em lipossomas que através da administração das drogas livres. Similarmente, lipossomas associados aos glicosídeos asiaticosídeo e corcorusina provaram ter efeito microbicida mais efetivo nas células de *M. tuberculosis* que os glicosídeos em suas formas livres em solução (MEDDA et al., 1995).

YU-KYOUNG et al., em 1995, pesquisaram formulações dos antibióticos Ciprofloxacina e Azitromicina encapsulados em lipossomas e testaram suas atividades antibacterianas *in vitro* para o *M. avium complex*. O método convencional de encapsulamento passivo resultou na incorporação de uma pequena fração da Ciprofloxacina adicionada, na proporção de 0,225 mol de droga/mol de lipídio, em contraste a um encapsulamento usando gradientes de pH, que resultou em uma eficiência de 94 % (0,52 mol de droga/mol de lipídio). No caso da Azitromicina encapsulada pelo método de congelamento-descongelamento, obteve-se uma razão molar final droga/lipídio de 0,33. Ambas as drogas incrementaram sua inibição intracelular do crescimento do *M. avium complex* quando encapsuladas em lipossomas.

KURUNOV et al. (1995) testaram a inalação de agentes bactericidas livres e encapsulados em lipossomas para a terapia de Tuberculose em camundongos, observando que maior eficiência foi obtida pela inalação diária dos lipossomas contendo as drogas. A eficácia de administrações diárias e intermitentes por inalação de drogas antituberculose na forma livre em soluções aquosas e encapsuladas em lipossomas foram avaliadas na terapia de ratos tuberculosos BALB/c. Os melhores efeitos foram obtidos com as inalações diárias de drogas encapsuladas em lipossomas. Apesar do fato do regime intermitente das drogas encapsuladas

em lipossomas ter envolvido uma dosagem menor, sua eficácia não foi inferior à terapia diária com as soluções aquosas das drogas. A alta eficiência dos lipossomas diminuiu as prolongadas persistências das altas concentrações de Rifampicina no tecido pulmonar.

Em 1997 CONLEY et al., avaliaram o uso de 12 tipos comerciais de nebulizadores para a liberação de Ciprofloxacina encapsulada em lipossomas e tomando como base seus melhores resultados, foi usada Ciprofloxacina na forma de aerossol encapsulada em lipossomas para o tratamento de ratos infectados com doses letais de *Francisella tularensis*. Todos os ratos tratados com o aerossol de lipossomas encapsulando a droga sobreviveram à infecção. Os ratos tratados ou não com a droga livre sucumbiram à infecção.

Em 1997, PARAMPAL et al. avaliaram a eficiência de Isoniazida e Rifampicina encapsulada em lipossomas do tipo Stealth, específicos para uso pulmonar; contendo Fosfatidilcolina, PC; Colesterol, Col; Dicetilfosfato, DCP; Distearoilfosfatidiletanolamina-Polietilenoglicol 2000, DSPE-PEG e O-estearoil amilopectina, O-SAP. A droga livre e encapsulada foi injetada em ratos tuberculosos de três a quatro semanas de idade infectados por via intravenosa com o *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. As doses foram de duas vezes por semana durante seis semanas. A eficiência foi avaliada em termos da eliminação do microrganismo dos órgãos infectados dos ratos, sendo esta mais elevada com as drogas encapsuladas do que com as drogas livres. A redução das colônias de células nos pulmões, fígado e baço foi também significativamente superior com o uso das drogas encapsuladas em lipossomas abaixo das concentrações terapêuticas geralmente usadas. Foi avaliada também a hepatotoxicidade das drogas livres e das drogas encapsuladas pelos níveis de enzimas hepáticas e bilirrubina total, onde os menores valores corresponderam às drogas encapsuladas, indicando sua menor toxicidade. Estes resultados sugerem que drogas antituberculose encapsuladas em lipossomas podem oferecer resultados terapêuticos melhores que o regime quimioterapêutico existente para a Tuberculose.

DEOL e KHULLER, em 1997, efetuou a modificação da superfície de lipossomas Stealth por adição de O-estearoilamilopectina (O-SAP), o que resultou no aumento da afinidade destes lipossomas ao tecido pulmonar de ratos. Os lipossomas contendo PC de ovo, Col., Dicetilfosfato,

O-SAP, mono-sialogangliosideo glicol de GM1 e Distearoilfosfatidiletanolamina acoplada a PEG de massa molecular 2.000 Da foram os mais estáveis e seu acúmulo foi maior nos pulmões que no sistema reticuloendotelial dos ratos normais e tuberculosos. *In vivo*, a administração destes lipossomas resultou na liberação lenta e controlada das drogas encapsuladas. Para a Isoniazida e a Rifampicina encapsulada em lipossomas, os autores observaram uma redução da toxicidade *in vivo* em comparação com as drogas livres, destacando-se a menor toxicidade aos macrófagos peritoneais.

SILER-MARINKOVIC et al. (1997), em um trabalho de revisão do uso de lipossomas como carregadores de drogas antimicrobianas, destacam sua potencialidade na terapia de doenças causadas por microorganismos do tipo *Mycobacterium*, relatando que o encapsulamento de diversos agentes tuberculostáticos em lipossomas resultou em maior atividade *in vitro* e *in vivo* das drogas.

Em resumo, esta revisão da literatura mostra que estes trabalhos fundamentam o desenvolvimento desta estratégia de rejuvenescimento de drogas antituberculose para possíveis aplicações clínicas. Além de sua aplicação na terapia da Tuberculose, os lipossomas podem também ser utilizados na prevenção e controle desta enfermidade, possibilitando o encapsulamento de compostos indutores de resposta imunológica acentuada ao *M. tuberculosis* (SINGH e KHULLER, 1994; KOGA et al., 1994).

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIAIS E METODOLOGIA**

#### ***4.1 Materiais***

As drogas puras Isoniazida (Ácido Isonicotínico), Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Sulfato de Estreptomicina, os solventes orgânicos 1-Octanol e n-Dodecano, o agente tamponante Hepes, o fosfolípido Distearoilfosfatidilcolina (DSPC), o lipídio Colesterol (Col), o detergente Triton X-100 e a Ninidrina foram obtidos da Sigma Co. O Molibdato de Amônio e o NaCl foram obtidos da ECIBRA. O Ácido Cítrico e o Hidróxido de Sódio foram obtidos da Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Os solventes orgânicos Clorofórmio, Metanol, Etanol, o Peróxido de Hidrogênio e o Ácido Ascórbico foram obtidos da MERCK. O Ácido Sulfúrico foi obtido da Química Especializada Erich Ltda e o Monofosfato de Sódio Hidratado da Baker Analyzed Reagent. A água utilizada foi bidestilada e purificada em sistema Milli-Q da Millipore.

#### ***4.2 Metodologia***

##### ***4.2.1 Avaliação da Solubilidade dos Compostos Terapêuticos a 1 mM nos Solventes Utilizados***

A solubilidade dos compostos terapêuticos a 1 mM foi avaliada nos seguintes solventes aquosos e orgânicos: água deionizada, soluções contendo 10 mM de Hepes em pH 7,4, soluções contendo 10 mM de Hepes e 120 mM de NaCl a pH 7,4 e a pH 13, soluções

contendo 300 mM de Ácido Cítrico em pH 4,0, 1- Octanol e n-Dodecano. Tais solventes foram empregados no estudo do comportamento de partição das drogas em sistemas solvente orgânico/solução aquosa.

Para tal, pesava-se a massa de droga necessária para preparar cerca de 8,0 a 10 mL de solução de droga a 1,0 mM em cada um dos solventes mencionados. No entanto, quando não era observada uma dissolução imediata, agitava-se as amostras, à temperatura ambiente, em um banho agitador do tipo ultra-sônico por 2 a 5 minutos. Repetia-se a agitação por mais tempo e, caso a droga ainda se apresentasse insolúvel, aquecia-se em banho-maria por cerca de 3 minutos a 60 °C.

Após serem realizados estes procedimentos, aguardou-se até cerca de 12 horas para observar se havia algum tipo de precipitação. A droga era considerada solúvel quando, realizados estes testes, era obtida uma solução límpida e sem resíduos sólidos depositados.

#### ***4.2.2. Determinação dos Coeficientes de Partição dos Compostos Terapêuticos***

Os coeficientes de partição foram determinados com base nos protocolos experimentais descritos por MORAES (1996). As soluções dos compostos terapêuticos a 1 mM foram preparadas em todos os tipos de soluções aquosas utilizadas: água deionizada, solução de Ácido Cítrico a 300 mM a pH 4, solução contendo 10 mM de Hepes a pH 7,4, soluções contendo 10 mM de Hepes e 120 mM de NaCl a pH 7,4 e a pH 13.

Todas as soluções foram aquecidas a 30 °C por cerca de 10 minutos em uma incubadora modelo 624 da New Brunswick Scientific Co., Inc. A seguir, uma alíquota de 2 a 3 mL de cada uma das soluções (dependendo do volume requerido para a análise) foi misturada em um tubo de ensaio a um volume idêntico de n-Dodecano ou de 1-Octanol previamente saturado com água deionizada, pré-equilibrados a 30 °C.

Para compostos apresentando baixa solubilidade em soluções aquosas, soluções de droga preparadas nos solventes orgânicos foram empregadas para se evitar a presença de material precipitado. De maneira equivalente aos testes anteriores, misturou-se porções iguais das soluções de droga em solvente orgânico às soluções aquosas.

Após a mistura, os tubos de ensaio foram tampados e as amostras foram homogeneizadas por inversões repetidas (30 vezes). As amostras foram novamente incubadas a 30 °C por 30 minutos, em repouso. Com a finalidade de assegurar uma boa separação de fases após a incubação as amostras foram, quando necessário, centrifugadas a 4.500 rpm por 5 minutos em centrífuga Himac Cf 15D da Hitachi.

Amostras da fase aquosa ou da fase hidrofóbica foram coletadas e as concentrações de compostos terapêuticos foram determinadas na fase onde a droga apresentava maior solubilidade.

Em todas as situações, a concentração dos compostos terapêuticos na fase complementar foi estimada como sendo a diferença entre a quantidade originalmente adicionada ao sistema e a quantidade determinada na fase analisada. Calculou-se o coeficiente de partição, P, como a razão entre as concentrações do composto na fase hidrofóbica e as concentrações na fase aquosa após a incubação. Todos os ensaios experimentais foram realizados, no mínimo, em duplicata.

#### ***4.2.3 Determinação da Concentração dos Compostos Terapêuticos Livres em Solução***

A concentração das drogas foi determinada por espectrofotometria, empregando um espectrofotômetro UV-visível modelo U-2000, da Hitachi.

Primeiramente, para uma solução a 1 mM de cada droga, determinou-se o espectro de absorção das soluções de drogas preparadas conforme o procedimento mencionado no item 4.2.1, utilizando a faixa de comprimentos de onda de 200 a 500 nm.

Nos casos em que se observou a presença de picos de absorção, foi selecionado o comprimento de onda superior a 210 nm que apresentasse maior absorbância para a preparação das curvas de calibração, para que estas ficassem sujeitas a um mínimo de interferência. Estas curvas foram determinadas medindo-se a absorbância de soluções de concentrações conhecidas na faixa de 0,1 a 1,0 mM.

Para a Isoniazida, utilizou-se o comprimento de onda de 260 nm para as análises quantitativas da droga diluída nas diversas soluções aquosas. Para a Pirazinamida, as análises foram efetuadas, para cada um dos solventes aquosos, nos seguintes comprimentos de onda: água deionizada: 268 nm; Ácido Cítrico a 300 mM e pH 4,0: 260 nm; Hepes a 10 mM e pH 7,4: 260 nm; Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM e pH 7,4: 263 nm e Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM e pH 13,0: 269 nm. Tanto a solução aquosa de Rifampicina a pH 13 como em 1-Octanol apresentaram picos de absorção em comprimentos de onda próximos a 340 nm, o qual foi selecionado para a análise quantitativa desta droga em ambos os solventes. Para a Etionamida, o comprimento de onda selecionado foi de 292 nm, sendo aplicável apenas para o 1-Octanol, uma vez que esta droga não apresentou solubilidade adequada em nenhum dos outros solventes.

Como para a droga Estreptomicina não foi observado um pico de absorbância significativo na faixa de concentração analisada, optou-se por realizar uma reação colorimétrica, objetivando a obtenção de um cromóforo passível de análise por espectrofotometria, cujo procedimento está listado a seguir.

Conforme proposto por GANGADHARAM et al. (1991), a determinação de drogas contendo grupos guanidino pode ser realizada com base na reação deste grupo com Ninidrina, podendo produzir tanto um cromóforo quanto um composto fluorescente. A uma alíquota de 1,7 mL da droga nas diferentes soluções aquosas, adicionou-se 60 µL de NaOH a 0,1N e 120 µL de solução aquosa de Ninidrina a 0,25 %. As amostras foram incubadas por 10 minutos em água em ebulição. Posteriormente, resfriou-se em banho de água à temperatura ambiente e analisou-se as absorbâncias a 280 nm.



#### 4.2.4 Preparação dos Lipossomas.

A preparação dos lipossomas foi realizada pelo método de hidratação do filme seco, que produz vesículas multilamelares de diversos tamanhos, seguida pela homogeneização do tamanho das vesículas pelo método de extrusão em membranas de polycarbonato. Os lipossomas foram preparados contendo 60 mol % de Distearoilfosfatidilcolina e 40 mol % de Colesterol.

O método da hidratação do filme seco consiste na preparação das vesículas multilamelares pelo depósito de uma camada fina de lipídios nas paredes de um frasco de vidro de fundo redondo, formada pela evaporação do solvente orgânico no qual os lipídios estão dissolvidos. Após a formação do filme é adicionado excesso de fase aquosa, em constante agitação, a uma temperatura maior que a  $T_C$ , temperatura de transição gel/líquido-cristalino dos fosfolipídios, fazendo com que os lipídios se desprendam das paredes do frasco e agreguem-se em lipossomas, enquanto encapsulam parte da solução aquosa, ocorrendo assim a hidratação do filme seco.

Para a obtenção de 5 mL de suspensão de lipossomas multilamelares com concentrações finais totais de lipídios variando de 6 a 7,5 mM, inicialmente pesou-se os lipídios em balança analítica Scientech modelo SA 210.

Transferiu-se estes lipídios para um frasco de vidro de fundo redondo de capacidade igual a 50 mL, no qual adicionou-se 5 mL de uma solução Clorofórmio/Metanol (9:1 v/v), para a solubilização dos lipídios. O frasco foi levado ao evaporador rotatório Art Lab, modelo Fisatom 802, com rotação de 150 rpm, à temperatura ambiente, por aproximadamente 20 minutos e depois à temperatura de 65 °C por mais 15 minutos. Desta forma, o solvente foi evaporado, com a formação de um filme seco de lipídios nas paredes do frasco.

Na etapa seguinte, o filme seco foi hidratado com um volume de 5 mL de solução tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4 contendo ou não os compostos terapêuticos solubilizados ou com 5 mL de uma solução de Ácido Cítrico a 300 mM e pH 4 para preparar as vesículas que

foram posteriormente usadas no encapsulamento ativo. A amostra foi mantida por 30 minutos imersa em banho a 65 °C na mesma rotação de 150 rpm.

Por este procedimento foram obtidas vesículas multilamelares de vários diâmetros, sendo necessário um tratamento posterior para torná-las unilamelares e com distribuição de tamanhos homogênea.

As vesículas foram deixadas em repouso por mais 30 minutos para atingirem o equilíbrio, sendo em seguida sonicadas, por 10 minutos em banho sonicador modelo Branson 2200 da Branson Corporation. Posteriormente, as vesículas foram submetidas à extrusão através de membranas de polycarbonato Poretics, com poros de 400 nm de diâmetro.

A extrusão é baseada na dispersão forçada de vesículas multilamelares em membranas com poros de tamanho definido, envolvendo o uso de pressões relativamente elevadas e a uma temperatura maior que a de transição gel-líquido ( $T_C$ ) do lipídio. Para o fosfolipídio DSPC, a  $T_C$  é de 55 °C de acordo com o catálogo da Avanti Polar Lipids Inc. (1995), enquanto o Colesterol não apresenta transição de fases.

A extrusão foi feita em extrusora de aço inox, modelo T. 001 da Lipex Biomembranes Inc. com capacidade de 10 mL de volume, com sistema de aquecimento de camisa térmica para circulação de água. Foram utilizados um disco de drenagem e duas membranas de polycarbonato sobrepostas para a extrusão. A extrusora foi conectada a um cilindro de nitrogênio, equipado com uma válvula redutora/reguladora de pressão, mantida entre 2 a 5 Kgf/cm<sup>2</sup>.

As amostras foram extrudadas através de 15 passagens pelas membranas, à temperatura de 65 °C, sendo que, para cada nova passagem, a amostra permanecia em repouso na extrusora por no mínimo 3,5 minutos para que se atingisse o equilíbrio térmico (RIBAS, 1997). Após o preparo, os lipossomas foram estocados em geladeira à 5 °C.

#### ***4.2.5 Encapsulamento Passivo das Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina e Etionamida***

A incorporação passiva dos compostos terapêuticos nos lipossomas foi realizada durante a etapa de hidratação do filme lipídico seco, utilizando-se isoladamente soluções aquosas das drogas Isoniazida e Pirazinamida a várias concentrações dissolvidas em tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. Como as drogas Rifampicina e Etionamida apresentavam baixa solubilidade quando suspensas no tampão mencionado, realizou-se a solubilização destes compostos terapêuticos dissolvendo-se inicialmente os mesmos na mistura de solventes orgânicos Clorofórmio/Metanol (9:1 v/v) conjuntamente com os lipídios, e depois de evaporados os solventes, a hidratação do filme lipídico seco foi feita utilizando-se tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4.

#### ***4.2.6 Encapsulamento Ativo das Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina.***

Anteriormente à etapa de incorporação ativa dos compostos terapêuticos Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina nos lipossomas, estabeleceu-se um gradiente de pH nas vesículas lipídicas para que o encapsulamento das drogas pudesse ser efetuado. O gradiente de pH entre as regiões interna e externa aos lipossomas foi estabelecido pela passagem das vesículas preparadas pelo método de hidratação do filme seco, originalmente suspensas na solução de Ácido Cítrico 300 mM a pH 4, através de uma coluna cromatográfica empacotada com gel de Sephadex G-50, de 2,5 cm de diâmetro e volume de leito igual a 50 mL obtida da SIGMA. A coluna foi previamente equilibrada com solução tampão contendo 10 mM de Hepes a pH 7,4. A mesma solução tampão foi utilizada para a eluição dos lipossomas na coluna.

Por este procedimento, estabeleceu-se um gradiente de pH da suspensão de lipossomas de aproximadamente 3,4 unidades. O pH do meio aquoso externo (pH=7,4) foi verificado e ajustado, se necessário. Estabelecido este gradiente de pH, as vesículas obtidas foram usadas em até 72 horas.

Para a incorporação ativa dos compostos terapêuticos, a suspensão de vesículas foi convenientemente diluída e misturada com as soluções contendo a droga que se desejava encapsular solubilizada na mesma solução tampão empregada para suspender os lipossomas (pH igual a 7,4), na proporção molar droga/lipídio de 0,2:1.

No caso das drogas Rifampicina e Etionamida serem pouco solúveis no tampão usado, realizou-se uma etapa prévia de recristalização destas drogas, dissolvendo-se as mesmas em Clorofórmio/Metanol (9:1 v/v) e evaporando-se os solventes em evaporador rotatório à temperatura ambiente até que um filme seco das drogas fosse obtido. Ao filme seco das drogas adicionou-se o tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4 e a solução resultante contendo a droga solúvel foi incubada com a suspensão de vesículas nas mesmas condições e proporções molares das outras drogas.

