

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOVESÍCULAS LIPOSSÔMICAS COMPÓSITAS DE
FOSFATIDILCOLINA DA LECITINA DE SOJA E QUITOSANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Omar Mertins

Porto Alegre, 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOVESÍCULAS LIPOSSÔMICAS COMPÓSITAS DE
FOSFATIDILCOLINA DA LECITINA DE SOJA E QUITOSANA**

OMAR MERTINS

Licenciado em Química

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre
em Química.**

Porto Alegre, junho de 2004.

A presente dissertação foi realizada no período entre junho/2002 a maio/2004, no Instituto de Química da UFRGS, sob orientação de Nádyá Pesce da Silveira e co-orientação de Adriana Raffin Pohlmann, inteiramente pelo autor.

Omar Mertins

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nádyá Pesce da Silveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Raffin Pohlmann

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Irene Teresinha Santos Garcia
Instituto de Química e Geociências – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof.^a Dr.^a Sílvia Stanisçuaski Guterres
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof.^a Dr.^a Clara Isméria Damiani Bica
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

“ Lipossoma é um projeto inteligente que obedece a uma programação prévia para um trabalho específico.”

Papahadjopoulos

Para a minha mãe Nair

Agradecimentos

À Nádyá, pela amizade, orientação e por desenvolver o meu interesse e amor pela pesquisa.

À Adriana, pela amizade, apoio, co-orientação e por me ensinar a fazer uma boa cromatografia em coluna nas longas horas que ficamos trabalhando no laboratório.

Ao Marcelo, por toda a sua dedicação como aluno de iniciação científica, interesse e companheirismo desde o início da realização deste trabalho.

À todos os colegas do LINDIM, pelos inúmeros auxílios e por fazerem do laboratório um lugar de companheirismo e amizade.

À professora Sílvia Guterres, pelo apoio, pelas referências bibliográficas e a quitina.

Ao Ruy Beck pela determinação do grau de hidratação do fosfolipídio.

À professora Clara pelo fornecimento de referências bibliográficas importantes.

Ao professor Edilson pelo auxílio nas medidas de infra-vermelho.

Ao professor Valentim pelos espectros de RMN do ^{31}P do fosfolipídio.

Aos funcionários Joyce, Régis, Carla e Elga, pelos auxílios e sempre boa disposição.

Aos Fabianos Vargas e Rodembusch, pelos auxílios nas minhas primeiras investidas no uso do computador e por me ensinarem a trabalhar com o programa CONTIN, ainda na iniciação científica.

À Capes pela bolsa, à Solae do Brasil S.A. pelas amostras, ao LNLS pelas medidas de SAXS e à Rede de Nanobiotecnologia pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio nessa minha longa jornada de estudante.

Ao Alexandre, pela amizade e convivência.

À Clarice, pelas horas de conversa que me ajudaram a crescer e a ver a vida de outra forma.

Ao Jorge, pela amizade incondicional e por representar a nobreza da honestidade e os bons sentimentos deste mundo.

Índice Geral

1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica: lipossomas	3
2.1. Descoberta e estruturação	3
2.2. Carreador e vetorizador	4
2.3. Composição fundamental	5
2.4. Tipos de lipossomas	6
2.5. Métodos de preparação de lipossomas	8
2.6. Conservação de lipossomas	10
2.7. Lipossomas comerciais	11
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Materiais	15
4.1. Fosfatidilcolina	15
4.2. Quitosana	16
5. Métodos	19
5.1. Purificação da fosfatidilcolina e caracterização do grau de pureza	19
5.2. Quitosana	19
5.2.1. Obtenção	19
5.2.2. Caracterização da massa molar média por espalhamento de luz	20
5.2.3. Determinação do grau de desacetilação	22
5.3. Nanovesículas lipossômicas	23
5.3.1. Preparação	23
5.3.2. Caracterização	25
5.3.2.1. Viscosimetria	25
5.3.2.2. Turbidimetria e ultra-violeta visível	26
5.3.2.3. Espalhamento de luz	26
5.3.2.4. Testes de estabilidade	27
5.3.2.5. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo	28

6. Resultados e discussão	30
6.1. Purificação da fosfatidilcolina e caracterização do grau de pureza	30
6.2. Quitosana.....	33
6.3. Acetato de etila como solvente orgânico.....	36
6.4. Viscosimetria, turbidimetria e ultra violeta-visível das micelas reversas	37
6.5. Variação do raio hidrodinâmico das micelas reversas	42
6.6. Hipótese para o comportamento do sistema com quitosana	44
6.7. Caracterização das vesículas lipossômicas por espalhamento de luz	46
6.8. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	48
6.9. Estudo da estabilidade.....	53
7. Conclusões	56
8. Bibliografia	58

Índice de Figuras

Figura 4.1: Estruturas moleculares de fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina.	15
Figura 4.2: Estruturas moleculares de quitina e quitosana.	17
Figura 5.1: Esquema para o processo de preparação de vesículas lipossômicas pela evaporação em fase reversa.	24
Figura 6.1: Representação para CCD de lecitina de soja bruta, fosfatidilcolina purificada, fosfatidilcolina fornecida pela indústria e fosfatidilcolina purificada após sete dias.	30
Figura 6.2: Espectros de RMN do ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, ppm, padrão interno TMS) da fosfatidilcolina pura (Solae do Brasil S. A.) e purificada no laboratório.	31
Figura 6.3: Espectro de RMN do ^{31}P (CDCl_3 , 80 MHz, ppm, padrão externo trifetilfosfato) da fosfatidilcolina purificada no laboratório.	32
Figura 6.4: Espectro de IV (pastilha KBr) para quitina comercial (Delaware).....	33
Figura 6.5: Espectro de IV (pastilha KBr) para a quitosana hidrolisada.	34
Figura 6.6: Gráfico de Zimm para quitosana em solução tampão.....	35
Figura 6.7: Viscosidade de MR sem quitosana em função da adição de água a $20,0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ$ e viscosidade de MR com quitosana em função da adição de solução aquosa de quitosana $0,1\text{ mg/mL}$ a $19,5\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ$	38
Figura 6.8: Variação da intensidade de luz espalhada para MR sem quitosana e com quitosana.	40
Figura 6.9: Variação da absorvância em UV-visível para MR sem quitosana e com quitosana.	41