As misturas lipossomas/compostos terapêuticos foram incubadas em uma incubadora modelo 624 da New Brunswick Scientific Co. Inc., a 60 °C por um tempo de 10 minutos. As incubações foram realizadas em frascos erlenmeyer a 200 rpm.

Após a incubação, as amostras de lipossomas foram resfriadas em banho de água à temperatura ambiente e submetidas ao processo de remoção do composto terapêutico não encapsulado.

#### ***4.2.7 Remoção da Droga não Encapsulada em Lipossomas***

Após o encapsulamento das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina nos lipossomas por ambos os métodos descritos, efetuou-se a separação da

droga livre da droga incorporada nas vesículas por duas metodologias distintas, cromatografia de permeação em gel e diálise.

Ambas as metodologias, descritas a seguir, baseiam-se na diferença de tamanho dos materiais a se separar (HARRIS e ANGAL, 1989).

#### ***4.2.7.1 Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel***

Nos ensaios feitos por cromatografia de permeação em gel, utilizou-se uma coluna de dessalinização tipo PD-10 da PHARMACIA, pré-empacotada, com um volume aproximado de 8,5 mL de gel de Sephadex G-25 (com uma altura de 5 cm) e uma capacidade de volume de amostra de até 2,5 mL, ou uma coluna cromatográfica empacotada com gel de Sephadex G-50 e volume de leito igual a 50 mL e diâmetro de 2,5 cm, obtida da SIGMA. No primeiro tipo de coluna, as amostras com massa molecular acima da massa molecular de exclusão do gel ( $1.10^3$  a  $5.10^3$  kDa) deveriam ser completamente eluídas a partir dos 2,5 mL iniciais até o volume de 6 mL, enquanto que as moléculas de massa molecular abaixo deste valor penetrariam nos poros do gel, sendo retardadas e somente eludiriam a partir dos 6 mL. No caso da segunda coluna, a massa molecular de exclusão do gel é de 1,5 a 30 kDa.

As colunas foram inicialmente pré-equilibradas pela passagem de 30 mL de tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de amostra, após o que adicionou-se 32 mL do mesmo tampão para a eluição do material a se separar.

Durante a separação a coluna cromatográfica foi conectada a um coletor de frações modelo Bio-Rad 2110, onde coletou-se alíquotas de 40 a 50 gotas (aproximadamente 1,5 mL por fração) que foram posteriormente analisadas para a determinação da concentração de lipídios e de composto terapêutico.

#### 4.2.7.2 Remoção por Diálise

A separação por diálise é usada para remover excesso de solutos indesejáveis de baixos pesos moleculares, simultaneamente introduzindo um novo tampão na solução.

Nestes ensaios utilizou-se membranas de diálise Inlab (tipo envelope), com diâmetro de corte de 10 kDa, com medidas de 25 mm x 16 mm, as quais foram cortadas em duas, obtendo-se novos envelopes com medidas de aproximadamente 12,5 mm x 8 mm.

As membranas foram colocadas em água fervente por 30 minutos. Após o término da hidratação, as membranas tiveram uma de suas extremidades fechadas. Adicionou-se 2,5 mL de amostra e fechou-se o outro extremo do envelope, que foi então submerso em 100 mL de solução tampão Hepes fresca. Foram feitas quatro trocas da solução tampão (total de 400 mL) no intervalo total de 40 horas, sendo que o sistema foi mantido em geladeira a 5 °C. Ao final do processo de remoção da droga não encapsulada, as amostras foram coletadas e analisadas para a determinação das concentrações finais de lipídios e de material encapsulado nas vesículas.

#### 4.2.8 Caracterização dos Lipossomas

Após a remoção do composto terapêutico não encapsulado nas vesículas, as frações coletadas ricas em lipossomas foram combinadas e os lipossomas obtidos foram caracterizados quanto às concentrações finais de lipídios, às concentrações finais de composto terapêutico encapsulado, ao diâmetro médio das vesículas, à estabilidade de estocagem durante 3 semanas em geladeira a 5 °C e à estabilidade das vesículas na frente do tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>.

#### 4.2.8.1 Determinação da Concentração de Lipídios

A determinação da concentração de lipídios foi feita por dois métodos distintos: medida direta de absorbância a 300 nm e pela análise quantitativa de íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) em solução. Nestes ensaios, usou-se o espectrofotômetro modelo Hitachi U - 2001.

O fosfolipídio (DSPC), utilizado na preparação dos lipossomas possui apenas um átomo de fósforo por molécula, permitindo a determinação do teor de fosfolipídios pela quantidade de fosfato. O ensaio baseia-se no método de CHEN Jr et al. (1956), no qual primeiramente ocorre a oxidação com ácido sulfúrico das cadeias de ácido graxo a carbono elementar, que é transformado em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) livre de fosfato. O fósforo é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com o molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra.

O mesmo procedimento foi também realizado para as soluções de padrões orgânicos e inorgânicos, com concentrações conhecidas de fosfolipídio e de fosfato respectivamente, e para uma solução isenta de fosfato (branco). Em nosso caso foram usados os compostos Distearoilfosfatidilcolina (orgânico), o Monofosfato de Sódio Hidratado (inorgânico) e o tampão Hepes (10 mM) a pH 7,4.

Os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução em cada tubo (amostras, padrões e branco) conjuntamente com 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido sulfúrico a 10 N. Adicionou-se duas esferas de vidro em cada tubo para melhorar a distribuição de calor durante o aquecimento. Os tubos foram colocados em suporte metálico e aquecidos em placa térmica pré-aquecida à 200 °C por 30 minutos. Retirou-se os tubos do aquecimento e após estes atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  isenta de fosfato, em cada um dos tubos. Em seguida, as amostras foram aquecidas novamente à 200 °C por mais 30 minutos. A placa de aquecimento foi posicionada no interior de uma capela pois nesta etapa há a formação de dióxido de carbono, que deve ser retirado pelo

exaustor. Após o segundo aquecimento, os tubos foram retirados e, ao atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 4 mL de tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. Em seguida, 500 µL de uma solução molibdato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O) a 2,5 % (m/v) e 500 µL de uma solução de ácido ascórbico (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) a 10 % (m/v) diluídos em tampão foram adicionados. Os tubos foram aquecidos em água fervente por 7 minutos, em seguida foram resfriados, após o que se determinou a absorbância a 830 nm.

A partir dos padrões utilizados foi obtida uma curva de calibração para a determinação da concentração de fosfolipídios da amostra. Neste caso, determinou-se somente a concentração correspondente ao fosfolipídio DSPC, que representaria 60 % da concentração total de fosfolipídios. Para se levar em conta a presença do Colesterol, dividiu-se os valores obtidos por 0,6.

Convém ressaltar que a solução-mãe do fosfolipídio padrão foi previamente sonicada por 30 minutos para que o lipídio estivesse eficientemente disperso. Toda a vidraria foi lavada com detergente livre de fosfato para evitar interferências nas análises. Os ensaios foram realizados em duplicata, em tubos Pirex ou Kimex de parede grossa.

Para cada ensaio obteve-se uma curva de calibração, com a finalidade de minimizar os erros relacionados a diferenças na digestão das amostras.

#### ***4.2.8.2 Determinação da Concentração de Composto Terapêutico Encapsulado***

Após a remoção do composto não encapsulado analisou-se a concentração de droga remanescente nas amostras.

A determinação foi feita pela avaliação da absorbância após o rompimento das vesículas com Etanol ou com Metanol (no caso específico da droga Estreptomicina). Em todos os casos as soluções obtidas após o rompimento das vesículas eram suficientemente claras para se fazer determinações espectrofotométricas diretas.



No método com Etanol, foi adicionado um volume de 150 µL dos lipossomas encapsulando a droga a 1350 µL de Etanol. Foram determinadas as absorbâncias a 300 nm das amostras de lipossomas livres, das drogas livre e dos lipossomas encapsulando a droga nos comprimentos de onda selecionado para cada droga. Para as drogas Isoniazida e Pirazinamida, 260 nm; para a droga Rifampicina, 240 nm; para a droga Etionamida, 300 nm e 280 nm para a Estreptomicina. Cada determinação foi feita pelo menos em duplicada.

Como a Estreptomicina apresentava baixa absorção de luz tanto no espectro ultra-violeta como no visível, fez-se sua determinação através da reação com Ninidrina, após o rompimento das vesículas com Metanol, em uma proporção de 10:1 (v/v) de Metanol/amostra, conforme descrito no item 4.2.2.1.

Em todos os ensaios, preparou-se curvas de calibração para a droga livre e para os lipossomas não encapsulando a droga, para se avaliar o efeito de sua presença isolada na absorbância. Quando necessário, as absorbâncias das drogas foram corrigidas para levar em conta alterações resultantes de sua exposição à temperatura de 65 °C por 10 ou 30 minutos. Cada determinação foi feita pelo menos em duplicata.

De posse dos dados de concentração de lipídios e de compostos terapêuticos de uma amostra, avaliou-se a eficiência de encapsulamento, determinada como a relação percentual entre a razão molar droga/lipídio final e a inicial, de acordo com a equação 3:

$$E = 100 * \left( \frac{(\text{moles Droga/moles Lipídio})_{\text{final}}}{(\text{moles Droga/moles Lipídio})_{\text{inicial}}} \right) \quad (3)$$

O número de moléculas de composto terapêutico encapsulado por vesícula foi estimado a partir do diâmetro médio final das vesículas e das concentrações finais de lipídio e de composto terapêutico encapsulado. A área da seção transversal de moléculas isoladas de fosfatidilcolina e, Colesterol foram consideradas como 71 Å<sup>2</sup> e 19 Å<sup>2</sup>, respectivamente

(ISRAELACHVILI e MITCHEL, 1975). Assim, área média por molécula de lipídio para vesículas compostas por DSPC/Col (60:40 mol%) é de 50,2 Å<sup>2</sup>.

Considerando-se que aproximadamente 60 % das moléculas de lipídio que compõem um lipossoma unilamelar estão localizadas na parte externa da bicamada lipídica (POWERS et al., 1990), calculou-se o número de moléculas de lipídio por lipossoma de um determinado diâmetro, o volume correspondente de solução aquosa capturada e o número de moléculas de composto terapêutico encapsuladas por lipossoma.

#### 4.2.8.3 Determinação do Diâmetro Médio das Vesículas

O tamanho médio das vesículas foi determinado medindo-se os raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz de comprimento de onda determinado (633 nm) obtida por incidência de raios laser (“quasi elastic light scattering”, QLS). Por este método são feitas medidas das flutuações da intensidade do espalhamento de luz com o tempo para a determinação do coeficiente de difusão da partícula em solução diluída (FORD, 1985).

Para partículas esféricas em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio,  $R_h$ , pode ser determinado pela relação de Stokes-Einstein, segundo a equação 4:

$$R_h = \frac{k T}{6\pi D \mu} \quad (4)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta,  $D$  o coeficiente de difusão médio da vesícula e  $\mu$  a viscosidade do solvente.

#### 4.2.8.4 Avaliação da Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas

A estabilidade de estocagem das vesículas preparadas contendo o composto terapêutico encapsulado é muito importante do ponto de vista farmacológico. Esta estabilidade pode ser afetada por fatores físicos ou químicos. A instabilidade física é associada à liberação indesejada da droga e a instabilidade química à degradação da droga ou dos lipídios.

Lipossomas estocados a 5 °C na forma de suspensão aquosa tiveram suas estabilidades avaliadas semanalmente durante três semanas pela capacidade de retenção da droga encapsulada e pela formação de agregados (indicando alterações estruturais). A cada semana foi removido o material livre de uma amostra dos lipossomas estocados e determinou-se a razão molar droga/lipídio, pela determinações das respectivas concentrações de compostos terapêuticos e lipídios. O diâmetro médio das vesículas obtidas foi também monitorado neste período.

#### 4.2.8.5 Avaliação da Estabilidade das Vesículas em Soluções do Tensoativo Não-Iônico $C_{12}E_5$

A avaliação da estabilidade das vesículas lipídicas em soluções de  $C_{12}E_5$  foi realizada após três semanas de estocagem, através da adição da vesículas a soluções tampão com diferentes concentrações do tensoativo, em placas de microtitulação do tipo Elisa, de poliestireno com 96 poços de fundo redondo da Corning Incorporation, de acordo com o método descrito por STEFFEN, 1993.

Este método fundamenta-se no fato de que as soluções mudam de transparentes a turvas à medida em que as vesículas interagem com o tensoativo e entre si, o que resulta na variação das formas e tamanhos originais, decorrentes do crescimento, fusão e desestruturação das vesículas lipídicas em micelas.

O estado de dispersão das vesículas foi monitorado pela variação da absorbância das amostras resultantes duas horas após a ação do tensoativo, no comprimento de onda de 340 nm em uma leitora de placas modelo EIX 808 da Bio-Tek Instruments, Inc.

As soluções estoque do tensoativo não-iônico foram preparadas em concentrações entre 3 a 100 mol %. A porcentagem de tensoativo nas soluções foi definida com base nos números de moles de tensoativo e de lipídios presentes na amostra, de acordo com a equação 5:

$$\% C_{12}E_5 = 100 * \text{moles } C_{12}E_5 / (\text{moles } C_{12}E_5 + \text{moles lipídios}) \quad (5)$$

O volume total de amostra foi mantido em 200  $\mu\text{L}$ , constando de 120  $\mu\text{L}$  de solução de tensoativo às concentrações entre 3 a 100 mol % e de 80  $\mu\text{L}$  de suspensão de lipossomas à concentração de 2,5 mM em lipídios. Cada teste foi realizado em triplicata e, como referência, utilizou-se soluções contendo apenas tensoativo e solução tampão. As absorbâncias das amostras de referências foram subtraídas da média das absorbâncias globais das amostras contendo as vesículas.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados referentes à caracterização preliminar das drogas e à preparação e caracterização de lipossomas encapsulando Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina por incorporação passiva e ativa.

#### *5.1 Caracterização Preliminar das Drogas*

##### *5.1.1 Comportamento dos Compostos Terapêuticos quanto à Solubilidade*

Para a realização dos ensaios de coeficientes de partição das drogas em solventes orgânicos/soluções aquosa, a obtenção de soluções verdadeiras dos compostos terapêuticos foi requerida. Os resultados da avaliação da solubilidade das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina a 1 mM em todos nos solventes aquosos e orgânicos água deionizada, soluções contendo 10 mM de Hepes em pH 7,4, soluções contendo 10 mM de Hepes e 120 mM de NaCl a pH 7,4 e a pH 13, soluções contendo 300 mM de Ácido Cítrico em pH 4,0, 1- Octanol e n-Dodecano podem ser avaliados nas Tabelas 4 e 5.

A Isoniazida e a Pirazinamida apresentaram-se solúveis apenas nos solventes aquosos, concordando com os dados encontrados na literatura (MERCK INDEX, 1996).

A Rifampicina e a Etionamida apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que a maior solubilidade foi observada em 1-Octanol, o solvente orgânico com maior caráter hidrofílico. A Rifampicina foi também solúvel a pH 13, possivelmente devido à sua distribuição de cargas, pois neste pH as moléculas de droga devem ter carga

predominantemente negativa. Este composto é zwitteriônico, apresentando um pKa de 1,7 para o grupo 4-hidroxila e um pKa de 7,9 para o nitrogênio do grupo 3-piperazina, o que certamente contribui para o aumento de sua solubilidade (MERCK INDEX, 1996).

Tabela 4 - Solubilização das drogas de primeiro tratamento da Tuberculose analisadas no trabalho (concentração de droga igual a 1mM) nos diversos solventes empregados.

Solvente	Isoniazida	Pirazinamida	Rifampicina
Água deionizada	+	+	-
Ácido Cítrico a 300 mM, pH 4,0	+	+	-
Hepes a 10 mM e pH 7,4	+	+	-
Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM, pH 7,4	+	+	-
Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM, pH 13,0	+	+	+
1-Octanol	-	-	+
n-Dodecano	-	-	-

+ : solúvel    - : insolúvel

Tabela 5 - Solubilização das drogas de segundo tratamento da Tuberculose analisadas no trabalho (concentração de droga igual a 1mM) nos diversos solventes empregados.

Solvente	Etionamida	Estreptomicina
Água deionizada	-	+
Ácido Cítrico a 300 mM, pH 4,0	-	+
Hepes a 10 mM e pH 7,4	-	+
Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM, pH 7,4	-	+
Hepes a 10 mM, NaCl a 120 mM, pH 13,0	-	+
1-Octanol	+	+
n-Dodecano	-	-

+ : solúvel    - : insolúvel

A Estreptomicina, também em concordância com a literatura (MERCK INDEX, 1996), mostrou-se bastante solúvel em água, o mesmo podendo ser aplicado aos outros solventes aquosos e ao 1-Octanol. No entanto, no solvente orgânico com maior caráter hidrofóbico, o n-Dodecano, esta droga não se solubilizou, o que se deve, provavelmente, ao fato de que este solvente não possibilita a formação de pontes de hidrogênio, como é o caso do 1-Octanol.

### 5.1.2 Comportamento dos Compostos Terapêuticos quanto à Partição nos Sistemas Testados

Uma das aplicações mais relevantes dos coeficientes de partição relaciona-se à absorção de compostos terapêuticos *in vivo*. Neste caso, a partição de um composto entre uma fase aquosa e uma fase orgânica pode ser empregada como um sistema modelo para o estudo da migração de uma droga através de membranas biológicas. E, como os lipossomas são comumente utilizados como modelos de membranas biológicas, por serem constituídos basicamente de fosfolipídios, a medida do coeficiente de partição em sistemas contendo uma fase aquosa e uma fase orgânica pode ser relacionada à absorção da droga por uma célula. A medida destes coeficientes é também útil no esclarecimento de aspectos específicos sobre o encapsulamento e a retenção de compostos terapêuticos em lipossomas destinados à liberação controlada de medicamentos.

As soluções aquosas usadas: água deionizada, solução de Ácido Cítrico a 300 mM a pH 4,0, soluções contendo 10 mM Hepes a pH 7,4, soluções contendo 10 mM Hepes e 120 mM NaCl a pH 7,4 e a pH 13,0 representam os ambientes interno e externo aos lipossomas. Na incorporação passiva, soluções aquosas a pH 7,4 contendo apenas 10 mM Hepes a pH 7,4 ou contendo 10 mM Hepes e 120 mM NaCl poderiam ser utilizadas simultaneamente para suspender o composto terapêutico e hidratar as vesículas. Na incorporação ativa, o interior da vesícula poderia estar preenchido por uma solução aquosa de Ácido Cítrico a 300 mM a pH

4,0, enquanto a região aquosa externa poderia conter 10 mM Hepes a pH 7,4 ou ainda 10 mM Hepes e 120 mM NaCl, também a pH 7,4. A solução a pH 13 simularia uma situação onde o pH externo às vesículas apresentasse elevada basicidade.

As Figuras 6 a 10 ilustram os resultados obtidos na medida dos coeficientes de partição das drogas analisadas nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano. Os coeficientes de partição aparentes (P) foram calculados como a razão entre as concentrações do composto terapêutico na fase hidrofóbica e na fase aquosa ao final do experimento, não se levando em conta a droga possivelmente acumulada nas interfaces do sistema.

Baixos valores deste coeficiente (menores que um) indicam acúmulo da droga na fase aquosa, enquanto valores maiores que um implicam em maior acúmulo nos solventes orgânicos.

Diferenças significativas entre os valores dos coeficientes de partição em sistemas contendo distintos solventes aquosos indicariam maior probabilidade de incorporação da droga nos lipossomas através do uso de gradientes de pH. O encapsulamento ativo seria favorecido se a droga apresentasse um coeficiente de partição reduzido em água deionizada e elevado nas soluções aquosas de Ácido Cítrico com pH 4 e com pH em torno de 7,4 de acordo com o comportamento observado na incorporação do composto o-carboranilpropilamina em lipossomas (MORAES, 1996).

Além disto, o solvente aquoso onde se observar menor coeficiente de partição seria o indicado para solubilizar a droga quando de seu encapsulamento passivo, pois permitiria maior retenção da droga encapsulada no cerne aquoso da vesícula.

Para a Isoniazida, a natureza da solução aquosa não apresentou um efeito significativo no coeficiente de partição aparente do composto, com um pequeno efeito só no caso da variação na natureza do solvente orgânico utilizado (Figura 6).

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que para o caso do sistema 1-Octanol/soluções aquosas, praticamente toda a Isoniazida acumulou-se na fase aquosa, resultando em valores muito baixos de coeficientes de partição aparentes. Para o sistema n-Dodecano/soluções aquosas, os resultados mostram que toda a droga se acumula na fase aquosa, resultando em



valores nulos de coeficientes de partição aparente para praticamente todas as soluções aquosas.

O coeficiente de partição reduzido desta droga na fase orgânica indica que provavelmente haverá um baixo acúmulo de Isoniazida nos lipossomas pelo uso da técnica de incorporação ativa. No entanto, a incorporação passiva poderia apresentar bons resultados quanto à retenção do composto nos lipossomas durante a estocagem, devido aos baixos coeficientes de partição na fase orgânica e à elevada solubilidade da droga nas soluções aquosas.

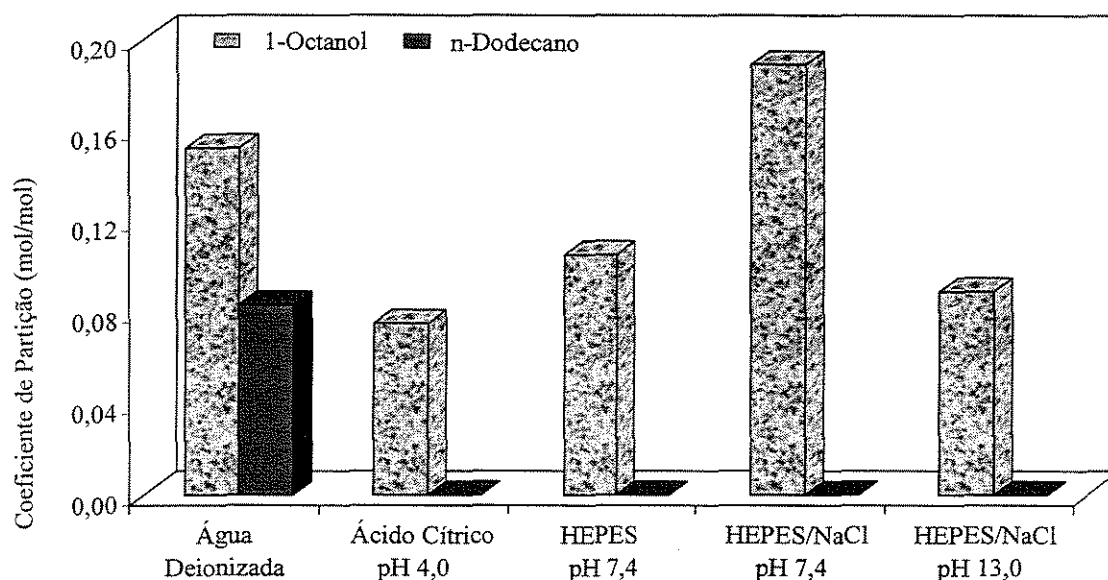


Figura 6 - Coeficientes de partição de Isoniazida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.

Para a Pirazinamida (Figura 7), nos diferentes sistemas n-Dodecano/soluções aquosas, o acúmulo ocorre quase que exclusivamente nas fases aquosas, confirmando o caráter predominantemente hidrofílico relatado na literatura (MERCK INDEX, 1996).

Este comportamento acarretou valores reduzidos de coeficientes de partição, embora em geral mais elevados que os obtidos para a Isoniazida.

Os coeficientes de partição da Pirazinamida nos diferentes sistemas 1-Octanol/soluções aquosas não foram significativamente influenciados pela natureza das soluções aquosas, resultando em valores relativamente pequenos de coeficiente de partição aparentes da droga. Estes valores, no entanto, são significativamente maiores que os observados para os sistemas contendo n-Dodecano, provavelmente devido ao caráter mais polar do 1-Octanol.

Para esta droga, o encapsulamento passivo no cerne aquoso da vesícula possivelmente seria o mais indicado, tanto por sua elevada solubilidade quanto por seu acúmulo preferencial na fase aquosa, o que permitiria a estocagem das vesículas por longo período em boas condições de retenção do composto terapêutico.

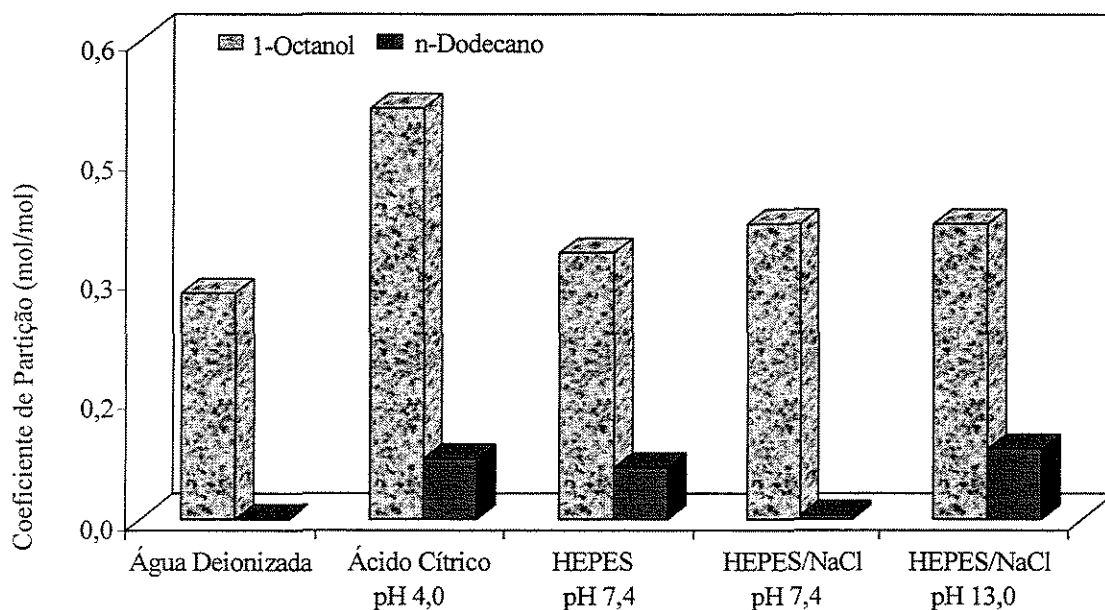


Figura 7 - Coeficientes de partição de Pirazinamida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.

De acordo com a Figura 8, para a Rifampicina em sistemas 1-Octanol/soluções aquosas, a natureza das soluções aquosas apresentou efeitos significativos nos coeficientes de partição aparentes do composto. Os resultados indicam maior acúmulo na fase orgânica em comparação às fases aquosas utilizadas, o que era esperado, uma vez que a droga apresenta concentração inferior a 1 mM em todos os solventes aquosos empregados, exceto na solução a pH 13,0.

Para o sistema n-Dodecano/soluções aquosas, somente foi possível a análise do sistema formado com a solução Hepes/NaCl a pH 13, devido às características de não solubilidade da Rifampicina nas outras soluções aquosas. Neste sistema foi obtido um coeficiente de partição nulo, o que permite concluir que, neste caso, toda a droga acumulou-se na fase aquosa.

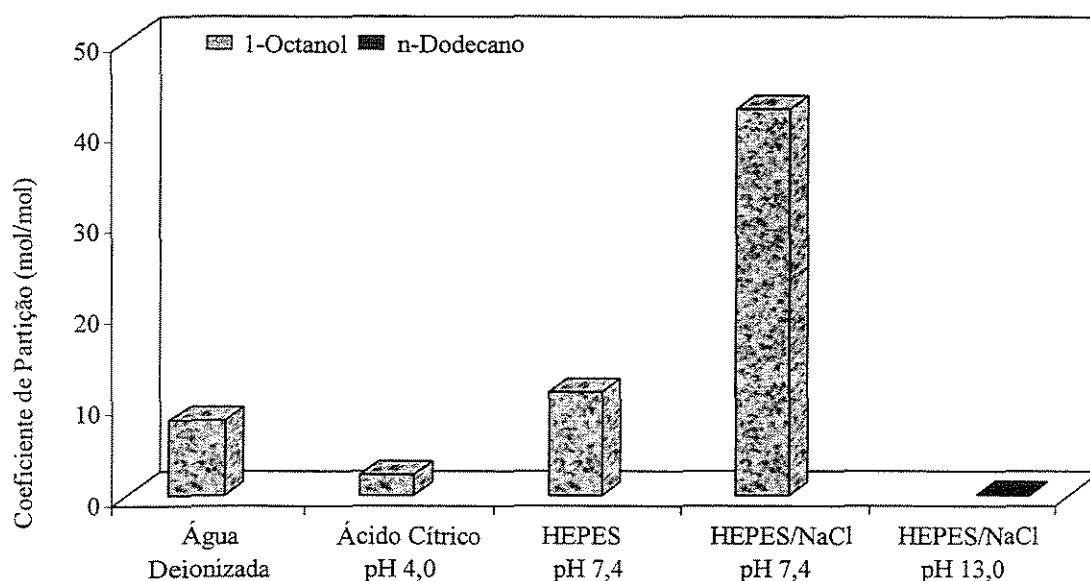


Figura 8 - Coeficientes de partição de Rifampicina nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.

Uma vez que o encapsulamento de soluções desta droga a pH 13 não seria indicado por comprometer a estabilidade química das vesículas lipídicas (hidrólise básica), o procedimento mais indicado para a incorporação da Rifampicina em lipossomas seria o encapsulamento passivo na bicamada lipídica. A incorporação seria realizada durante a etapa de solubilização dos lipídios formadores das vesículas em solventes orgânicos como Clorofórmio e Metanol, onde esta droga apresenta-se solúvel.

Para a Etionamida em sistemas 1-Octanol/soluções aquosas, pode-se observar que a natureza das soluções aquosas apresentou efeitos significativos nos coeficientes de partição aparentes do composto (Figura 9). Observa-se grande tendência de acúmulo da droga na fase orgânica.

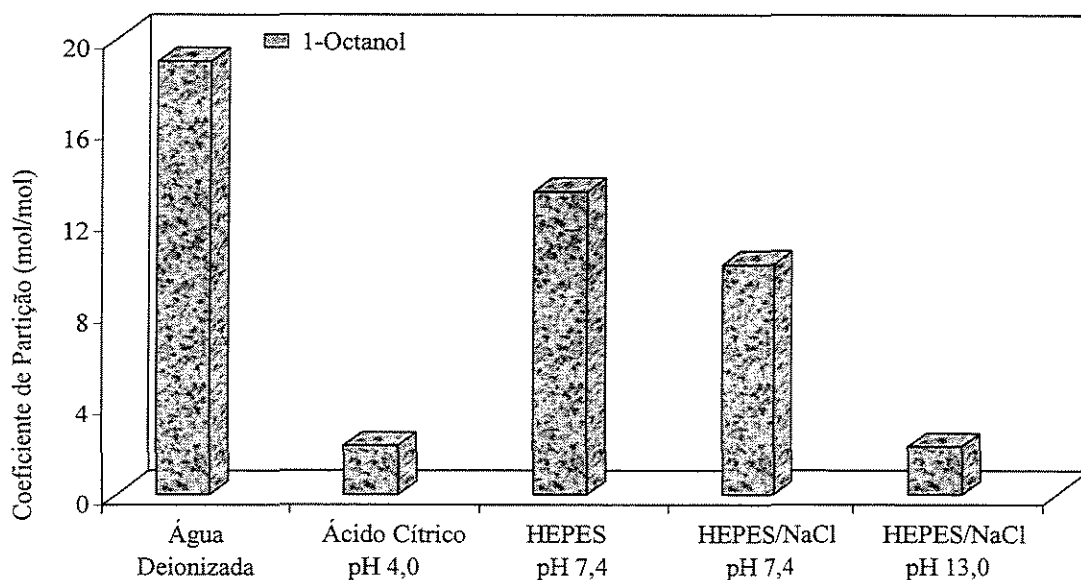


Figura 9 - Coeficientes de partição de Etionamida nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol.

Os resultados obtidos para a Etionamida no sistema 1-Octanol/Hepes-NaCl a pH 13,0 indicam um menor coeficiente de partição quando comparado com os outros sistemas aquosos.

Nesta situação, provavelmente o caráter básico do meio foi suficiente para garantir maior solubilização da droga na fase aquosa. No sistema 1-Octanol/Ácido Cítrico a pH 4,0, o baixo coeficiente de partição deve-se possivelmente ao fato de que o meio prótico confere à molécula de droga caráter polar suficiente para sua solubilização no solvente aquoso.

Desta forma, a Etionamida poderia ser possivelmente encapsulada em lipossomas durante a homogeneização dos lipídios, sendo incorporada preferencialmente na membrana lipídica. Para o sistema n-Dodecano/soluções aquosas, não foi possível a análise devido às características de não solubilidade da droga tanto no n-Dodecano, como nas soluções aquosas.

Para a Estreptomicina (Figura 10), a natureza dos solventes utilizados não mostrou efeitos significativos em seus coeficientes de partição. Em praticamente todas as situações, a droga apresentou maior acúmulo nas fases aquosas. Em água deionizada, notou-se menor acúmulo da droga que nas outras soluções aquosas, possivelmente devido ao fato de que a droga apenas se acumularia na fase orgânica quando não associada aos íons contidos nas fases aquosas diferentes da água deionizada. As análises para os sistemas contendo Ácido Cítrico não foram efetuadas por não se dispor de metodologia adequada para a determinação da droga nesta solução.

Assim, por sua tendência pronunciada de acúmulo na fase aquosa, a Estreptomicina provavelmente seria melhor incorporada e retida em lipossomas pelo encapsulamento passivo, durante a hidratação do filme lipídico, devido aos valores de coeficientes de partição aparente nulos e à elevada solubilidade da droga nas soluções aquosas. Entretanto, este procedimento poderia levar a baixas eficiências de encapsulamento devido à elevada massa molecular da droga.

De posse dos dados de coeficientes de partição e de sua análise, pode-se propor os tipos mais prováveis de interações que serão observados quando do encapsulamento destes compostos terapêuticos em lipossomas, de acordo com a classificação sugerida por BARENHOLZ e CROMMELIN (1994). Segundo estes autores, os compostos terapêuticos podem ser classificados em três categorias, de acordo com seu tipo de interação com a bicamada lipídica.

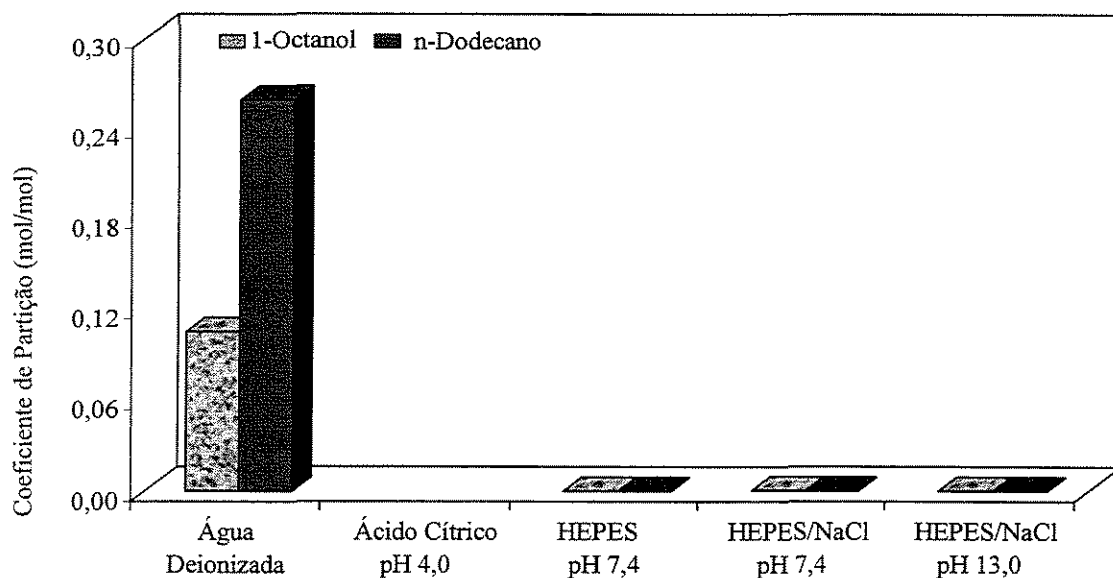


Figura 10 - Coeficientes de partição de Estreptomicina nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-Octanol ou n-Dodecano.

O primeiro grupo compreende compostos hidrofílicos solúveis em água com coeficientes de partição Óleo/Água e Octanol/Água praticamente nulos. Neste trabalho, como óleo, utilizou-se o n-Dodecano. Os coeficientes de partição Óleo/Água, neste caso, relacionam-se às interações que poderiam ocorrer entre o composto terapêutico e as porções das cadeias lipídicas hidrofóbicas localizadas na região central da bicamada lipídica. Os compostos pertencentes a esta classe não interagem com a bicamada, e a eficiência de seu encapsulamento está diretamente relacionada ao volume de solução aquosa capaz de ser retido no cerne da vesícula. Neste grupo pode-se incluir as drogas Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina.

O segundo grupo está relacionado a compostos com baixos coeficientes de partição Óleo/Água. Entretanto, seus coeficientes de partição Octanol/Água podem variar consideravelmente.

Neste caso, os coeficientes de partição bicamada lipídica/meio aquoso não estão diretamente relacionados aos coeficientes de partição Óleo/Água e Octanol/Água devido ao espaço limitado disponível no interior da bicamada e à maior restrição de movimentação dos componentes da bicamada em comparação com sistemas contendo apenas Óleo ou Octanol. Os coeficientes de partição dos compostos pertencentes a este grupo dependem do pH e da força iônica do meio onde se encontram. Os agentes terapêuticos Rifampicina e Etionamida apresentam características pertencentes a esta categoria, apresentando reduzida ou nenhuma solubilidade em n-Dodecano.

Finalmente, o terceiro grupo inclui compostos com elevados coeficientes de partição Óleo/Água e Octanol/Água. Alguns destes compostos podem ser solubilizados pelos componentes da bicamada lipídica, entretanto, a afinidade de alguns dos elementos deste grupo por bicamadas lipídicas pode ser limitada por restrições estéricas. Dos compostos terapêuticos testados, nenhum se inclui nesta categoria.

Ao comparar os dados das literaturas (FLOREY, 1976, 1977, 1978; MERCK INDEX, 1996) apresentados no item 3.2 com os obtidos neste trabalho, pode-se notar que para a droga Isoniazida, os dados da literatura indicam um comportamento hidrofílico predominante, o que foi confirmado nos testes com coeficientes de partição. Da mesma forma, os testes com a droga Estreptomicina mostraram também seu caráter predominantemente hidrofílico, como indica a literatura.

Para a droga Pirazinamida, o caráter misto hidrofílico e hidrofóbico relatado na literatura diferiu dos dados de coeficiente de partição obtidos experimentalmente, observando-se que esta droga apresentou características predominantemente hidrofílicas.

Para a droga Rifampicina, a literatura indica um caráter misto hidrofóbico e hidrofílico que foi demonstrado também com os testes de coeficientes de partição, embora nas condições testadas esta droga tenha se mostrado predominantemente hidrofóbica.

A droga Etionamida, que é apresentada na literatura como predominantemente hidrofóbica, mostrou-se com um comportamento misto hidrofílico e hidrofóbico.

Assim, com base nos resultados obtidos, supõe-se que as técnicas que mais se adequarão para o encapsulamento das drogas estudadas em lipossomas irão diferir de composto para composto, conforme mencionado na Tabela 6.