Figura 6.10: Variação do R_h para MR sem quitosana e com quitosana.	43
Figura 6.11: Esquema para hipótese do comportamento do sistema com quitosana.	46
Figura 6.12: Representação externa e interna de LFCQ e LFC.....	48
Figura 6.13: Espectros de SAXS para o organogel de fosfatidilcolina com e sem quitosana.....	49
Figura 6.14: Espectros de SAXS para vesículas lipossômicas.....	50
Figura 6.15: Espectros de SAXS para LFC e LFCQF. As curvas correspondem ao ajuste com uma função Lorentziana.	51
Figura 6.16: Variação do R_h em função do tempo após a preparação para as amostras de nanovesículas estudadas.....	55

Índice de Tabelas

Tabela I: Relação de pureza da lecitina (RMN do ^1H).....	31
Tabela II: Raios hidrodinâmicos aparentes a 90° para diferentes concentrações de quitosana.....	35
Tabela III: Dimensão das vesículas lipossômicas preparadas com diferentes solventes.....	37
Tabela IV: Dependência angular para MR (200 μL de água) preparadas em acetato de etila.....	42
Tabela V: Parâmetros para vesículas lipossômicas com quitosana (LFCQ) e sem quitosana (LFC).....	47
Tabela VI: Parâmetros obtidos através do ajuste matemático das curvas de SAXS, de acordo com a Figura 6.15.....	52
Tabela VII: Vetor de onda q e espessura da lamela d para as amostras estudadas, obtidos por SAXS.....	53
Tabela VIII: Variação do pH após a preparação para as amostras de nanovesículas estudadas.....	54

Principais Símbolos Utilizados

MLV: vesículas multilamelares

OLV: vesículas oligolamelares

LUV: vesículas unilamelares grandes

SUV: vesículas unilamelares pequenas

GUV: vesículas unilamelares gigantes

GOV: vesículas oligolamelares gigantes

MPS: sistema fagocítico mononuclear

PEG: poli(etilenoglicol)

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

RMN: ressonância magnética nuclear

UV-vis: ultravioleta visível

SAXS: espalhamento de raios-X a baixo ângulo

MR: micelas reversas

M: massa molar

ρ : densidade

GD: grau de desacetilação

TMS: tetrametilsilano

M_w : massa molar média

SLS: espalhamento de luz estático

q : vetor de onda

θ : ângulo de medida de luz espalhada em relação ao feixe de luz incidente

λ_o : comprimento de onda do feixe de luz incidente

n_o : índice de refração do solvente

K : constante óptica

$\delta n / \delta c$: incremento do índice de refração

c : concentração

R_0 : razão de Rayleigh

k : constante arbitrária

A_2 : segundo coeficiente virial

R_g : raio de giro

R_h : raio hidrodinâmico

IV: infravermelho

δ : deslocamento químico

LFC: vesículas lipossômicas de fosfatidilcolina

LFCQ: vesículas lipossômicas de fosfatidilcolina com quitosana

LFCQA: LFCQ preparadas com solução 0,1 mg/mL de quitosana

LFCQE: LFCQ preparadas com solução 0,5 mg/mL de quitosana

LFCQF: LFCQ preparadas com solução 1,0 mg/mL de quitosana

η_o : viscosidade relativa

t : tempo

DLS: espalhamento de luz dinâmico

Γ : distribuição de frequências

$G(t)$: função de correlação temporal

D_T : coeficiente de difusão translacional

D_o : coeficiente de difusão a diluição infinita

D_c : coeficiente de difusão dependente da concentração

k_D : coeficiente virial de difusão

k_B : constante de Boltzmann

T : temperatura

$d_s(\theta)$: dissimetria angular

$I(\theta)$: intensidade de luz espalhada em função do ângulo

n : número inteiro

d : separação entre dois planos espalhantes ou espessura da lamela

$I(q)$: intensidade de luz espalhada em função do vetor de onda

c^* : concentração crítica

N_A : número de Avogadro

I : intensidade de luz espalhada

Resumo

Nanovesículas lipossômicas constituem promissoras estruturas auto-organizadas hábeis para encapsular e transportar diferentes substâncias, como os fármacos, e foram produzidas neste trabalho pelo método da evaporação em fase reversa.

Fosfatidilcolina de alta pureza foi utilizada na produção das estruturas. Paralelamente procedeu-se a purificação de fosfatidilcolina por cromatografia em coluna a partir da lecitina de soja fornecida pela indústria de óleo de soja local. O processo foi monitorado por cromatografia em camada delgada e a caracterização foi feita por RMN do ^1H e do ^{31}P . O resultado mostrou que fosfatidilcolina pode ser purificada facilmente pela cromatografia em coluna, mas a sua degradação deve ser evitada por processos eficientes de conservação.