Quando comparadas as possíveis técnicas de encapsulamento dos compostos terapêuticos com base nos resultados obtidos dos coeficientes de partição com as possíveis técnicas de encapsulamento advindas da revisão da literatura, pode-se notar que nos casos dos compostos terapêuticos Isoniazida e Estreptomicina confirmou-se que a técnica de incorporação passiva das drogas nas vesículas durante a hidratação do filme lipídico seco poderia apresentar os melhores resultados quanto ao encapsulamento e à retenção dos compostos nos lipossomas.

Tabela 6 - Possíveis técnicas de encapsulamento das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina, com base nos resultados obtidos dos coeficientes de partição das drogas.

<b>Droga</b>	<b>Possível técnica de encapsulamento em lipossomas</b>
Isoniazida	Incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico.
Pirazinamida	Incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico.
Rifampicina	Incorporação passiva combinada no cerne aquoso e na bicamada lipídica simultaneamente ou incorporação passiva apenas durante a hidratação do filme lipídico.
Etionamida	Incorporação passiva combinada no cerne aquoso e na bicamada lipídica simultaneamente ou incorporação passiva apenas durante a hidratação do filme lipídico.
Estreptomicina	Incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico.

Para o composto terapêutico Pirazinamida foi reportada uma incorporação passiva combinada no cerne aquoso e na bicamada lipídica dos lipossomas ou incorporação passiva apenas durante a hidratação do filme lipídico seco, o qual diferiu da possível técnica de



encapsulamento passivo durante a hidratação do filme lipídico por apresentar esta droga um caráter predominantemente hidrofílico.

No caso da droga Rifampicina, confirmou-se que as possíveis técnicas de encapsulamento nas vesículas lipídicas seriam a incorporação passiva combinada no cerne aquoso e na bicamada lipídica ou a incorporação passiva apenas durante a hidratação do filme lipídico, com base nos resultados obtidos dos coeficientes de partição do composto terapêutico.

Para o composto terapêutico Etionamida, seria possível utilizar o encapsulamento passivo durante a etapa de hidratação do filme lipídico. Conforme os coeficientes de partição da droga, esta poderia também ser incorporada no cerne aquoso e na bicamada lipídica dos lipossomas.

No entanto, o encapsulamento passivo durante a hidratação do filme lipídico com soluções aquosas de Rifampicina e Etionamida poderia resultar em baixas concentrações finais dos compostos terapêuticos nas amostras, devido à reduzida solubilidade das mesmas em soluções aquosas.

Para maior aproximação às condições fisiológicas, as soluções tampão contendo Hepes seriam as mais adequadas, principalmente devido ao pH de 7,4. E, como em praticamente todas as situações, exceto para a droga Etionamida, observou-se menor partição das drogas em soluções contendo 10 mM Hepes a pH 7,4 que nas compostas por 20 mM Hepes e 120 mM NaCl a pH 7,4, a primeira solução seria de uso mais adequado para a solubilização das drogas para o encapsulamento passivo. Ressalta-se que esta escolha seria também interessante do ponto de vista econômico.

Os itens que seguem enfocam o encapsulamento das drogas estudadas segundo as técnicas inferidas neste item.

## ***5.2 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva***

### ***5.2.1 Considerações Gerais***

A partir dos resultados obtidos para a partição de Isoniazida nos sistemas testados, iniciou-se a preparação dos lipossomas incorporando esta droga por encapsulamento passivo durante a hidratação do filme lipídico com soluções da droga em tampão Hepes 10 mM a pH 7,4.

A extrusão de lipossomas através de membranas de polycarbonato com diâmetro de poro de 100 nm no equipamento utilizado geralmente envolve pressões de nitrogênio de cerca de 10 kgf/cm<sup>2</sup> (RIBAS, 1997). Neste trabalho, como o diâmetro de poro nominal das membranas foi de 400 nm, pressões de 2 a 5 10 kgf/cm<sup>2</sup> foram suficientes para realizar a extrusão.

As vesículas unilamelares foram feitas inicialmente utilizando-se uma temperatura na etapa de extrusão de 37 °C, para minimizar possíveis efeitos de degradação térmica das substâncias presentes. Nesta condição, a passagem da amostra pelas membranas de polycarbonato foi muito difícil, pois a temperatura de extrusão estava abaixo da T<sub>c</sub> do DSPC. Também devido às altas concentrações de lipídios, a amostra não se apresentou suficientemente fluida. Assim, a temperatura foi novamente elevada até 65 °C, na qual o processo de extrusão seguiu normalmente.

### ***5.2.2 Avaliação da Eficiência de Remoção da Isoniazida não Encapsulada***

Duas metodologias foram testadas para a remoção do composto terapêutico Isoniazida que não foi encapsulado nas vesículas, a cromatografia de permeação em gel e a diálise.

Para a cromatografia de permeação em gel, utilizou-se uma coluna de dessalinização do tipo PD-10, teoricamente adequada para o sistema em estudo.

A partir dos dados obtidos por medida de absorbância direta (a 300 nm para os lipossomas e a 260 nm para a droga), concentração e volume de cada uma das frações coletadas, para cada ensaio isolado, foi possível obter os perfis de eluição da coluna, conforme ilustrado na Figura 11. Entretanto, os resultados mostram que ocorre uma superposição da eluição do composto terapêutico Isoniazida sobre a eluição dos lipossomas.

Esta superposição indica que a coluna testada não é adequada para efetuar a separação do composto terapêutico não encapsulado dos lipossomas. É interessante observar que a coluna não apresentou o desempenho esperado segundo o manual do fabricante.

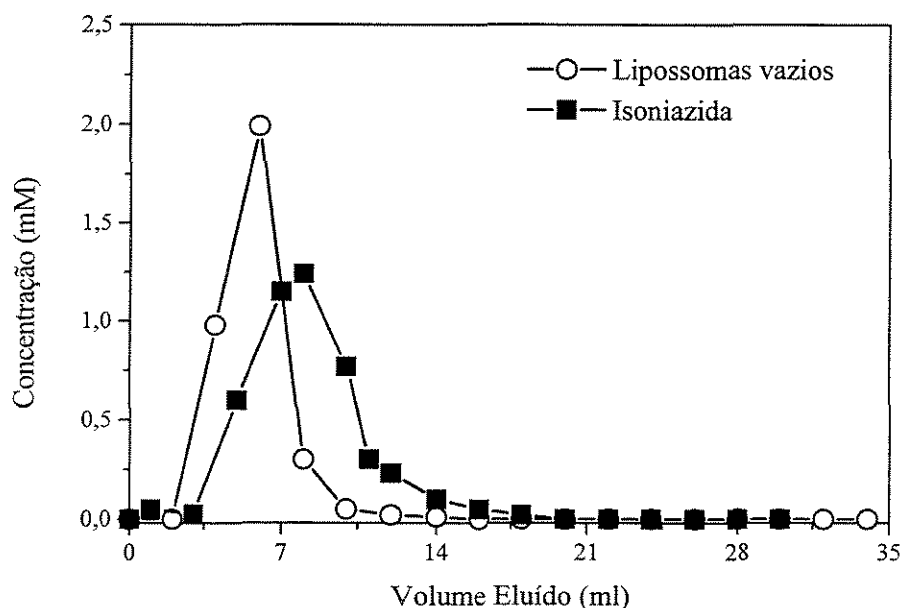


Figura 11- Perfil de eluição cromatográfico das soluções de lipossomas a 2 mM (0,75 mL) e de Isoniazida a 2,42 mM (0,75 mL) em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4.

Testou-se, então, a técnica de diálise para a remoção da droga não encapsulada nos lipossomas, uma técnica bastante simples e que requer pouco ou nenhum equipamento, sendo adequada para o uso em escala de laboratório. Como desvantagens, esta técnica envolve a necessidade de várias trocas do tampão e o uso de grandes volumes deste, além da relativa falta de rapidez inerente ao processo.

Foi realizada a diálise de uma amostra de solução de Isoniazida à concentração de 100 mM, com o objetivo de se avaliar a eficiência desta técnica para a remoção de droga livre. Neste teste, dialisou-se 2,5 mL de amostra de droga a 100 mM em tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4 contra 400 mL do mesmo tampão em quatro etapas, durante um período total de 40 horas. Na solução final de droga foi quantificada a concentração após a diálise por leitura direta da absorbância a 260 nm.

Observou-se que apenas 0,02 % da droga inicialmente adicionada se encontrava presente na amostra ao final da diálise, mostrando que esta técnica seria adequada para a remoção da droga não encapsulada.

### ***5.2.3 Determinação da Concentração de Isoniazida Encapsulada***

A metodologia desenvolvida envolveu a determinação espectrofotométrica da concentração de Isoniazida após o rompimento das vesículas com etanol. Este rompimento faz-se necessário devido à grande interferência das vesículas na absorbância da amostra resultante do espalhamento de luz pelos lipossomas. Além disto, a intensidade da luz que alcança uma molécula de droga encapsulada difere da que alcança uma molécula de droga livre, pela blindagem feita pelos lipossomas intactos. Outro fator relevante relaciona-se à maior homogeneidade dos sistemas contendo lipossomas após sua dissolução com detergentes ou solvente orgânicos.

Nos ensaios feitos pela dissolução das vesículas com etanol, somente uma hora após a adição do solvente observou-se uma estabilização na leitura das absorbâncias. A curva de calibração obtida para a droga após a dissolução com etanol, segundo procedimento descrito anteriormente, apresentou um bom ajuste linear entre as concentrações e as absorbâncias das soluções, para a faixa de concentração de 0 a 1 mM de concentração de Isoniazida.

Foi avaliado também o efeito da presença dos lipídios na medida da absorbância, após o rompimento das vesículas com etanol, para concentrações de lipídios de 0,5 a 3 mM. Apenas para a maior concentração testada obteve-se um valor de absorbância maior que zero, igual a 0,01. Decidiu-se, então, desprezar o efeito da contribuição dos lipossomas na análise da droga encapsulada, utilizando-se durante as análises, concentrações lipídicas inferiores a este valor.

É interessante notar que embora este método de quantificação seja bastante difundido (OSTRO,1987a; LASIC, 1992; NEW,1990), estudos acerca da conveniência de sua utilização para amostras com elevadas concentrações lipídicas não são comuns.

#### ***5.2.4 Efeito da Variação da Razão Molar Inicial Isoniazida/Lipídio nos Lipossomas***

Avaliou-se a influência de variações na razão molar inicial droga/lipídio nas características finais das vesículas, tais como: razão molar final droga/lipídio, diâmetro médio dos lipossomas e estabilidade de estocagem das vesículas a 5 °C.

Foram preparados lipossomas encapsulando a droga Isoniazida a uma concentração final de lipídios de 7,5 mM, na presença do composto terapêutico nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM solubilizado em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4 (para razões molares iniciais de 6,7; 13,3; 40,0; 53,3 e 66,7, respectivamente).

O encapsulamento passivo a diferentes concentrações de droga resultou nos dados mostrados na Tabela 7. Nota-se que o encapsulamento de Isoniazida é sensível à variação da concentração inicial de droga. O aumento nas razões molares droga/lipídio implica em variações nas razões molares finais. Para razões molares iniciais droga/lipídio de 6,7 a 13,3, após a remoção do composto terapêutico não encapsulado, a incorporação da droga resulta em razões molares finais droga/lipídio de 0,006 a 0,333 (equivalente a eficiências de encapsulamento de 0,09 % a 2,50 %) para vesículas com diâmetro médio de 313,5 nm e 286,0 nm, respectivamente. Embora o diâmetro médio final da vesícula de 313,5 nm seja maior que o obtido para as outras vesículas, a razão molar final droga/lipídio foi menor, o que conduziu a um baixo número de moléculas de droga encapsuladas nos lipossomas.

Tabela 7 - Incorporação passiva de Isoniazida em lipossomas para as distintas concentrações iniciais da droga estudadas.

Caracterização do sistema	Razão Molar Inicial Droga/Lipídio				
	6,7	13,3	40,0	53,3	66,7
Razão Molar Final Droga/Lipídio	0,006	0,333	0,011	0,013	0,25
Diâmetro Médio da Vesícula (nm)	313,5	286,0	301,0	291,6	291,0
Eficiência de Encapsulamento (%)	0,09	2,50	0,03	0,02	0,37
Moléculas de Droga/Vesícula	6.149	284.046	10.393	11.527	220.769
Concentração Interna de Droga (mM)	1,2	70,8	2,2	2,7	52,2

A concentração de droga associada decresce para uma razão molar inicial de 40. Acima deste valor, as razões molares finais droga/lipídio aumentam novamente, alcançando um máximo na razão molar final de 0,25 (equivalente a uma eficiência de encapsulamento de 0,37 %). Embora para esta amostra o número de moléculas de droga por vesícula estimado seja de 220.769, portanto apenas 1,3 vezes menor que o maior número de moléculas de droga obtido por vesícula, a eficiência de encapsulamento é quase sete vezes menor que a obtida para a concentração inicial de composto terapêutico de 100 mM.

O desempenho do sistema é, então, mais adequado para uma concentração inicial de composto terapêutico de 100 mM. Na tentativa de elucidar os mecanismos presentes no sistema outros estudos devem ser realizados.

Deve-se observar que os valores de eficiência de encapsulamento obtidos para este tipo de incorporação, e o tipo de vesículas obtidas, estão dentro da faixa prevista pela literatura (NEW, 1990).

É interessante notar também que, embora o diâmetro nominal de poro das membranas de policarbonato usadas na extrusão seja de 400 nm, os lipossomas preparados por esta técnica apresentaram diâmetros médios de cerca de 300 nm. Esta discrepância pode ser devida à desestruturação parcial e re-estruturação das vesículas normalmente observadas durante a extrusão a alta temperatura.

#### *5.2.5 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C*

Foi avaliada a estabilidade de estocagem por três semanas a 5 °C das vesículas encapsulando a droga Isoniazida. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 12 e 13.

Este período foi definido pelo fato de que as maiores modificações estruturais geralmente ocorrem nas primeiras semanas após o preparo das vesículas, quando não nas primeiras horas se o sistema for muito instável. Após este período, normalmente as taxas em que as alterações ocorrem são significativamente menores. Assim, o monitoramento da estabilidade dos lipossomas por cerca de três semanas possivelmente cobriria o período mais crítico, onde as alterações seriam mais pronunciadas.

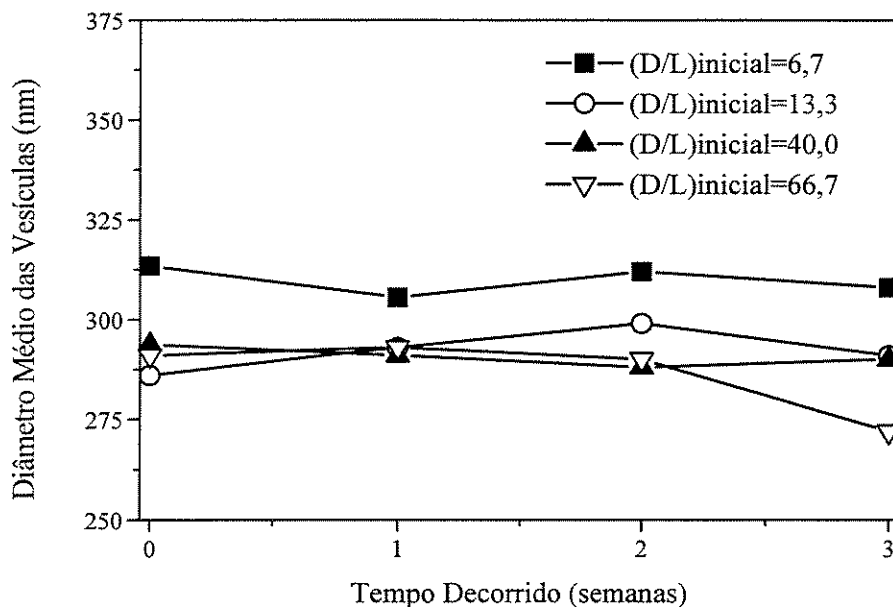


Figura 12 - Variações nos diâmetros hidrodinâmicos com o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira, dos lipossomas contendo o composto terapêutico Isoniazida preparados a diferentes razões molares iniciais droga/lipídio.

Pode-se observar que os lipossomas praticamente não sofreram alterações em seus diâmetros médios. Após três semanas de estocagem, os lipossomas preparados a uma razão molar inicial de 66,7 apresentaram uma redução em seu tamanho, possivelmente devido ao fato de que a concentração de droga usada foi bastante elevada, o que pode ter causado uma desestabilização parcial na estrutura das vesículas.

As razões molares finais droga/lipídio apresentaram comportamentos diferentes para distintas razões molares iniciais droga/lipídio. Nos casos das razões molares iniciais de 6,7 a 40,0 praticamente toda a droga encapsulada permaneceu durante o tempo de estocagem em níveis próximos aos obtidos imediatamente após o encapsulamento da droga nos lipossomas.



A estocagem dos lipossomas preparados à razão molar inicial droga/lipídio de 66,7 resultou no fato de que praticamente 90 % da droga encapsulada foi liberada dos lipossomas na primeira semana de estocagem, sendo que a partir da segunda semana ocorreu uma estabilização das vesículas, mantida até a terceira semana. Tais resultados indicam de fato uma maior estabilidade estrutural para sistemas preparados em menores razões molares iniciais composto terapêutico/lipídio.

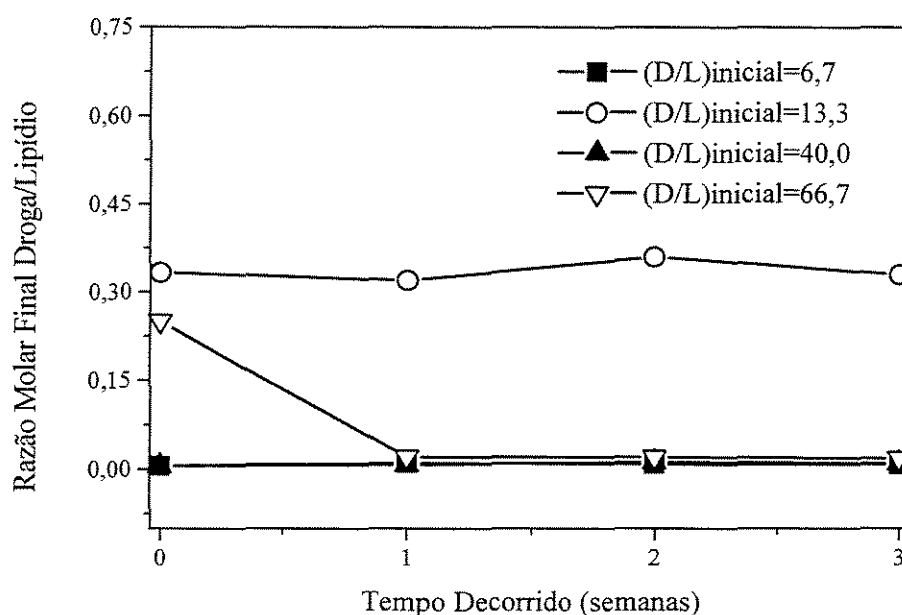


Figura 13 - Variações nas razões molares finais droga/lipídio com o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira, dos lipossomas contendo o composto terapêutico Isoniazida preparados a diferentes razões molares iniciais droga/lipídio.

### ***5.2.6 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva em Soluções do Tensoativo Não-Iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>***

A avaliação da estabilidade das vesículas encapsulando os compostos terapêuticos em soluções de tensoativo não-iônico pode fornecer indícios do possível comportamento dos lipossomas quando em presença de fluidos biológicos, como o sangue. As membranas lipídicas das vesículas podem ser afetadas profundamente pela presença de agentes com atividade superficial, mesmo a baixas concentrações, o que reflete na variação da turbidez das soluções.

Desta forma, após três semanas de estocagem do sistema preparado na razão molar inicial droga/lipídio de 13,3 o qual mostrou as melhores características do ponto de vista de eficiência de encapsulamento e de estabilidade de estocagem, foi feito o estudo da estabilidade frente à adição de diferentes concentrações do tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> medindo-se a absorbância a 340 nm após duas horas de contato. A absorbância normalizada em equilíbrio, definida segundo a equação 6, foi utilizada como resposta:

$$\text{Absorbância Normalizada} = (A - A_0)/A_0 \quad (6)$$

onde A é o valor da absorbância a diferentes concentrações de tensoativo e A<sub>0</sub> é o valor da absorbância na concentração de tensoativo igual a zero.

O percentual de tensoativo não-iônico, definido como o número de moles de C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> dividido pelo total da soma do número de moles de tensoativo e de lipídios foi plotado contra a absorbância normalizada, conforme mostrado na Figura 14.

Ressalta-se que previamente à realização do ensaio de estabilidade, a droga livre foi devidamente removida da amostra de lipossomas.

Pode-se observar que as variações de absorbância normalizada da amostra foram relativamente reduzidas, tanto para as vesículas vazias quanto para os lipossomas contendo a droga encapsulada. Os perfis de variação são semelhantes, notando-se que, inicialmente, a baixas concentrações de tensoativo, ocorrem quedas nas absorbâncias, possivelmente devidas à troca de lipídios e de moléculas de drogas que ocorrem entre as vesículas e micelas mistas formadas simultaneamente por moléculas de lipídios e de  $C_{12}E_5$ .

Observa-se também que a curva das vesículas lipídicas contendo a droga encapsulada é deslocada para a região acima da curva dos lipossomas vazios por praticamente o mesmo valor ao longo de toda a faixa de concentração do  $C_{12}E_5$ . Este deslocamento corresponde a cerca de 0,070 unidades de absorbância, o que se atribui parcialmente à presença do composto terapêutico.

Conforme se pode observar na Tabela 8, para uma concentração de 0,33 mM de Isoniazida livre incubada com diferentes percentuais de  $C_{12}E_5$ , a absorbância relativa das amostras é praticamente constante, ficando em torno de 0,06. Salienta-se que esta concentração de droga é idêntica à dos lipossomas encapsulando Isoniazida em estudo neste item.

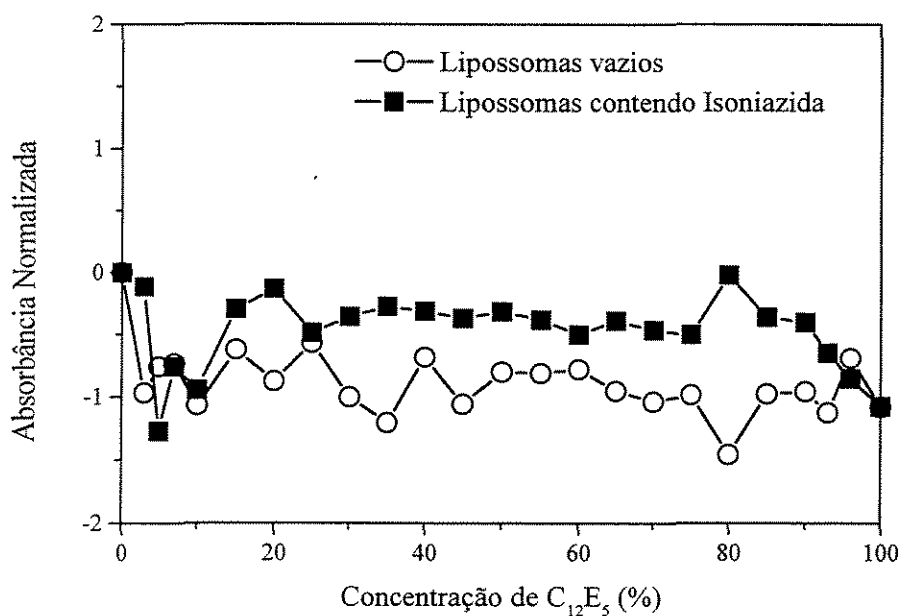


Figura 14 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Isoniazida na razão molar final droga/lipídio de 0,33 em soluções do tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$ .

Tabela 8 - Variações na absorbância relativa a 340 nm da solução de Isoniazida a 0,33 mM incubada com diferentes percentuais de  $C_{12}E_5$ .

Concentração de $C_{12}E_5$ (%)	Absorbância Relativa a 340 nm
3	0,055
30	0,054
60	0,058
90	0,054

### ***5.3 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva***

Com base nos resultados obtidos no encapsulamento da droga Isoniazida, lipossomas encapsulando Pirazinamida foram preparados a uma concentração inicial de lipídios de 7,5 mM, encapsulando o composto terapêutico à concentração de 100 mM, pelo método de hidratação passiva do filme lipídico durante a etapa de preparação dos lipossomas. O mesmo método e condições de encapsulamento expostas para a droga Isoniazida foram utilizados.

#### ***5.3.1 Avaliação da Eficiência de Remoção da Pirazinamida não Encapsulada***

Inicialmente, foram realizados ensaios de cromatografia de permeação em gel de duas amostras, uma contendo lipossomas a 3 mM e a outra, Pirazinamida a 10 mM, com o objetivo de se fazer uma avaliação preliminar da eficiência da utilização de uma coluna cromatográfica de dessalinização do Tipo PD-10 da Pharmacia para a remoção do composto terapêutico não encapsulado nos lipossomas, monitorando-se seus tempos de eluição da coluna. A partir dos dados obtidos por medida de absorbância direta (a 300 nm para os lipossomas e a 260 nm para a droga), concentração e volume de cada uma das frações coletadas, para cada ensaio isolado, foi possível obter os perfis de eluição da coluna, ilustrados na Figura 15.

Os resultados indicam que a metodologia selecionada proporciona boa separação do composto terapêutico não encapsulado, uma vez que enquanto os lipossomas eluem completamente da coluna nos primeiros 10 mL, a droga apenas começa a eluir a partir dos 15 mL. Como o manual do fabricante da coluna menciona que a eluição de moléculas com peso molecular menor que o tamanho de exclusão do gel ocorreria a partir dos 6 mL, supõe-se que a droga possa estar interagindo fracamente com o gel de Sephadex G-25, o que justificaria o atraso em sua eluição da coluna.

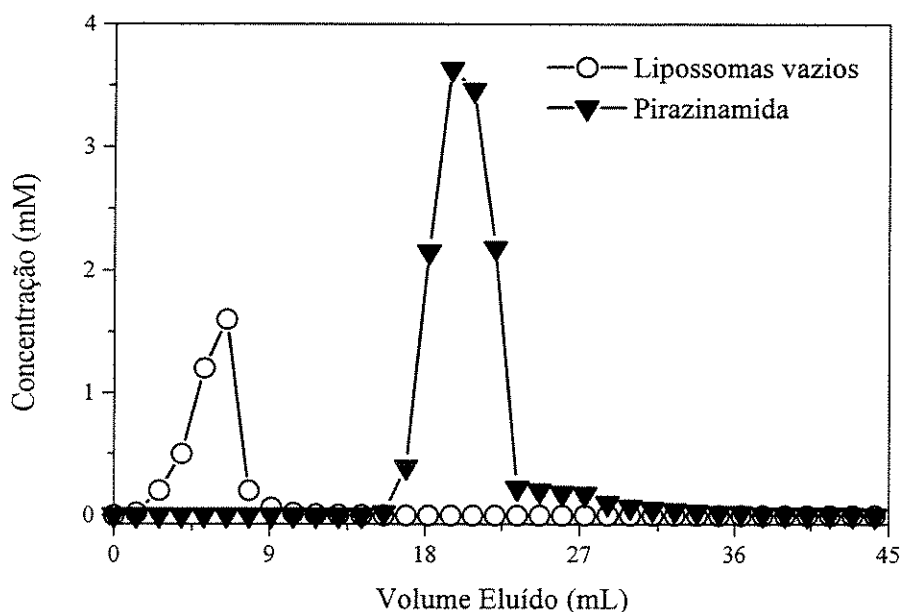


Figura 15 - Perfil de eluição cromatográfica das soluções de lipossomas a 3 mM (0,75 mL) e de Pirazinamida a 10 mM (0,75 mL) em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4.

### 5.3.2 Caracterização dos Lipossomas encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva

Os lipossomas preparados na razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 13,33, após a remoção do composto não encapsulado, apresentaram uma razão molar final droga/lipídio de 0,29 determinada de acordo com o ensaio fosfato e a análise da quantidade de droga encapsulada após a dissolução das vesículas com etanol. A droga foi encapsulada nas vesículas com uma eficiência de 2,2 %, o que está dentro do previsto para este tipo de lipossoma (NEW, 1990).

Os lipossomas contendo Pirazinamida apresentaram um diâmetro médio de 329 nm, enquanto lipossomas sem a droga preparados de maneira idêntica apresentaram diâmetro médio de 304 nm. Assim, a incorporação da droga não parece ter afetado substancialmente a estrutura das vesículas. Para esta amostra, estima-se que cerca de 350.000 moléculas de droga tenham sido encapsuladas por vesícula, valor este superior aos obtidos na incorporação de Isoniazida, devido ao maior tamanho médio das vesículas e, conseqüente, à maior capacidade de retenção de líquido de hidratação.

### *5.3.3 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C*

Foi avaliada a estabilidade de estocagem a 5 °C por três semanas das vesículas encapsulando a droga Pirazinamida descritas no item anterior. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 16 e 17.

A Figura 16 mostra que o diâmetro médio das vesículas encapsulando a droga Pirazinamida não sofreu grandes alterações durante as três semanas de estocagem, diminuindo neste período um máximo de 23,5 nm (7,1 %) com relação ao diâmetro inicial.

Através da Figura 17 observou-se uma diminuição na razão molar final droga/lipídio no período analisado, indicando liberação de material encapsulado dos lipossomas. Nota-se que cerca de 6,5 % da droga encapsulada foi liberada dos lipossomas na primeira semana de estocagem, e que entre a segunda e a terceira semana, mais 10,3 % da droga foi excluída dos lipossomas. Desta forma, observa-se que os lipossomas contendo Pirazinamida são aparentemente menos estáveis durante a estocagem que as vesículas encapsulando Isoniazida nas mesmas condições. Este fato possivelmente deve-se à diferença estrutural das drogas e às conseqüentes diferenças nos coeficientes de partição. Observa-se que a Isoniazida tenderia a permear menos a bicamada lipídica, o que é ilustrado por sua menor partição tanto em 1-Octanol como em n-Dodecano.

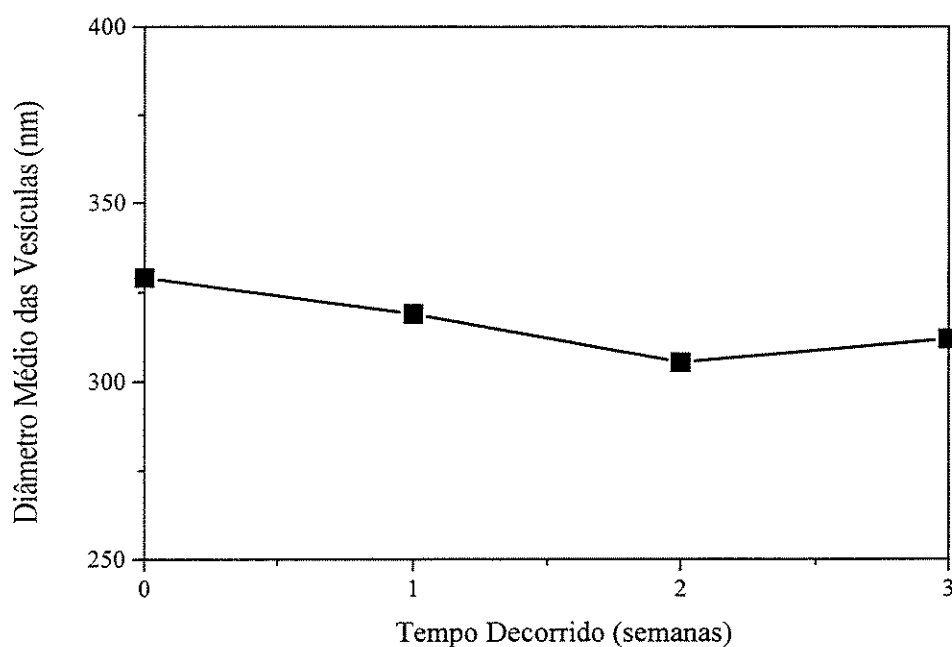


Figura 16 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Pirazinamida preparados a uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3.



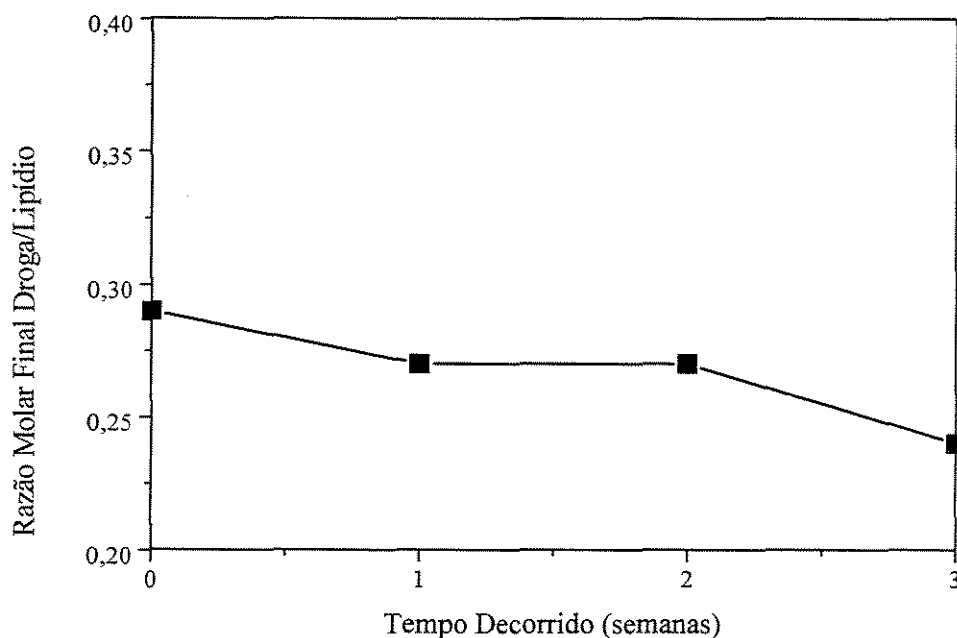


Figura 17 - Variações na razão molar final droga/lipídio durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Pirazinamida preparados a uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3.

#### *5.3.4 Estabilidade dos Lipossomas encapsulando Pirazinamida por Incorporação Passiva em soluções de tensoativo não-iônico $C_{12}E_5$*

Após três semanas de estocagem dos lipossomas encapsulando Pirazinamida, preparados na razão molar inicial droga/lipídio de 13,3, foi feito o estudo da estabilidade frente ao tensoativo  $C_{12}E_5$ , pela avaliação da absorbância a 340 nm duas horas após a adição do tensoativo não-iônico. O ensaio foi realizado de maneira idêntica ao conduzido para o sistema encapsulando a droga Isoniazida. A variação da absorbância normalizada do sistema é mostrada na Figura 18.

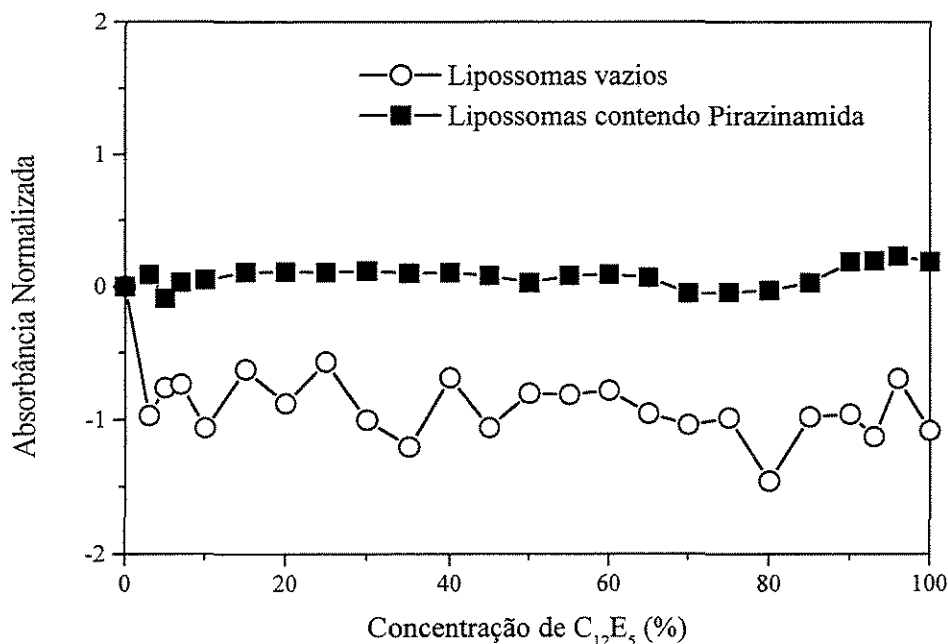


Figura 18 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Pirazinamida na razão molar final droga/lipídio de 0,24 em soluções do tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$ .

A Figura 18 mostra, em toda a faixa de concentração de tensoativo analisada, pequenas variações nos valores das absorbâncias normalizadas da amostra de lipossomas encapsulando a droga, indicando boa estabilidade destas vesículas frente à adição de  $C_{12}E_5$ , embora o teste de estabilidade de estocagem tenha mostrado a liberação indesejada de cerca de 17 % da droga encapsulada. É interessante notar também que, para os lipossomas contendo a droga, a queda inicial na absorbância para baixas concentrações de tensoativo não foi verificada, o que indica, novamente, boa estabilidade destas vesículas.

Como no caso da Isoniazida, a droga livre apresenta absorção de luz no comprimento de onda utilizado para a avaliação da estabilidade ao  $C_{12}E_5$ . Assim, o deslocamento vertical da curva das vesículas contendo a droga Pirazinamida com relação à das vesículas livres pode ser

atribuído à presença da droga. Uma amostra de droga livre com a mesma concentração que a dos lipossomas encapsulando Pirazinamida (0,24 mM) em presença do tensoativo  $C_{12}E_5$  apresenta um valor médio de absorbância a 340 nm de 0,08, determinado nas mesmas condições do ensaio de estabilidade, valor este correspondente ao verificado no deslocamento vertical da curva dos lipossomas contendo a droga encapsulada. Assim, ocorre uma aparente estabilização das vesículas pela incorporação da droga, que poderia ser atribuída a possíveis rearranjos estéricos na bicamada lipídica induzidos pela Pirazinamida e que resultariam na diminuição da permeabilidade dos lipossomas ao  $C_{12}E_5$ .

#### ***5.4 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Rifampicina e Etionamida por Incorporação Passiva***

O encapsulamento passivo dos compostos terapêuticos Rifampicina e Etionamida na membrana lipídica das vesículas foi realizado na razão molar inicial droga/lipídio de 0,1. Tal valor foi selecionado para minimizar a influência das drogas na estrutura das vesículas e na sua estabilidade, viabilizando, ao mesmo tempo, a análise quantitativa das amostras. O mesmo método e condições de encapsulamento expostos para as drogas anteriores foram utilizados, dissolvendo-se a massa de droga conjuntamente à massa de lipídios pela adição dos solventes orgânicos Clorofórmio/Metanol (9:1 v/v) na etapa de formação do filme lipídico seco, o qual depois foi hidratado com tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4.