Quitosana foi obtida pela desacetilação por hidrólise alcalina da quitina comercial. O grau de desacetilação resultante foi caracterizado por infra-vermelho e a massa molar média, assim como outros parâmetros do polímero em solução como raio de giro e segundo coeficiente virial, foram determinados pela técnica de espalhamento de luz estático. O polímero de caráter catiônico quitosana foi empregado na produção de nanovesículas lipossômicas para revestimento das estruturas, visando o aumento da estabilidade física das mesmas.

A preparação de lipossomas pela evaporação em fase reversa constitui um processo em etapas, onde os diferentes estágios levam à formação de três sistemas vesiculares de distintas organizações estruturais: micelas reversas, organogel e lipossomas. As técnicas de viscosimetria, turbidimetria, ultra-violeta visível, espalhamento de luz estático e dinâmico e espalhamento de raios-X a baixo ângulo permitiram ampla caracterização destas estruturas com e sem quitosana. Dados como raio hidrodinâmico e ponto de percolação das micelas reversas, espessura lamelar do organogel, intensidade de espalhamento de luz, raio hidrodinâmico, raio de giro e espessura lamelar dos lipossomas foram obtidos.

Além disso, o solvente orgânico éter etílico, clássico para este método de preparação foi substituído pelo acetato de etila sem prejuízo na formação das estruturas e com a vantagem do seu menor impacto ambiental.

Lipossomas revestidos externa e internamente com quitosana formando um compósito foram obtidos com sucesso e apresentaram uma estabilidade física em solução aquosa maior do que lipossomas convencionais ou não revestidos.

Abstract

Liposomal nanovesicles perform promising self-organised structures able to encapsulate and transport different substances, like drugs, and were produced in this work through the reverse phase evaporation method.

Phosphatidylcholine of high purity was used on the production of the structures. Simultaneously, the phosphatidylcholine purification was carried out from soy lecithin furnished by the local industry of soy oil through chromatographic column. The process was monitored with thin layer chromatography and the characterisation was held through NMR of ^1H and ^{31}P . The result showed that phosphatidylcholine may easily be purified by the column chromatography, however, its degradation must be avoided with efficient conservation processes.

Chitosan was obtained on deacetylation of commercial chitin using alkaline hydrolysis. The degree of deacetylation was characterised by infra-red and the average molecular weight, as well as other parameters of the polymer in solution, like radius of gyration and second virial coefficient, were determined through the static light scattering technique. The cationic polymer chitosan was employed on the liposomal nanovesicles production for coating of the structures, aiming its physical stability improvement.

The liposomes preparation through reverse phase evaporation method represents a stepping process, where the different stages lead to the formation of three vesicular systems of distinguished structural organisations: reverse micelles, organogel and liposomes. Techniques of viscometry, turbidimetry, ultra-violet visible, static and dynamic light scattering and small angle X-ray scattering allowed large characterisation of this structures with and without chitosan. Data like hydrodynamic radius and percolation threshold of the reverse micelles, lamellar thickness of the organogel, light scattering intensity, hydrodynamic radius, radius of gyration and lamellar thickness of liposomes were obtained.

Moreover, the organic solvent ethyl ether, classical in this preparation method, was substituted by ethyl acetate with no backwards on the structures formation and with the advantage of its lower environmental impact.

Liposomes coated internally and externally with chitosan providing a composite, were successfully obtained and showed a higher aqueous physical stability than conventional or not coated liposomes.

1. Introdução

Vesículas lipossômicas, ou lipossomas, são estruturas coloidais constituídas de um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas. De acordo com os seu tamanho, formato, morfologia e características físico-químicas, estas estruturas que possuem a capacidade de encapsulamento de compostos hidrofílicos no seu núcleo aquoso e compostos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas,¹ oferecem larga aplicação em diversas áreas.^{2,3}

Atualmente há um grande interesse das ciências farmacêuticas e biomédicas nos carreadores de fármacos nanométricos ou micrométricos, de estabilidade relativa, biodegradáveis e biocompatíveis, capazes de encapsular fármacos. A utilização destas estruturas visa a aplicação dos fármacos por vias oral, transdérmica e parenteral com liberação controlada, diretamente na região de ação esperada, reduzindo assim os efeitos colaterais dos medicamentos e aumentando a eficiência dos tratamentos desde doenças oculares⁴ até quimioterapia.⁵

Lipossomas oferecem a vantagem de mimetizar membranas biológicas⁶ e possibilitarem alteração estrutural, o que permite a modificação de suas características físico-químicas, ao contrário das nanopartículas onde, ao invés de lipídios, temos polímeros formando o corpo das estruturas. Embora muitos autores tenham relatado nanopartículas como sistemas mais eficientes do que vesículas lipossômicas,⁷ deve-se considerar o objetivo da utilização de um ou outro carreador.

Para a estabilização das membranas de lipossomas visando uma ação eficiente em diferentes ambientes e para aumentar o tempo de retenção dos materiais encapsulados, bem como o tempo de meia vida (ou permanência) destas substâncias no meio de aplicação, muitas modificações têm sido propostas. A modificação da superfície das vesículas lipossômicas através do revestimento com polímeros como poli(etilenoglicol)¹ ou copolímeros em bloco^{8,9} está bem estabelecida. Nos últimos anos, a utilização de produtos naturais e alternativos tem recebido crescente interesse em todas as áreas de pesquisa. O conhecimento da existência de polissacarídeos nas superfícies celulares deu origem ao estudo das interações entre lipossomas e diferentes grupos de polissacarídeos.¹⁰ Assim, o polissacarídeo catiônico quitosana foi descoberto como um bom candidato para estabilização e modificação do potencial superficial de lipossomas^{11,12} onde a fosfatidilcolina é o principal lipídio que estrutura a membrana.