##### ***5.4.1 Avaliação da Eficiência de Remoção das Drogas Rifampicina e Etionamida não Encapsulada***

A cromatografia de permeação em gel foi a metodologia usada para a remoção dos compostos terapêuticos Rifampicina e Etionamida não encapsulados nas vesículas lipídicas.

Foram realizados ensaios de cromatografia de permeação em gel de três amostras, uma contendo lipossomas a 3,2 mM, outra contendo Rifampicina a 0,05 mM, e uma última contendo Etionamida a 5 mM, com o objetivo de se fazer uma avaliação preliminar da eficiência da utilização de uma coluna cromatográfica da Sigma, empacotada com gel de Sephadex G-50 com volume de leito de 50 mL, para a remoção dos compostos terapêuticos não encapsulados nos lipossomas avaliando-se os tempos de eluição dos materiais isolados da coluna. A partir dos dados de medida direta de absorbância (a 300 nm para os lipossomas, 240 nm para a droga Rifampicina e 300 nm para a droga Etionamida), determinações das concentrações e volume de cada uma das frações coletadas, para cada ensaio isolado, foi possível obter os perfis de eluição da coluna para estas amostras, ilustrados nas Figuras 19 e 20.

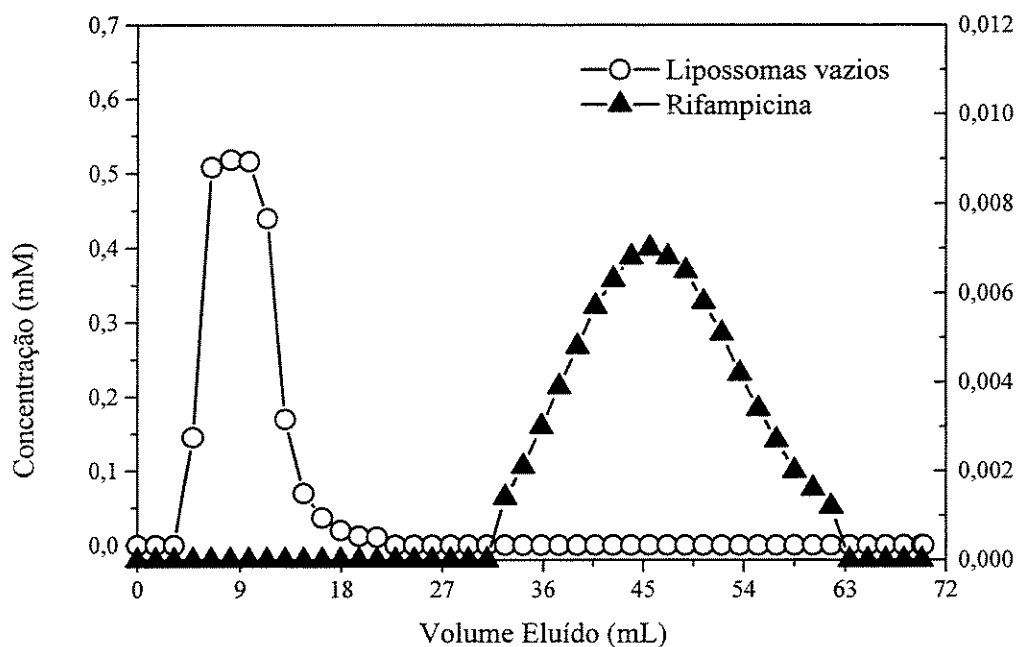


Figura 19 - Perfil de eluição cromatográfico das amostras de lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Rifampicina a 0,05 mM em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4 (1,5 mL).

Os resultados indicam a possibilidade de se obter uma eficiente separação por este método dos compostos terapêuticos não encapsulados nas vesículas, uma vez que enquanto os lipossomas eluem da coluna a partir dos primeiros 5 mL até o volume de 20 mL, as drogas apenas começam a eluir a partir dos 30 mL. Os balanços de massas efetuados para as espécies injetadas na coluna demonstraram também a quase total recuperação das mesmas após sua passagem pela coluna. Recuperou-se aproximadamente 96 % das vesículas e 100 % dos compostos terapêuticos injetados.

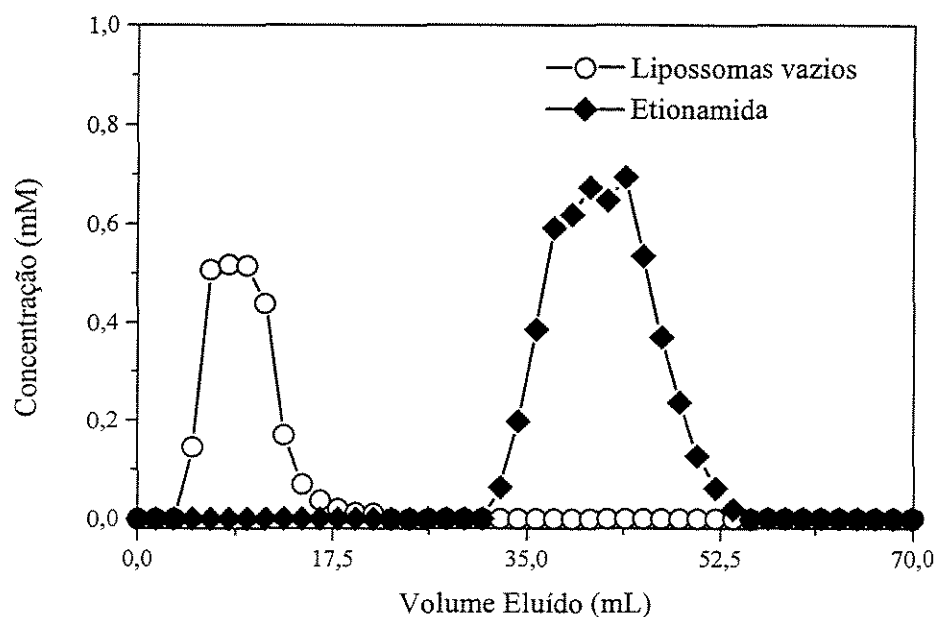


Figura 20 - Perfil de eluição cromatográfica das amostras de lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Etionamida a 5 mM em tampão Hepes 10 mM e pH 7,4 (1,5 mL).

#### ***5.4.2 Caracterização dos Lipossomas encapsulando Rifampicina e Etionamida por Incorporação Passiva***

Os lipossomas preparados na razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 0,1, após a remoção do composto não encapsulado, apresentaram, para a Rifampicina, uma razão molar final droga/lipídio nula, e para a Etionamida de 0,042, determinadas de acordo com os ensaios fosfato e as análises de droga encapsulada após a dissolução das vesículas com etanol.

A droga Rifampicina não foi encapsulada nas vesículas possivelmente em decorrência de sua elevada massa molecular e da sua estrutura tridimensional, que não permitiram sua inserção estável na bicamada lipídica. Nos ensaios com Rifampicina, os lipossomas preparados apresentaram concentração final de lipídios de 3,46 mM e diâmetros médios de 386 nm. Observa-se que, na presença de Rifampicina, as vesículas formadas são consideravelmente maiores que as obtidas anteriormente em presença de Isoniazida e Pirazinamida. A presença desta droga pode ter induzido a formação de vesículas maiores alterando o microambiente de hidratação das bicamadas lipídicas ou modificando as características de re-estruturação das vesículas durante o processo de extrusão.

A droga Etionamida foi encapsulada nas vesículas com uma eficiência relativamente alta, de 42 %. Os lipossomas contendo Etionamida apresentaram um diâmetro médio de 312,3 nm e concentração final de lipídios de 3,5 mM. Para estas vesículas, estima-se que cerca de 43.000 moléculas de droga tenham sido incorporadas por lipossoma, número este inferior aos obtidos na incorporação de Isoniazida e Pirazinamida nos lipossomas, o que é consistente com a reduzida razão molar final droga/lipídio obtida. Neste caso, supõe-se que toda a droga esteja localizada na bicamada lipídica, e não no cerne aquoso da vesícula, o que poderia afetar a estabilidade dos lipossomas, conforme discutido nos itens que se seguem.

#### 5.4.3 Estabilidade dos Lipossomas Encapsulando Etionamida por Incorporação Passiva Estocados a 5 °C

A avaliação da estabilidade de estocagem a 5 °C por três semanas das vesículas em suspensão encapsulando o composto terapêutico Etionamida foi estudada e os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 21 e 22.

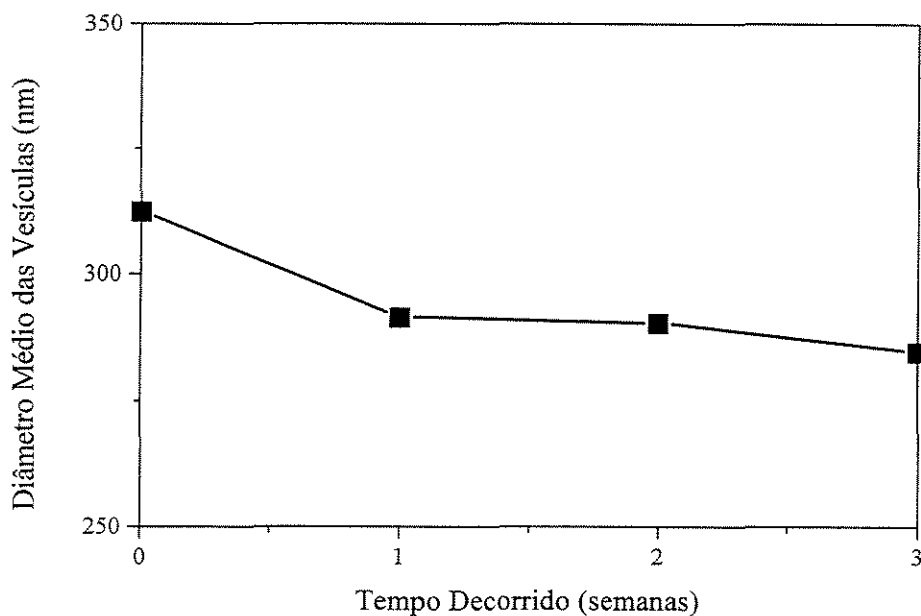


Figura 21 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Etionamida incorporado na razão molar inicial droga/lipídio de 0,1.

As maiores alterações foram observadas após uma semana de estocagem, tanto nos diâmetros médios das vesículas quanto na concentração final de Etionamida. Após a primeira semana, as variações foram menores.

Durante o período de três semanas, os diâmetros médios das vesículas diminuíram um máximo de 28 nm (9 %) com relação ao diâmetro inicial das vesículas, sendo que a maior variação foi observada na primeira semana de estocagem, onde o diâmetro médio das vesículas diminuiu quase 75 % em relação à variação total observada. Basicamente, o mesmo fenômeno é observado para a razão molar final droga/lipídio, onde cerca de 64 % da variação total observada ( 17 %) ocorre durante a primeira semana. Como mencionado anteriormente, a presença da droga na bicamada pode causar um desarranjo parcial na membrana da vesícula, fazendo com que a mesma tenha que se reorganizar para manter sua integridade estrutural, possivelmente expulsando moléculas de droga e, em consequência, causando uma redução no tamanho médio das vesículas.

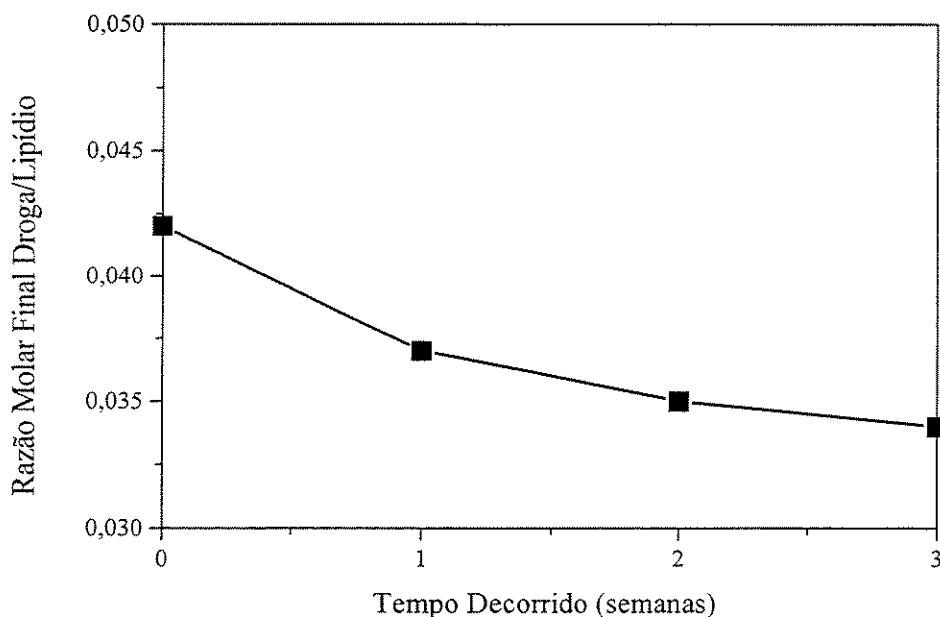


Figura 22 - Variações na razão molar final droga/lipídio durante o tempo de estocagem de três semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas contendo o composto terapêutico Etionamida incorporado na razão molar inicial droga/lipídio de 0,1.



#### 5.4.4 Estabilidade dos Lipossomas encapsulando Etionamida por Incorporação Passiva em soluções de tensoativo não-iônico $C_{12}E_5$

Três semanas após a preparação dos lipossomas contendo Etionamida (razão molar inicial droga/lipídio de 0,1), avaliou-se a estabilidade da amostra ao  $C_{12}E_5$ , conforme descrito anteriormente. A Figura 23 ilustra os resultados obtidos.

Na faixa de concentrações de tensoativo analisada, poucas variações no valores de absorbâncias normalizadas da suspensão de lipossomas encapsulando o composto terapêutico Etionamida foram observadas, indicando a estabilidade destas vesículas. Supõe-se que as pequenas variações presentes nos valores de absorbância sejam devidas à absorbância correspondente à droga (0,034 mM) nas condições em que foi realizado o ensaio, a qual teve valores médios de 0,07.

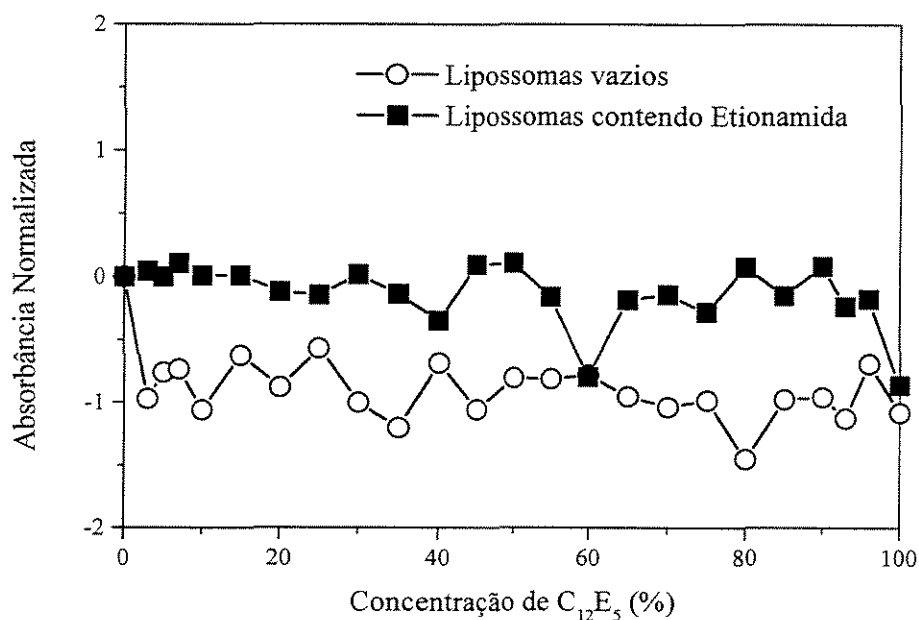


Figura 23 - Estabilidade de lipossomas vazios e lipossomas encapsulando Etionamida na razão molar final droga/lipídio de 0,034 em soluções do tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$ .

Esta estabilidade possivelmente seria devido às vesículas não conterem uma concentração muito alta de material terapêutico incorporado. Uma vez que o ensaio foi realizado três semanas após a preparação da amostra, calcula-se pela razão molar final droga/lipídio, igual a 0,034, que apenas 3,3 % do material que compõe a bicamada lipídica seja droga, o que pode ser insuficiente para resultar em maiores alterações estruturais.

### ***5.5 Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Ativamente as Drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina***

Embora os dados obtidos pela determinação dos coeficientes de partição das drogas em solventes aquosos misturados a 1-Octanol ou a n-Dodecano tenham indicado que as técnicas de incorporação passiva seriam mais indicadas para os compostos terapêuticos em estudo, estes métodos são fortemente associados a reduzidas eficiências de encapsulamento, o que pode implicar em baixa eficiência econômica.

Com o intuito de avaliar a possibilidade de elevação da eficiência de encapsulamento empregando uma técnica alternativa à incorporação passiva, testou-se o encapsulamento ativo das drogas em estudo.

Conforme mencionado anteriormente, soluções aquosas das drogas a pH 7,4 foram incorporadas a lipossomas apresentando um gradiente de pH de cerca de 3,4 unidades. As drogas Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina foram diretamente dissolvidas em tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4.

O mesmo foi feito para as drogas Rifampicina e Etionamida após sua recristalização em evaporador rotatório a vácuo, a partir de soluções de Clorofórmio/Metanol (9:1 v/v) contendo as drogas isoladas. Este procedimento foi adotado para permitir a solubilização destas drogas em tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4.

Os resultados obtidos são descritos a seguir, incluindo-se os ensaios realizados para a droga Estreptomicina, para a qual não se testou a metodologia de encapsulamento passivo. A referida droga apresenta massa molecular bastante elevada (581,6 Da) e sua incorporação passiva possivelmente resultaria em valores de eficiência de encapsulamento muito baixos, similares aos obtidos para a Rifampicina, por efeitos de limitação à transferência de massa da droga entre as bicamadas quando da hidratação das membranas lipídicas.

#### *5.5.1 Remoção da Droga Estreptomicina não Encapsulada por Cromatografia de Permeação em Gel.*

Na remoção da droga Estreptomicina não encapsulada nos lipossomas utilizou-se uma coluna da Sigma empacotada com gel de Sephadex G-50. Foi inicialmente avaliada a eficiência de remoção do material efetivamente não encapsulado por este método, obtendo-se os perfis de eluição da coluna para as amostras de lipossomas a 3,2 mM e de Estreptomicina a 6 mM, ilustrados na Figura 24, através dos dados obtidos por medida de absorbância direta (a 300 nm para os lipossomas e a 280 nm para a droga), concentração e volume de cada uma das frações coletadas, para cada ensaio isolado.

De acordo com os cromatogramas obtidos, nota-se uma adequada separação através do método testado, embora a resolução dos picos não seja tão boa quanto a obtida para outros sistemas. Os lipossomas eluem da coluna nos primeiros 5 mL, até aproximadamente o volume de 16 mL, enquanto a droga começa a eluir a partir dos 20 mL. Os balanços de massas efetuados para as espécies injetadas na coluna demonstraram grande eficiência de recuperação das mesmas. Os lipossomas foram recuperados aproximadamente em 96 %, enquanto para o composto terapêutico obteve-se 98 % de recuperação.

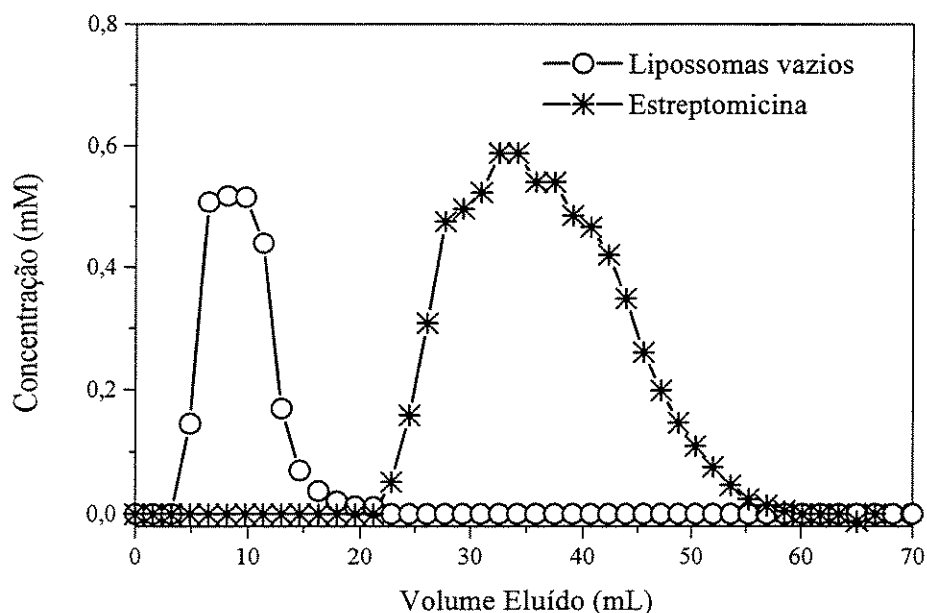


Figura 24 - Perfil de eluição cromatográfica das soluções de Lipossomas a 3,2 mM (1,5 mL) e de Estreptomicina a 6 mM (1,5 mL) em tampão Hepes 10 mM a pH 7,4.

### 5.5.2 Características dos Sistemas Encapsulando as Drogas através do Uso de Gradiente de pH nos Lipossomas

Avaliou-se a resposta dos compostos terapêuticos estudados ao encapsulamento nos lipossomas com um gradiente transmembrânico (interior ácido) estabelecido em 3,4 unidades de pH e com diâmetros médios iniciais de 341 nm. Para todas as drogas os ensaios foram feitos em duplicata e na razão molar inicial composto terapêutico/ lipídio de 0,2. Os resultados obtidos por este tipo de encapsulamento estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Incorporação ativa das drogas Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina nas vesículas lipídicas a uma razão molar inicial droga/lipídio de 0,2.

Caracterização do Sistema	Composto Terapêutico				
	Isoniazida	Pirazinamida	Rifampicina	Etionamida	Estreptomicina
Razão Molar Final Droga/Lipídio	0,21	0,21	0,04	0,22	0,22
Diâmetro Médio das Vesículas (nm)	403,8	401,9	373,3	366,9	321,6
Eficiência de Encapsulamento (%)	≈100	≈100	20	≈100	≈100
Moléculas de Droga/Vesícula	357.079	353.727	58.128	308.838	237.284
Concentração Interna de Droga (mM)	31,6	31,8	6,5	36,5	41,6

Todas as drogas estudadas mostraram distribuição nas vesículas lipídicas em resposta ao gradiente de pH com boa reprodutibilidade. No entanto, as características dos sistemas variaram de um composto para outro. Após a remoção do material não encapsulado, a incorporação ativa das drogas resultou na obtenção de razões molares finais composto terapêutico/lipídio na faixa de 0,04 a 0,22 (equivalente a eficiências de encapsulamento de 20 % a aproximadamente 100 %).

Os níveis de encapsulamento dos compostos terapêuticos nas vesículas lipídicas podem ter sido influenciados por diversos fatores, destacando-se a solubilidade das espécies protonadas no solvente intravesicular (Ácido Cítrico a 300 mM e pH 4), o comportamento das drogas neste solvente quanto à dissociação e a partição das drogas entre os três ambientes

distintos verificados nestes sistemas, os meios aquosos interno e externo e a bicamada lipídica (MADDEN et al., 1990).

É interessante observar que, das drogas utilizadas, a única que se apresenta como um composto lipofílico contendo um grupo do tipo amina primária é a Estreptomicina. Assim, para esta droga, era esperado sucesso na utilização do encapsulamento ativo. Para as drogas restantes, as quais podem ser consideradas como bases fracas, a predição do resultado da incorporação ativa não era imediata.

Vesículas contendo as drogas Isoniazida, Pirazinamida e Etionamida, que apresentam certa semelhança em suas estruturas moleculares, apresentaram comportamentos similares, tanto no tocante à quantidade de droga encapsulada quanto ao diâmetro médio final das vesículas. Lipossomas incubados com Rifampicina possivelmente não apresentaram eficiência de encapsulamento tão elevada como observado nos casos restantes devido à elevada massa molecular deste composto, o que certamente dificulta a permeação da droga através da bicamada lipídica.

As vesículas lipídicas encapsulando os compostos terapêuticos foram obtidas com diâmetros médios na faixa de 321,6 a 403,8 nm, ou seja, com tamanhos significativamente maiores que os observados para as vesículas encapsulando as drogas em estudo por incorporação passiva.

Como estes valores estão mais próximos ao tamanho nominal dos poros das membranas de policarbonato, supõe-se que a hidratação das bicamadas lipídicas e a extrusão estejam sendo efetivamente afetadas pela presença das moléculas de droga.

Este aumento de maneira geral no diâmetro médio das vesículas após a incorporação ativa, exceto para o sistema contendo Estreptomicina, poderia ser atribuído ao fato de que, por este método, as drogas são encapsuladas depois de feita a homogeneização nos tamanhos das vesículas. Neste caso, a acomodação das moléculas de droga nas vesículas poderia provocar um estiramento na membrana lipídica, induzindo um aumento do diâmetro médio das mesmas, o que não ocorreria na incorporação passiva, onde a etapa de extrusão ocorre depois do encapsulamento das drogas nos lipossomas.

Conforme se pode observar na Tabela 9, as concentrações estimadas das drogas no meio aquoso intravesicular são bastante elevadas, principalmente considerando-se que, no início dos ensaios, a concentração de droga no meio externo era de 0,4 mM para todos os compostos terapêuticos. Este resultado está de acordo com a equação (3) de Henderson-Hasselback, que prevê que para vesículas unilamelares exibindo um gradiente de pH de aproximadamente três unidades, pode-se obter gradientes de concentração de droga nos meios aquosos interno e externo aos lipossomas de até 1000 unidades, desde que o pKa da droga seja substancialmente maior que o pH do meio externo.

A partir dos dados da Tabela 9 observa-se também que a eficiência de encapsulamento para quase todas drogas estudadas superou o valor de 100 %. Este fato pode ter sido causado pela ineficiente dissolução das vesículas contendo Ácido Cítrico em seu interior com os solventes orgânicos (Etanol ou Metanol) para as determinações das concentrações dos compostos encapsulados. Este fato foi verificado monitorando-se as variações com o tempo do diâmetro médio de vesículas vazias depois da adição do Etanol em uma razão de 1:9 em volume.

Conforme ilustrado na Figura 25, depois de uma hora da adição do solvente as vesículas não tinham sido completamente dissolvidas. MADDEN et al. (1990) obtiveram resultados semelhantes na quantificação de algumas das drogas incorporadas passivamente em lipossomas, notando-se que este fato não foi discutido pelos autores. É interessante observar que não se verifica na literatura discussões detalhadas a respeito da conveniência da utilização de Etanol para o rompimento de vesículas contendo drogas encapsuladas, especialmente para lipossomas contendo Colesterol.

Devido à baixa concentração lipídica final destas amostras, não permitindo a quantificação de drogas ou lipídios após um novo processo de remoção de composto terapêutico eventualmente liberado durante a estocagem, a estabilidade destas vesículas só pôde ser avaliada quanto à variação dos diâmetros médios em um período de até 42 dias.

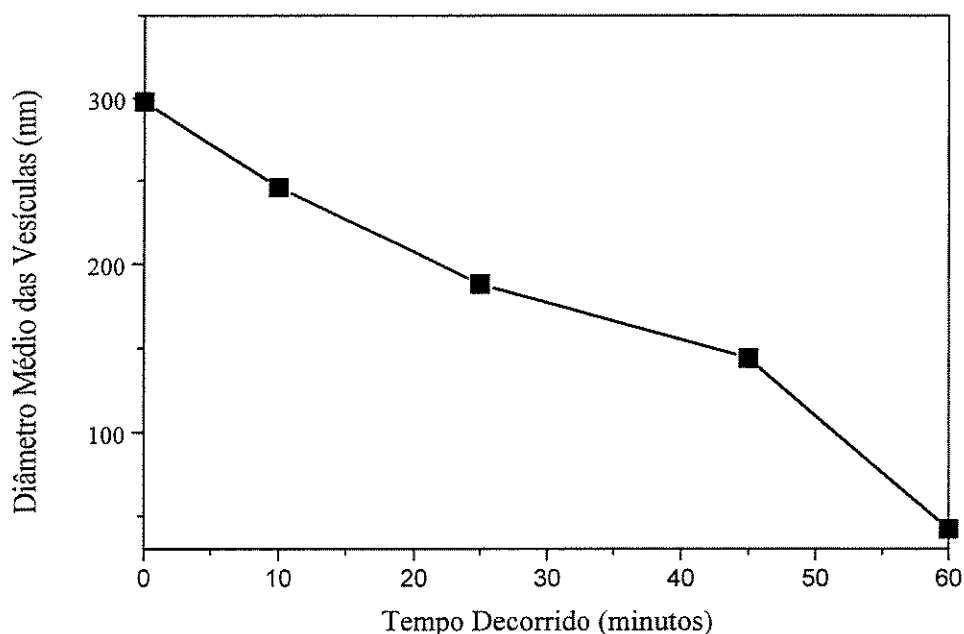


Figura 25 - Variação no Diâmetro Médio das Vesículas Lipídicas preparadas pela metodologia de encapsulamento ativo incubadas com tampão Hepes 10 mM a pH 7,4 durante uma hora após adição de Etanol.

Os lipossomas encapsulando Isoniazida e Pirazinamida não apresentaram variação nos diâmetros médios neste período, enquanto para os sistemas restantes, verificou-se uma redução no tamanho. Para as vesículas contendo Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina as reduções observadas foram de 8, 10 e 17 % com relação ao diâmetro inicial, respectivamente. Isto sugere que as vesículas encapsulando Isoniazida e Pirazinamida possivelmente são mais estáveis do ponto de vista estrutural, embora não permita inferir a respeito da estabilidade quanto à retenção da droga encapsulada.



### 5.6 Comparação do Encapsulamento Passivo e Ativo das Drogas Estudadas

Conforme observado nos itens discutidos anteriormente, verifica-se que diferentes técnicas e condições de encapsulamento de drogas em lipossomas conduzem a diferentes eficiências de incorporação.

A Tabela 10 sumariza os resultados obtidos para a incorporação passiva das drogas no cerne aquoso e na bicamada dos lipossomas, bem como a incorporação ativa das mesmas nas vesículas. Embora as concentrações iniciais das drogas utilizadas nos encapsulamento passivo e ativo não tenham sido as mesmas, o qual é consequente das limitações de cada método.

Tabela 10 - Dados comparativos do encapsulamento passivo e ativo das drogas avaliadas.

Droga	Encapsulamento Passivo			Encapsulamento Ativo		
	D/L final	E (%)	D (nm)	D/L final	E (%)	D (nm)
Isoniazida	0,330	2,5	286	0,21	$\cong 100,0$	404
Pirazinamida	0,290	2,2	329	0,21	$\cong 100,0$	402
Rifampicina	0,000	0,0	386	0,04	20,0	373
Etionamida	0,042	42,0	312	0,22	$\cong 100,0$	367
Estreptomicina	-	-	-	0,22	$\cong 100,0$	322

Observa-se que a incorporação passiva apresenta, em geral, eficiências de encapsulamento bastante reduzidas em comparação às obtidas para a incorporação ativa das mesmas drogas, embora para a Isoniazida e a Pirazinamida as razões molares droga/lipídio finais tenham sido maiores no encapsulamento passivo que no ativo. Este fato era esperado, uma vez que a razão molar inicial droga/lipídio no encapsulamento ativo era já inferior às razões molares finais obtidas na incorporação passiva destas drogas. Com relação ao diâmetro, nota-se que as vesículas resultantes do encapsulamento ativo são invariavelmente maiores que os lipossomas obtidos pela incorporação passiva.

Deve-se considerar que, para vesículas com diâmetro médio de 300 nm preparadas a uma concentração de lipídios de 7,5 mM, o volume teórico de captura da solução de hidratação seria de cerca de 37 mL por litro de suspensão de lipossomas, ou o equivalente a 4,9  $\mu\text{L}$  por  $\mu\text{mol}$  de lipídio. Assim, o máximo teórico de eficiência de encapsulamento de solução de hidratação no cerne aquoso seria de 3,7%. Desta forma, o valor de 2,5 % obtido na incorporação passiva da Isoniazida representa, na realidade, um valor relativamente elevado, atribuindo-se esta redução de 32 % com relação ao valor teórico a efeitos de transferência de massa da droga entre as bicamadas durante a hidratação.

As elevadas eficiências de incorporação verificadas no processo ativo sugerem que este método seja preferencialmente utilizado. Desta forma, tanto a eficiência de encapsulamento como a eficiência econômica do processo seriam elevadas, inclusive notando-se a não necessidade de remoção de droga livre nos casos onde se observa eficiência de aproximadamente 100 %.

Em adição, a incorporação ativa permite a variação independente de parâmetros característicos dos lipossomas, como diâmetro e concentração lipídica, de modo a permitir a obtenção de maiores razões molares finais droga/lipídio.

Com base nas razões molares finais droga/lipídio obtidas, pode-se calcular a massa de droga associada a uma preparação contendo, por exemplo, 10 mM em lipídios, conforme mostrado na Tabela 11, juntamente com os dados da literatura para a dosagem diária necessária de cada droga para pacientes adultos.

Tabela 11 - Dosagem diária requerida das drogas em estudo na forma livre para pacientes pesando mais de 45 kg (Ministério da Saúde, 1995) e massa de droga calculada para amostras de 10 mL de lipossomas a 10 mM encapsulando os compostos terapêuticos em estudo passiva ou ativamente.

Droga	Dosagem diária (mg)	Encapsulamento Passivo	Encapsulamento Ativo
		(mg)	(mg)
Isoniazida	400	4,54	2,89
Pirazinamida	2.000	3,57	2,59
Rifampicina	600	0	3,29
Etionamida	750	0,70	3,66
Estreptomicina	1.000	-	12,80

Como se pode observar através dos resultados obtidos, as dosagens de compostos terapêuticos nas vesículas lipídicas apresentam valores muito reduzidos se comparados aos requeridos nas dosagens para o composto terapêutico livre. Entretanto, a literatura registra aumentos na eficácia terapêutica de drogas antimicrobianas encapsuladas em lipossomas de até 2.000 vezes (AGARWAL et al., 1994). Assim, ensaios *in vitro* e *in vivo* destas preparações devem ser realizados para que se possa estabelecer os níveis de drogas efetivamente necessários.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

#### 6.1 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos durante a preparação e caracterização dos lipossomas unilamelares encapsulando os compostos terapêuticos Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina podem ser formuladas as seguintes conclusões:

- Os coeficientes de partição indicaram que as drogas Isoniazida, Pirazinamida, e Estreptomicina poderiam ser encapsuladas em lipossomas por incorporação passiva durante a hidratação do filme lipídico, enquanto que as drogas Rifampicina e Etionamida poderiam ser passivamente incorporadas tanto no cerne aquoso quanto na bicamada lipídica.
- A droga Isoniazida foi encapsulada passivamente nos lipossomas com eficiência de encapsulamento máxima de 2,5 %. Vesículas preparadas a partir de uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3 apresentaram elevada estabilidade tanto do ponto de vista estrutural como de estocagem a 5 °C.
- O encapsulamento passivo da droga Pirazinamida nos lipossomas para uma razão molar inicial droga/lipídio de 13,3 permitiu obter um sistema com bom desempenho quanto à estabilidade de estocagem e à estabilidade das vesículas quando em presença do tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>, entretanto, a eficiência de encapsulamento obtida foi bastante reduzida, igual 2,2 %.
- O método de encapsulamento passivo durante a formação do filme lipídico seco não conduziu à incorporação da droga Rifampicina nos lipossomas para uma razão molar inicial droga/lipídio de 0,1.

- A Etionamida foi encapsulada com eficiência de 42 % nos lipossomas pelo método de incorporação passiva na bicamada lipídica a uma razão molar de 0,1. Embora se tenha observado boa estabilidade estrutural das vesículas pela reduzida variação nos diâmetros médios com o tempo e por seu comportamento em presença de  $C_{12}E_5$ , houve liberação de 19 % da droga encapsulada durante três semanas de estocagem a 5 °C.
- O encapsulamento ativo dos compostos terapêuticos Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina, Etionamida e Estreptomicina em lipossomas pelo uso de um gradiente de pH na membrana das vesículas de 3,4 unidades resultou em maiores eficiências de encapsulamento que as obtidas para a incorporação passiva de todas as drogas, o que sugere que sua utilização seria mais vantajosa.

## 6.2 Sugestões

Para a continuidade deste estudo, sugere-se a consideração dos aspectos mencionados a seguir:

- Estudo do efeito da variação da razão molar inicial droga/lipídio na eficiência do encapsulamento ativo dos agentes terapêuticos nas vesículas, para a obtenção de maiores concentrações de droga, assim como de seu comportamento com relação à liberação de droga durante períodos de estocagem e à presença de  $C_{12}E_5$ .
- Avaliação do efeito da nebulização das vesículas contendo as drogas encapsuladas nas características finais dos lipossomas.
- Estudo *in vitro* e *in vivo* da efetividade das formulações de lipossomas contendo os compostos terapêuticos encapsulados contra o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*.
- Avaliação da estocagem dos lipossomas encapsulando os compostos terapêuticos na forma liofilizada.

- Estudo do encapsulamento passivo e ativo de combinações de drogas usadas no tratamento primário e secundário da Tuberculose.
- Estudo do encapsulamento dos compostos terapêuticos por métodos que permitam um mais fácil escalonamento do processo.

## CAPÍTULO VII

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, A. et al. – *Tufts-bearing liposomes as Rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice.* - Antimicrobial Agents Chemotherapy, v. 38, n. 3, p. 588-593, 1994.
2. ALLEN, T. M. e CHONN, A. - *Large Unilamellar Liposome with Low Uptake into the Reticuloendothelial System* – FEBS Letters, v. 223, n. 1, p. 42-46, 1987.
3. ALLEN, T. M.; HANSEN, C. e RUTLEDGE, J. – *Liposomes with Prolonged Circulation Times: Factors Affecting Uptake by Reticuloendothelial and Other Tissues*- Biochimica et Biophysica Acta, v. 981, p. 27-35, 1989.
4. ALLEN, T. M.; HANSEN, C.; MARTIN, F.; REDEMANN, C. e YAU-YOUNG, A. – *Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(Ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in vivo* – Biochimica et Biophysica Acta, v. 1066, p. 29-36, 1991.
5. ALLEN, T. M.; RYAM, J. L. e PAPAHAADJOPOULOS, D. – *Gangliosides Reduce Leakage of Aqueous-Space Markers from Liposomes in the Presence of Human Plasma* – Biochimica et Biophysica Acta, v. 818, p. 205-210, 1985
6. BARENHOLZ, Y. e CROMMELIN, D. A. - *Liposomes as PHarmaceutical Dosage Forms* - In: Swarbrick, J. e Boylan, J. C. - Encyclopedia of PHarmaceutical Technology, v. 9, Marcel Dekker Inc., New York, p. 1-39, 1994.
7. BERGOGNE-BEREZIN, E. - *PHarmacokinetics of fluoroquinolones in the respiratory tissues and fluids* - Quinolones Bull, v. 10, p. 1-18, 1993.
8. BERMUDEZ, L. E. – *Use of Liposome Preparation to treat Mycobacterial Infections* – Immunobiology, v. 191, n. 4-5, p. 578-583, 1994.
9. BERTHELOT E JUNGFLEISCH - *Ann. Chimica. Physica.*, v. 4, n. 26, 1872.