A quitosana é derivada da quitina, encontrada na carapaça de crustáceos e insetos ou nas paredes celulares de fungos.¹³ A quitosana é obtida pela parcial ou total desacetilação da quitina, fornecendo um polímero amino-substituído solúvel em soluções aquosas ácidas. Como a quitosana forma um sal em solução ácida, produzindo cadeias polieletrólitas com cargas positivas nos átomos de nitrogênio dos grupos amino,¹⁴ suas interações com as regiões polares dos lipossomas são favorecidas levando à sua deposição nos mesmos.

O desenvolvimento de vesículas lipossômicas nanométricas modificadas, na forma de compósitos, utilizando-se fosfatidilcolina da lecitina de soja e o polímero natural quitosana, conforme proposto neste estudo, reveste-se portanto de relevância científica e tecnológica.

Por outro lado, a caracterização físico-química de cada etapa na preparação das nanovesículas lipossômicas compósitas abre novas possibilidades para uma melhor compreensão sobre o arranjo molecular nestas estruturas, bem como possibilita a criação de novas nanoestruturas, com organização molecular conhecida.

2. Revisão bibliográfica: lipossomas

2.1. Descoberta e estruturação

O lipossoma constitui uma estrutura esférica cuja tensão superficial é nula.¹⁵ É formado por uma ou mais bicamadas de lipídios, as lamelas, que constituem a configuração de menor energia livre para muitos fosfolipídios. À semelhança das membranas celulares, os lipossomas também constituem um importante componente das membranas celulares, encapsulando e isolando fluídos intracelulares contendo proteínas específicas e outras macromoléculas.¹⁶

Os lipossomas foram produzidos artificialmente por acaso num trabalho de Alec Bangham e colaboradores publicado em 1965 onde foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas, que mais tarde foram denominadas lipossomas. No entanto, estas estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolipídios já eram conhecidas na época como "figuras de mielina". Após o trabalho de Bangham, os lipossomas estabeleceram-se como sistemas modelo para estudo das membranas biológicas¹⁷ e simulação de interações intercelulares ou interações entre células e o meio extracelular.^{6,18} Também houve sucesso na incorporação de enzimas e o crescente interesse na sua aplicação médica e farmacológica levou Gregory Gregoriadis a propor o uso de lipossomas como sistema carreador de fármacos em 1971.¹⁷ Desde então, muitos pesquisadores, como Demetrius Papahadjopoulos, fundador científico da *Liposome Technology* nos EUA, têm dedicado seus esforços no desenvolvimento de lipossomas carreadores, desde a produção de matérias-primas e métodos de preparação de lipossomas, até estudos *in vitro* e *in vivo* e mais recentemente os estudos clínicos. Centros de pesquisa como o *Liposome Research Laboratory*, no *California Pacific Medical Center Research Institute*, fundado em 1967 por Papahadjopoulos, têm-se estabelecido produzindo perspectivas promissoras e atingindo resultados de alto interesse científico, tecnológico e industrial.

2.2. Carreador e vetorizador

Nos últimos anos, os lipossomas têm obtido aplicação como sistemas carreadores de fármacos devido à sua capacidade de reter substâncias hidrofílicas no seu núcleo aquoso e substâncias hidrofóbicas entre as lamelas.⁵

Quando um fármaco é administrado no paciente através de formas farmacêuticas convencionais, o seu volume de distribuição é normalmente elevado, ou seja, o fármaco é distribuído para diversas áreas do corpo, atingindo além do ponto onde deve atuar, órgãos sadios onde muitas vezes ele pode agir como uma substância tóxica produzindo os efeitos colaterais. O alto volume de distribuição requer o uso de doses mais altas de fármacos do que seriam necessárias para o tratamento da enfermidade. Num sistema ideal, o fármaco seria liberado de forma controlada somente no local onde a sua ação é esperada, assim não haveria perdas nem efeitos colaterais e os tratamentos teriam a eficácia maximizada. Este tipo de sistema é chamado vetorização de fármacos. O uso de lipossomas para vetorização de fármacos tem mostrado excelentes resultados principalmente na vetorização de anti-cancerígenos,¹⁹ considerando que seu alto custo de produção requer justificativas terapêuticas importantes.

Em condições ideais, o fármaco é transportado pelo lipossoma que o protege da ação do metabolismo e conseqüente inativação no plasma (em administração intravenosa) ou no suco gástrico (em administração oral). Ao contrário das moléculas de fármaco que são absorvidas também pelos tecidos sadios, os lipossomas, quando suficientemente estabilizados, não acumulam nesses tecidos, devido ao fato dos últimos possuírem endotélio contínuo que não permite que estruturas coloidais como os lipossomas atravessem a parede celular. Já em locais onde existem enfermidades como em tumores sólidos, regiões de inflamação e hipertermia, o endotélio é descontínuo apresentando poros maiores que podem variar entre 100 e 800 nm, os quais permitem a entrada de lipossomas com tamanhos nanométricos e o seu acúmulo no ponto de ação esperada do fármaco, o qual é liberado lentamente à medida que as lamelas dos lipossomas são desestruturadas.²⁰

Desta forma, o lipossoma concorre para a otimização de tratamentos, evitando os efeitos colaterais e a perda de fármaco.

2.3. Composição fundamental

Os lipídios que constituem as lamelas dos lipossomas são moléculas anfífilas, ou seja, formadas por uma ou duas longas cadeias apolares ligadas a uma extremidade polar. O efeito hidrofóbico exercido nas cadeias apolares, quando estas entram em contato com água ou outro meio polar, é a força que direciona a estruturação das bicamadas de lipídios. As cadeias apolares interagem entre elas, enquanto que as extremidades polares fazem a interface com o meio polar. Esta agregação em bicamadas, portanto, constitui a configuração de menor energia livre. Apesar disso, lipossomas não estão em equilíbrio termodinâmico, devido à curvatura inerente à forma esférica. Isso lhes confere uma estabilidade relativa, que irá depender da sua composição e do meio em que se encontram.¹⁵

As lamelas de lipossomas podem ser formadas por um único lipídio ou por uma mistura de lipídios. Normalmente os fosfolipídios como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina (neutros), fosfatidilserina e fosfatidilglicerol (carga -1) são os principais lipídios utilizados na produção de lipossomas carreadores de fármacos, já que constituem moléculas biocompatíveis e biodegradáveis.¹⁵

As proporções de cada fosfolipídio em uma mistura são variadas de acordo com as características físico-químicas pretendidas para o lipossoma. Misturas de fosfolipídios neutros com fosfolipídios carregados negativamente ou positivamente (10 - 20% mol/mol) diminuem a auto-agregação das estruturas.²¹ Outros componentes podem entrar na formulação visando a modificação de determinadas características ou o aumento da estabilidade relativa dos lipossomas. Bastante comum é o uso do colesterol que numa proporção de 30% (mol/mol) demonstrou aumentar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* de lipossomas.²² Agentes anti-oxidantes como o α -tocoferol, butilidroxitolueno, butilidroxianisol são utilizados para reduzir a oxidação das ligações insaturadas dos fosfolipídios.¹⁵

O meio polar em que os lipossomas são produzidos normalmente é água ou solução aquosa tamponada a pH = 7,4.¹⁵

2.4. Tipos de lipossomas

Convencionalmente lipossomas são definidos de acordo com o seu tamanho e o fato da sua estrutura ser formada por uma única lamela ou por mais de uma. Lipossomas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicles*), também chamados de oligolamelares (OLV - *oligolamellar vesicles*), possuem um diâmetro médio que varia geralmente de 400 nm a alguns micrômetros. Lipossomas unilamelares são definidos em dois grupos: lipossomas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*) com diâmetros entre 80 nm e 1 μm e lipossomas unilamelares pequenos (SUV - *small unilamellar vesicles*) com diâmetros variando entre 20 e 80 nm. Também existem os lipossomas gigantes unilamelares (GUV - *giant unilamellar vesicles*) ou oligolamelares (GOV - *giant oligolamellar vesicles*) com diâmetros superiores a 1 μm , podendo chegar a dezenas de micrômetros.^{15,17}

Com o desenvolvimento de novos materiais, os lipossomas têm sido modificados para satisfazer condições específicas de uso. Quando administrados *in vivo* de forma parenteral (geralmente intravenosa) possuem a tendência de acumular nos macrófagos, células do sistema fagocitário mononuclear (MPS - *macrophages*), que são responsáveis pela captação e transporte até o fígado e o baço para eliminação de qualquer substância estranha na corrente sanguínea.²⁰ Este fato deve ser considerado na escolha do lipossoma carreador a ser produzido para um determinado objetivo. Assim, atualmente lipossomas também podem ser divididos de acordo com sua composição e aplicação.

a. Lipossomas convencionais:^{19,23} com lamelas de fosfolipídios contendo ou não colesterol, podem ter grandes variações de propriedades físico-químicas, porém são caracterizados por possuírem um curto tempo de circulação na corrente sanguínea e por isso utilizados como carreadores de antimicrobianos e antifúngicos para tratamento de infecções do MPS, de imunomoduladores para aumento da capacidade de retenção de células neoplásticas do MPS, elevando a resistência contra infecções por microorganismos e ainda de antígenos para vacinas explorando a capacidade do MPS de agir como células antígenas.

b. Lipossomas de longa-circulação:^{2,17,19,20,24} as lamelas de lipossomas contêm fosfolipídios e glicolipídios conjugados com poli(etilenoglicol) (PEG); são conhecidos como "*stealth*" ou lipossomas furtivos ou ainda lipossomas estericamente estabilizados; as cadeias hidratadas de PEG criam uma barreira contra as interações com componentes moleculares e

celulares do meio biológico. Desta forma estes lipossomas não são reconhecidos pelo MPS, o que aumenta a sua permanência na circulação sanguínea (com tempo de meia vida em humanos em torno de 48 h). Estão sendo desenvolvidos principalmente como carreadores de fármacos anti-cancerígenos e anti-inflamatórios já que o período maior de circulação permite que atinjam áreas onde a permeabilidade da parede vascular foi aumentada, o que corresponde às regiões patológicas afetadas por tumores sólidos e áreas de infecção e inflamação.

c. Lipossomas direcionados ou imunolipossomas:^{20,25,26} possuem ligantes na superfície externa, geralmente anticorpos, que interagem com células de tecidos específicos, que possuem o antígeno complementar; também têm sido revestidos com PEG para aumentar o seu tempo de meia vida; estão sendo estudados na vetorização de fármacos a tumores e ao sistema cardiovascular.

d. Lipossomas fusogênicos:²⁷ compostos de lipídios catiônicos ou sensíveis ao pH do meio; a descoberta de que lipídios catiônicos podem condensar DNA e aumentar a transfecção de genes, estimulou alto interesse nestas estruturas como carreadores intracelulares de gens para tratamento de câncer e doenças cardiovasculares.