10. BLUME, G. e CEVC, G. – *Liposomes for the Sustained Drug Release in vivo* – Biochimica et Biophysica Acta, v. 1029, p. 91-97, 1990.
11. CHEN Jr, P. S.; TORIBARA, T. Y. e WARNER, H. – *Microdetermination of phosphorus*. Anal. Chemistry, v. 28, n. 11, p. 1756-1758, 1956.
12. CONLEY, J.; YANG, H.; WILSON, T.; BLESETTI, K.; DI NINNO, V.; SCHNELL, G. e WONG, J. P.- *Aerosol Delivery of Liposome-Encapsulated Ciprofloxacin: Aerosol Characterization and Efficacy against Francisella tularensis Infection in Mice*. - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 1288-1292, June 1997.
13. CROMMELIN, D. J. A. e SCHREIER, H. - *Liposomes* - In: Kreuter, J. - Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker Inc., New York, p. 73-191, 1994.
14. CYNAMON, M. H.; SWENSON, C. E.; PALMER, G. S. e GINSBERG, R. S. *Liposome-encapsulated-amikacin therapy of Mycobacterium avium complex infection in beige mice* - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 33, p. 1179-1183, 1989.
15. DAVID, H. L.- *Basis for lack of Drug-Susceptibility of Atypical Mycobacteria- Infections Disease.*, v. 3, p. 878 – 884, 1981.
16. DEOL, P. e KHULLER, G. K.- *Lung Specific Stealth Liposomes: Stability, Biodistribution and Toxicity of Liposomal Antitubercular Drugs in Mice* – Biochimica. Biophysica Acta, v. 1334, n. 2-3, p. 161-172, 1997.
17. EDWARDS, K. e ALMGREN, M. - *Surfactant-Induced and Structural Change of Lecithin Vesicles: Effect of Surfactant Headgroup Size* - Langmuir, v. 8, p. 824-832, 1992.
18. EDWARDS, K. e ALMGREN, M. - *Kinetics of Surfactant-Induced Leakage and Growth of Unilamellar Vesicles* - Progress in Colloid & Polymer Science, v. 82, p. 190-197, 1990.
19. EDWARDS, K. e ALMGREN, M. - *Solubilization of Lecithin Vesicles by C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>* - Journal of Colloid and Interface Science, v. 147, n. 1, p. 1-21, 1991.
20. EDWARDS, K.; ALMGREN, M.; BELLARE, J. e BROWN, W. – *Effects of Triton X-100 on Sonicated Lecithin Vesicles* – Langmuir, v. 5, p. 473-478, 1989.
21. FIÚZA, M. - *Palestra proferida na Mesa Redonda Resistência do M. tuberculosis às Drogas*, no VII Simpósio Brasileiro em Micobactérias, Rio de Janeiro, novembro de 1997.



22. FIÚZIA, M. – *SP lidera o ranking de casos de Tuberculose no País* – O Estado de São Paulo, São Paulo, Julho, 1999.
23. FLOREY, K. - *Analytical Profiles of Drug Substances* - v. 5, p. 467-513, 1976.
24. FLOREY, K. - *Analytical Profiles of Drug Substances* - v. 6, p. 183-258, 1977.
25. FLOREY, K. - *Analytical Profiles of Drug Substances* - v. 7, p. 231-249, 1978.
26. FORD Jr., N. C. – *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* – R. Pecora (Editor) Plenum Press, New York, p. 7-57, 1985.
27. FOX, W. e MITCHISON, D. A, *Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis*. Am. Rev. Respir. Dis., n. 111 p. 325-353, 1975.
28. GABIZON, A. e PAPAHAADJOPOULOS, D. – *Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in Blood and Enhanced Uptake by Tumors* – Proc. National. Academy. Science. USA, v. 85, p. 6949-6953, 1988.
29. GABIZON, A. e PAPAHAADJOPOULOS, D. – *The Role of Surface Charge and Hydrophilic Groups on Liposome Clearance in vivo* – Biochimica et Biophysica Acta, v. 1103, p. 94 – 100, 1992.
30. GAENSLER, E. A. *The surgery for pulmonary tuberculosis*. Am. Ver. Respiratory. Disease., n. 125, p. 73-84, 1982.
31. GANGADHARAM, P. R. J. e ISEMAN, D. M. D. - *Antimycobacterial drugs- Antimicrobial agents annual 2*. Elsevier Scientific Publications, BV, Amsterdam, p. 14-35, 1987.
32. GANGADHARAM, P. R. J.; ISEMAN, M. D.; PETERSON, P. K. e VERHOEL, J. - *Antimycobacterial drugs- Antimicrobial agents annual 1*. Elsevier Scientific Publications, BV, Amsterdam, p. 17-39, 1986
33. GANGADHARAM, P. R. J.; ASHTEKAR, D. A.; GHORI, N.; GOLDSTEIN, J.; DEBS, R. J. e DÜZGÜNES, N. - *Chemotherapeutic Potential of Free and Liposome Encapsulated Streptomycin against Experimental Mycobacterium avium Complex Infections in Beige Mice* - Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 28, p. 425-345, 1992.

34. GAY, J. D.; DE YOUNG, D. R. e ROBERTS, G. D. - *In vitro activities of Norfloxacin and Ciprofloxacin against Mycobacterium Tuberculosis, M. avium Complex, M. chelonae, M. fortuitum, and M. kansasii* - Antimicrobiological Agents Chemotherapy, v. 26, p. 94-96, 1984.
35. GONZALEZ-TOTHI, R. J. - *Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: Functional and morphological interactions*.-Exp. Lung. Respiratory., 1991.
36. GREGORIADIS, G. - *Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems* - Trends in Biotechnology, v. 13, p. 527-537, 1995.
37. GROSSET, J. *Bacteriological Basis of Chemotherapy of Tuberculosis*, In *Regional Seminar on Tuberculosis Chemotherapy*, 3, Proceedings. Washington, 1979.
38. HARRIS, E.L.V e ANGAL, S. - *Protein Purification Methods :A Practical Approach* - Oxford University Press, New York, p. 296, 1989.
39. HEIFETS, L. B. e LINDHOLM-LEVY, P. J.- *Bacteriostatic and Bactericidal Activity of Ciprofloxacin and Ofloxacin against Mycobacterium Tuberculosis and M. avium Complex* - Tubercle, v. 68, p. 267-276, 1987.
40. ISRAELACHVILI, J. - *Intermolecular Surface Forces* - Segunda Edição, São Diego, EUA, 1994.
41. ISRAELACHVILI, J. e MITCHELL, D. J. - *A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes* - Biochimica et Biophysica Acta, v. 389, p. 13-19, 1975.
42. KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V. P. e HUANG, L. - *Amphipatic Polyethyleneglycols Effectively Prolong the Circulation Time of Liposomes* - FEBS Letters, v. 268, n.1, p. 235-237, 1990.
43. KOGA, H.; MIYASAKI, Y.; KOHNO, S. e HARA, K. - *A Drug Delivery System and Biological Response Modifiers for the Treatment of Mycobacterial Infection* - Kekkaku, v. 69, n. 2, p. 113-118, 1994.
44. KREUTER, J. - *Collodial Drug Delivery Systems. Drugs and the Pharmaceutical Sciences* - New York, Marcel Dekker Inc. v. 66, 1994.

45. KURUNOV, I. N., et al. – *Effectiveness of a Liposomal form of Rifampicin in the Treatment of Experimental Tuberculosis in Mice* – Probl. Tuberk, v. 1-2, p. 13-15, 1992.
46. KURUNOV, I. N., et al. – *Effectiveness of Liposomal Antibacterial Drugs in the Inhalation Therapy of Experimental Tuberculosis*.- Probl. Tuberk, v. 1, p. 38-40, 1995.
47. LACAZ, C., D. - *Antibióticos*. Editora da Universidade de São Paulo, Brasil., p. 381-390, 1969.
48. LASIC, D. D. - *Liposomes* - American Scientist, v. 80, p. 20-31, 1992.
49. LASIC, D. D. - *The Mechanism of Vesicle Formation* - Biochemistry Journal, v. 256, p. 1-11, 1988.
50. LASIC, D. D. e MARTIN, F.- *Stealth Liposomes*- CRC Press Inc., Boca Raton, 1995.
51. LASIC, D. D.; MARTIN, F. J.; GABIZON, A.; HUANG, S. K. e PAPAHAADJOPOULOS, D. – *Stearically Stabilized Liposomes: a Hypothesis on the molecular Origin of the Extended Circulation Times*- Biochimica et Biophysica Acta, v. 1070, p. 187-192, 1991.
52. LEO, A. HANSCH. C. e ELKINS, D.- *Partition Coefficients and their uses* - Chemical Reviews, v. 71, n. 6, Dec. 1971.
53. LIU, D.; MORI, A. e HUANG, L. – *Large Liposomes Containing Ganglioside GM1 Accumulated Effectively in Spleen* – Biochimica et Biophysica Acta, v. 1066, p. 159-165, 1991.
54. MADDEN, T. D.; HARRIGAN, P. R.; TAI, L. C. L.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; REDELMEIER, T.; LOUGHREY, H. C.; TILCOCK, C. P. S.; REINISH, L. W. e CULLIS, P. R. - *The Accumulation of Drugs within Large Unilamellar Vesicles Exhibiting a Proton Gradient: a Survey* - Chemistry and Physics of Lipids, v. 53, p. 37-46, 1990.
55. MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; HOPE, M. J. e CULLIS, P. R. - *Techniques for Encapsulating Bioactive Agents into Liposomes* - Chemistry and Physics of Lipids, v. 40, p. 333-345, 1986.

56. MAYER, L. D.; MADDEN, T. D.; BALLY, M. B. e CULLIS, P. R. - *pH Gradient-Mediated Drug Entrapment in Liposomes* - In: Gregoriadis, G. - *Liposome Technology*, 2<sup>a</sup> edição, v. II, CRC Press Inc., Boca Raton, p. 27-44, 1993.
57. MAYER, L. D.; TAI, L. C. L.; BALLY, M. B.; MITILENES, G. N.; GINSBERG, R. S. e CULLIS, P. R. - *Characterization of Liposomal Systems Containing Doxorubicin Entrapped in Response to pH Gradients* - *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1025, p. 143-151, 1990.
58. MEDDA, S.; MAHATO, S. B.; MAHADEVAN, P. R. e BASU, M. K. - *Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophago-associated disorders involving Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis*. - *Indian Journal Biochemica et Biophysica*, ed. 32, v. 3, p. 147-151, 1995.
59. MÉNDEZ, A. P. - *Resistência das Drogas Antituberculose no Mundo* - Projeto global da OMS/UICTEP, 1994-1997.
60. MERCK INDEX - 12<sup>a</sup> Edição, Whitehouse Station, NJ, 1996.
61. METHA, R. T.; KEYHANI, A.; MCQUEEN, T. J.; ROSENBAUM, B.; ROLSTON, K. V. e TARRAND, J. J. - *In vitro activities of free and liposomal drugs against Mycobacterium avium-M. intracellulare Complex and M. Tuberculosis* - *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2584-2587, 1993.
62. MINISTÉRIO DE SAÚDE – *Manual de Normas para o Controle da Tuberculose* (Editado em 1995) – *Journal de Pneumologia*, v. 23, n. 6, p. 281-293, 1997
63. MORAES, Â.M. - *Preparação, Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Lipossomas Contendo o-Carboranilpropilamina, L-p-Boronofenilalanina e Doxorubicina*. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., 1996.
64. MYERS, M. A. et al. - *Pulmonary Effects of Chronic Exposure to Liposome Aerosols in Mice*. - *Esp. Lung. Res.*, 1991.

65. NEW, R. R. C. – *Liposomes: A Practical Approach* – Oxford University Press, Oxford, 1990.
66. NIGHTINGALE, S. D.; SALETAN, S. L.; SWENSON, C. E.; LAWRENCE, A. J.; WATSON, D. A.; PILKIEWICZ, F. G.; SILVERMAN, E. G. e CAL, S. X. - *Liposome-Encapsulated Gentamicin Treatment of Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex bacteremia in AIDS patients*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 37, p. 1869-1872, 1993.
67. NILSSON, K.; ALMGREN, M.; BROWN, W. e JANSSON, M. – *Effects of a Non-Ionic Surfactant on Small Unilamellar Lecithin Vesicles* – Mol. Cryst. Liq. Cryst., v. 152, p. 181-203, 1987.
68. OROZCO L.; QUINTANA F.; BELTAN R.; MORENO I.; WASSERMAN M. e RODRIGUEZ G.- *The use of Rifampin and Isoniazid entrapped in Liposomes for the Treatment of murine Tuberculosis* – Tubercle, v. 67, p. 91-97, 1986.
69. OROZCO, L. C.; FORERO, M.; WASSERMAN, M. e AHUMADA, J. J.- *Distribution of Liposomes in Tuberculous Mice* –Tubercle, v. 71, p. 209-214, 1990.
70. OSTRO, M. J. – *Liposomes* – Scientific American, v. 256, n. 1, p. 90-99, 1987 (a).
71. OSTRO, M. J. - *Liposomes: from Biophysics to Therapeutics* - Marcel Dekker, New York, 1987 (b).
72. PAPAHAADJOPOULOS, D.; ALLEN, T. M.; GABIZON, A.; MAYHEW, E.; MATTHAY, K.; HUANG, S. K.; LEE, K. D.; WOODLE, M. C.; LASIC, D. D.; REDEMANN, C. e MARTIN, F. J. – *Stearically Stabilized Liposomes: Improvements in Pharmacokinetics and Antitumor Therapeutic Efficacy* – Proc. National. Academy. Science. USA, v. 88, p. 11460-11464, 1991.
73. PARAMPAL, D.; KHULLER, G. K. e JOSHI, K. - *Therapeutic Efficacies of Isoniazid and Rifampin Encapsulated in Lung-Specific Stealth Liposomes against Mycobacterium tuberculosis Infection Induce in Mice* - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 1211-1214, June 1997.

74. POWERS, J. D.; KILPATRICK, P. K. e CARBONELL, R. G. – *Trypsin Purification by Affinity Binding to Small Unilamellar Liposomes* – *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, p. 506-519, 1990
75. RIBAS, A. M. – *Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de Tensoativos* – Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, 1997.
76. ROUHI, A. M. – *Tuberculosis: a Tough Adversary* – *Chemical & Engineering News*, p. 52-69, Maio, 1999.
77. RUFINO NETO, A. - Palestra proferida na Mesa Redonda *Perfil Atual da Tuberculose no Brasil*, no VII Simpósio Brasileiro em Micobactérias, Rio de Janeiro, novembro de 1997.
78. RUIZ, J.; GOÑI, F. M. e ALONSO, A. - *Surfactant-Induced Release of Liposomal Contents. A Survey of Methods and Results* - *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 937, p. 127-134, 1988.
79. SAITO, H. e TOMIOKA, H. - *Therapeutic efficacy of liposomal entrapped Rifampin against Mycobacterium avium complex infection induced in mice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, p. 429-433, 1989.
80. SBARBARO, J. A.- *DOTS- Directly Observed Therapy- Who is responsible?.*- *MPH in Clin. Chest Medicine*, v. 18, n. 1, 1997.
81. SHEK, P. N.; SINTRES, Z. E e BROOKS, J. I. – *Liposome in Pulmonary Applications: Physicochemical Considerations, Pulmonary Distribution and Antioxidant Delivery* – *Journal Drug Target.*, v. 2, n. 5, p. 431-442, 1994.
82. SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V. e BUGARSKI, B. – *Liposomes as Carriers of Antimicrobial Drugs* – *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 23, n. 5, p. 483-488, 1997.
83. SINGH, A. P. e KHULLER, G. K. – *Induction of Immunity Against Experimental Tuberculosis with Mycobacterial Mannophosphoinositides Encapsulated in Liposomes Containing Lipid A* – *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, v. 8, n. 2, p.119-126, 1994

84. STEFFEN, D. M. – *The effect of Cholesterol, Phosphatidylethanolamine and Immobilized Horseradish Peroxidase on the Stability of Phosphatidylcholine Vesicles when Treated with Nonionic Surfactant* – Tese de Mestrado, North Carolina State University, Raleigh, NC, EUA, 1993.
85. SUNAMOTO, J.; KONDO, H. e YOSHIMATSU, A. - *Liposomal Membranes I: Chemical Damage of Liposomal Membranes with Functional Detergent* - *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 510, p. 52-62, 1978.
86. TALSMA, H. e CROMMELIN, D.J.A. - *Liposomes as Drug Delivery System, Part 1: Preparation* - *Biopharmacy*, p. 36-47, outubro de 1992 (a).
87. TALSMA, H. e CROMMELIN, D.J.A. - *Liposomes as Drug Delivery System, Part 2 : Characterization* - *Biopharmacy*, novembro-dezembro de 1992 (b).
88. TAYLOR, K. M. G. e NEWTON, J. M. - *Liposomes for Controlled Delivery of Drugs to the Lung* - *Thorax*, v. 47, p. 257-259, 1992.
89. THOMAS, D. A., et al. – *Accute effects of Liposome Aerosol Inhalation on Pulmonary Function in Healthy Human Volunteers* – *Chest.*, 1991.
90. TOMAN, K. - *Tuberculosis: Detección de Casos e Quimioterapia*. Washington, D. C. Organización Panamericana de la Salud, p. 268, 1980.
91. *Tuberculose: Prevenindo e Tratando* – Boletim Notícias FAPESP, v. 43, p. 16-19, Junho 1999.
92. URBANEJA, M. A.; GOÑI, F. M. e ALONSO, A. - *Structural Changes Induced by Triton X-100 on Sonicated Phosphatidylcholine Liposomes* - *European Journal Biochemistry.*, v. 173, p. 585-588, 1988.
93. VLADIMIRSKI, M. A e LADIGINA, G. A – *Antibacterial Activity of Liposome-Entrapped Streptomycin in Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis* – *Biomedicine (Paris)*, v. 36, p. 375, 1982.
94. VLADIMIRSKI, M. A, et al. – *Liposomes as Vehicles of Antitubercular Drugs: a New Approach to Experimental Chemotherapy of Tuberculosis* – *Probl. Tuberkle*, v. 7, p. 53-56, 1980.

95. VLADIMIRSKI, M. A.; LADIGINA, G. A. e TENTSOVA, A. – *Effectiveness of Liposomes-entrapped Streptomycin in Experimental Tuberculosis in Mice* – Antibiotiki, v. 28, p. 23-26, 1983.
96. WONG, J. P.; DI NINNO, V. L. e CHERWONOGRODZKY, J. W. - *Liposome-Encapsulated Ciprofloxacin is Effective in the Protection and Treatment of BALB/c Mice against Francisella tularensis* - J. Infect. Disease, v. 168, p. 793-794. 1993.
97. WONG, J. P.; DI NINNO, V. L.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; DELA CRUZ, R. e SARAVOLAC, E. G - *Liposome-encapsulated Ciprofloxacin for the Prevention and Treatment of Infections Diseases caused by Intracellular Pathogens* - In A. t. Florence and G. Gregoriadis (ed.), *Liposomes in biomedical applications*. Harwood Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 105-120, 1995.
98. WOODLE, M. C.; COLLINS, L. R.; SPONSLER, E.; KOSSOVSKY, N.; PAPAHAADJOPOULOS, D. e MARTIN, F. J. – *Sterically Stabilized Liposomes: Reduction in Electrophoretic Mobility But Not Electrostatic Surface Potential* – Biophysical Journal, v. 61, p. 902-910, 1992.
99. YU-KYOUNG; NIX, D. E. e STRAUBINGER, R. M. - *Formulations and efficacy of Liposome-Encapsulated Antibiotics for Therapy of Intracellular M. avium Infection*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 2104-2111, Setembro 1995.