e. Lipossomas polimerizados:²⁸ compostos de fosfolipídios insaturados que podem ser polimerizados por irradiação de luz ou que incorporam grupos específicos nas moléculas lipídicas capazes de polimerizar em diferentes regiões da estrutura o que lhes confere uma estabilidade maior em meios mais agressivos como o gastrointestinal, sendo assim pesquisados como carreadores para administração oral.

f. Magnetolipossomas:²⁹ o núcleo aquoso possui um ferrofluido coloidal e desta forma estas estruturas podem ser orientadas a pontos específicos pela ação de um campo magnético.

g. Lipossomas elásticos:^{30,31} são compostos de fosfolipídios e surfactantes que aumentam a elasticidade da lamela produzindo vesículas capazes de sofrer deformações sem serem desestruturadas; são adequados para administração transdérmica e podem penetrar em camadas mais profundas da pele.

h. Quitossomas:^{10,32} são lipossomas revestidos com o polímero quitosana que é um polissacarídeo linear com alta densidade de carga positiva que lhes confere uma estabilidade maior.

2.5. Métodos de preparação de lipossomas

Os métodos de preparação de lipossomas são inúmeros e levam à formação de diferentes tipos de vesículas em relação ao seu tamanho, sua estruturação, capacidade de encapsulamento e tempo de retenção de substâncias, número de lamelas, etc. A maioria dos métodos de preparação segue as seguintes etapas fundamentais:¹⁵

- dissolução dos lipídios num solvente orgânico;
- eliminação do solvente orgânico em evaporador rotatório;
- dispersão dos lipídios secos numa solução aquosa;
- dissolução da substância a encapsular na solução orgânica (na primeira etapa) ou na solução aquosa de acordo com o seu caráter hidrofóbico ou hidrofílico;
- eliminação das substâncias não encapsuladas por uma técnica de separação (filtração, diálise ou centrifugação).

Cada técnica difere geralmente na etapa de dispersão dos lipídios na fase aquosa. A seguir são descritos alguns dos métodos de preparação de lipossomas mais difundidos.¹⁵ Muitos processos de preparação encontrados na literatura atual são variantes, modificações ou aperfeiçoamentos destes processos. Nenhum método é perfeito, todos possuem vantagens e desvantagens e as condições de produção e o objetivo final devem ser considerados na hora da escolha do método a ser utilizado.

a. Método da hidratação do filme fosfolipídico: foi descrito em 1965 por Bangham e colaboradores e consiste na adição da solução aquosa ao filme fosfolipídico obtido após a evaporação do solvente orgânico; a dispersão dos fosfolipídios é facilitada por ultra-agitação e uso de esferas de vidro; com o contato com a solução aquosa sob agitação, o filme de fosfolipídios desprende da superfície do balão sob forma de vesículas com diâmetros elevados e multilamelares (MLV); é um método simples e rápido, mas possui baixa taxa de encapsulamento e é pouco adequado à produção industrial.

b. Uso de ultrassom: com o objetivo de reduzir os diâmetros de lipossomas obtidos pelo método da hidratação, a suspensão de lipossomas é submetida à ação de ultra-som obtendo-se SUV; foi descrito por Saunders em 1962; apesar de produzir vesículas menores e mais homogêneas, possui as mesmas desvantagens do método precedente; além disso, reações químicas podem ocorrer, como por exemplo quebra das cadeias pela ação do ultra-som.

c. Extrusão: também reduz o diâmetro de MLV; a extrusão pode ser exercida várias vezes sob pressão e uso de filtros de diversas porosidades decrescentes; um método com uso de membranas de policarbonato foi descrito por Olson e colaboradores em 1979.

d. Microfluidização: a suspensão de MLV passa através de uma bomba sob pressão (10000 psi), por um filtro (5 μ m de porosidade) e em seguida por um compartimento de interação onde é submetida a ultra-agitação; os choques entre as partículas provoca ruptura das vesículas grandes, que se reconstituem em vesículas pequenas de tamanhos homogêneos; após duas ou três repetições do processo, MLV têm seu diâmetro reduzido a 100-200 nm e após dez repetições o diâmetro decresce a menos de 100 nm; o processo também aumenta a taxa de encapsulamento.

e. Injeção de etanol: os lipídios são dissolvidos em etanol e em seguida a solução é injetada numa solução aquosa sob agitação; os diâmetros de SUV obtidos irão depender da velocidade de agitação e de injeção e também da concentração de lipídios no etanol; após, o etanol pode ser eliminado por diálise ou através de filtração por gel de Sephadex G50 em cromatografia por exclusão-difusão; é um método simples e rápido e adequado à produção industrial; seu inconveniente é a baixa taxa de encapsulamento.

f. Evaporação em fase reversa: introduzido por Szoka e Papahadjopoulos em 1978, neste método os fosfolipídios são dissolvidos num solvente orgânico, uma solução aquosa é adicionada formando duas fases não miscíveis; a extremidade polar dos fosfolipídios é atraída pela fase aquosa e assim estes se depositam sob a interface fase orgânica / fase aquosa; o sistema é submetido ao ultra-som e uma emulsão água / óleo é formada onde os fosfolipídios estruturam micelas reversas com núcleo aquoso no solvente orgânico; em seguida a emulsão é submetida a evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório; as micelas reversas concentram e com a evaporação do solvente suas membranas rompem formando um gel líquido cristalino; sob alta agitação e adição de solução aquosa os lipossomas são formados pela auto-associação dos fosfolipídios em duplas camadas; este método é caracterizado pela produção de LUV onde o grande núcleo aquoso pode encapsular altas proporções de substâncias hidrofílicas, embora seja pouco adequado à produção industrial devido às várias etapas.

g. Dispersão de micelas mistas: os lipídios são solubilizados em meio aquoso com auxílio de detergente ou tensoativo como Tween 20®, Triton® ou colato de sódio; são formadas micelas mistas e em seguida o detergente é eliminado por diálise ou filtração; as micelas lipídicas

coalescem e formam vesículas unilamelares (SUV ou LUV); o processo é demorado em todas as etapas e geralmente a taxa de encapsulamento é baixa.

h. Liofilização-reidratação: SUV em solução previamente formados são misturados com a substância a ser encapsulada e esta mistura é liofilizada e em seguida novamente reconstituída pela adição de solução aquosa; produz MLV de tamanhos heterogêneos, mas com altas taxas de encapsulamento.

Em processos onde a taxa de encapsulamento é baixa pode-se lançar mão de estratégias para aumentar a quantidade de material encapsulado. Uma destas estratégias é o encapsulamento ativo que consiste na introdução das substâncias a encapsular nos lipossomas pré-formados através da difusão do exterior para o interior das estruturas. Isto pode ser procedido por gradiente de pH onde, por exemplo, o pH no interior da estrutura é ácido, enquanto que no meio externo o pH é neutro, assim substâncias básicas a encapsular podem ser adicionadas no meio externo e estas irão difundir para o interior dos lipossomas atraídas pela força iônica. Esta técnica permite o controle da taxa de encapsulamento desejada para diferentes substâncias e pode atingir até 90% do teor adicionado.

2.6. Conservação de lipossomas

A estabilização de lipossomas após a sua preparação tem sido objeto de muita pesquisa, sendo que principalmente lipossomas convencionais possuem estabilidade muito baixa em solução aquosa.^{33,34} As instabilidades podem ter origem química ou física e algumas precauções podem evitá-las.

A oxidação e hidrólise dos lipídios pode ser evitada com uso de agentes conservantes como relatado anteriormente. A conservação à temperatura baixa (em torno de 4 °C) e sob atmosfera de argônio em frascos âmbar também auxilia na diminuição deste tipo de degradação.¹⁵

A agregação de lipossomas ocorre mais freqüentemente para as estruturas maiores devido às interações de van der Waals que dependem da superfície de contato. Este processo é inevitável para estruturas não carregadas, por isso o uso de lipídios carregados na formulação dos lipossomas é uma alternativa para a redução deste fenômeno.¹⁹

A retenção de material encapsulado também deve ser considerada. Variações ocorrem segundo a natureza dos lipossomas (normalmente quanto maior a estrutura maior o tempo de retenção - MLV > LUV > SUV), a temperatura de conservação (4 °C > 25 °C > 37 °C), a composição das lamelas e as propriedades físico-químicas dos produtos encapsulados. Moléculas lipofílicas de alto peso molecular e moléculas hidrofílicas ionizadas são melhor retidas.¹⁵

A liofilização vem sendo estudada para conservação de lipossomas por períodos mais longos. As estruturas secas são suspensas novamente em solução somente na hora do seu uso, assim a degradação em solução é evitada. As desvantagens deste processo são a baixa recuperação de lipossomas com a mesma distribuição de tamanhos e porcentagem de material encapsulado apresentada antes da liofilização. Para diminuição destas perdas, a adição de substâncias crioprotetoras nas formulações, para proceder a liofilização, tem sido proposta.^{15,19}

A presença de PEG ou outros polímeros como quitosana na superfície de lipossomas também fornece uma barreira estérica que previne agregação. Lipossomas revestidos com PEG são estáveis em relação a tamanhos e quantidade de material encapsulado por períodos que podem variar de meses até anos quando mantidos à baixa temperatura.¹⁹

2.7. Lipossomas comerciais

Os lipossomas são um caso flagrante de um sistema que teve uma passagem muito rápida do campo da investigação para a aplicação comercial, principalmente na área da indústria cosmética, sem que as suas propriedades e eficácia tenham sido completamente estudadas.¹⁷

Apesar da grande quantidade de material bibliográfico presente na literatura, até o presente poucas estruturas lipossômicas carreadoras de fármacos têm sido suficientemente desenvolvidas para uso clínico. Dentre as aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), destacam-se formulações de antraciclina antitumorais como a daunorubicina e doxorubicina. A seguir, são descritos alguns dos fármacos lipossomados com desempenho aprovado, atualmente disponíveis no mercado para tratamento clínico das enfermidades relacionadas.

Daunoxome® - forma lipossomada do agente anti-cancerígeno citrato de daunorubicina usado para tratamento quimioterápico do sarcoma de Kaposi principalmente em pacientes imunologicamente enfraquecidos como portadores do vírus HIV. Solução de daunorubicina é encapsulada em SUV com lamelas de diasteroilfosfatidilcolina e colesterol (2:1). O principal

efeito colateral da daunorubicina é a sua alta cardiotoxicidade, que pode persistir por anos após o tratamento. Daunoxome® não apresentou manifestações clínicas de cardiotoxicidade mesmo quando administrado em altas doses,³⁵ mostrando que o lipossoma age como eficiente redutor de efeitos colaterais neste caso.

Doxil® (EUA); Caelyx™ (Europa) - formulação lipossomada do agente anti-cancerígeno doxorubicina também utilizado no tratamento do sarcoma de Kaposi e câncer ovariano. A doxorubicina é encapsulada em lipossomas de longa circulação "Stealth®" de 100 nm de diâmetro (compostos de fosfatidilcolina, colesterol e poli(etilenoglicol) diasterofosfatidiletanolamina) e desta forma obtém-se a redução dos seus efeitos colaterais (cardiotoxicidade, alopecia, náusea e vômito) com a manutenção da eficiência dos tratamentos.²⁴

AmBisome™ - formulação lipossomada intravenosa da anfotericina B, utilizada no tratamento de infecções causadas por várias espécies de fungos. O fármaco é encapsulado em lipossomas unilamelares com diâmetros menores de 100 nm constituídos de fosfatidilcolina, colesterol e difosfatidilglicerol (10:5:4). Efeitos colaterais da anfotericina B como febre, resfriado, disfunções hepáticas e renais não foram constatados em estudo com AmBisome™.³⁶

Além destes lipossomas aprovados pelo FDA, outras formulações estão sob avaliação. Doxil® já possui um candidato alternativo chamado Myocet™, onde os lipossomas apresentam 160 nm de diâmetro contra os 100 nm do precedente, o que leva a um tempo menor de meia-vida e reduz o acúmulo em regiões subcutâneas sob pressão (palmas dos pés e mãos) onde o fármaco pode exercer efeitos colaterais.²⁴

Alcalóides extraídos do gênero *Vinca* como a vincristina, vinblastina e vinorelbina também encontram-se sob triagem clínica para aprovação do seu uso comercial em lipossomas. Alguns trabalhos têm escolhido fármacos anti-cancerígenos alternativos como paclitaxel (Taxol®), ara-C, metotrexano ou derivados da cisplatina, embora estudos toxicológicos pré-clínicos ainda apresentem dados limitados.¹⁹

Fármacos altamente hidrofóbicos associados dentro das lamelas dos lipossomas tendem a uma menor estabilidade de encapsulamento. Alternativamente lipossomas podem ser utilizados para estes fármacos como formulação para administração intravenosa, estratégia que já é colocada em prática com paclitaxel e também com fotosensibilizadores usados em terapias fotodinâmicas.¹⁹

Aplicações bastante amplas existem na área da cosmetologia. O mecanismo de ação de lipossomas no transporte de ativos hidratantes, nutrientes e outras substâncias através da pele está associado à composição epidérmica o que permite a fusão das vesículas nos espaços intercelulares da pele.¹¹ Em contrapartida, a permeabilidade da pele é muito baixa devido à alta organização das lamelas e ao efeito do material lipídico presente que age como "cola" fechando os espaços entre as células. Para atravessar estas barreiras, carreadores devem possuir diâmetros em torno de 30 nm ou menos. Mesmo com o alto interesse no uso de lipossomas também como carreadores transdérmicos, suas reais aplicações e possibilidades ainda permanecem sob estudo^{37,38} e há muita controvérsia a ser elucidada.³⁹ Os diâmetros de lipossomas normalmente maiores do que 30 nm não permitem que atinjam as camadas mais profundas da pele intacta. Lipossomas modificados, como os lipossomas elásticos e quitossomas, citados anteriormente, estão sendo desenvolvidos para transpor este obstáculo.

TransfersomesTM constituem vesículas ultradeformáveis capazes de transpor as barreiras da pele. Surfactantes como colato de sódio, Span 80 e Tween 80 entram na composição destes lipossomas altamente hidrofílicos que são atraídos pelas áreas da pele onde a porção aquosa é mais elevada, como nos pequenos espaços entre as células. Esta propriedade associada com a alta deformabilidade, permite que as estruturas atinjam tecidos subcutâneos da pele podendo chegar ao sistema linfático e em seguida à circulação sanguínea.^{30,38,39}

No caso de quitossomas, a presença da quitosana pode aumentar a compatibilidade das estruturas com a pele (devido ao poder catiônico deste polímero), resultando numa penetração mais eficiente dos agentes cosméticos.^{11,31}

Apesar das boas perspectivas, inúmeras formulações cosméticas comerciais, principalmente as que envolvem produtos anti-envelhecimento como ácido glicólico¹¹ e tretinoína,⁴⁰ já apresentam ou afirmam apresentar composição lipossomada sem que tenha sido comprovada a real eficácia dos lipossomas como carreadores das substâncias ativas. Tamanhos dos lipossomas, componentes indesejáveis dos processos de preparação (como solventes orgânicos), qualidade e pureza de matérias-primas são alguns fatores que podem não ser bem controlados em muitos produtos cosméticos. E embora a sua eficácia seja duvidosa, a aceitação comercial é facilitada, pois da mesma forma que a pele pode impedir a penetração dos lipossomas, ela também funciona como um revestimento protetor contra reações adversas que poderiam ser proporcionadas por estas substâncias.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Obtenção de vesículas lipossômicas nanométricas de fosfatidilcolina e de fosfatidilcolina revestidas com quitosana (compósitas) pelo processo de evaporação em fase reversa e a caracterização físico-química dos sistemas durante o processo de preparação, bem como das estruturas finais.

3.2. Objetivos específicos

- Purificação da fosfatidilcolina da lecitina de soja bruta fornecida pela indústria da soja (Solae do Brasil S.A.) por cromatografia em coluna (CC) e caracterização do grau de pureza por cromatografia em camada delgada (CCD) e RMN do ^1H e do ^{31}P .
- Obtenção e caracterização de quitosana a partir da quitina comercial.
- Substituição do solvente éter etílico pelo acetato de etila, no processo de preparação das vesículas lipossômicas, visando o emprego de um solvente com menor impacto ambiental.
- Combinação das técnicas de espalhamento de luz estático e dinâmico, viscosimetria, turbidimetria, medidas de absorvância em UV-visível e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) para a caracterização de cada etapa do processo de preparação das vesículas, incluindo a formação de micelas reversas (MR), ponto de percolação, fase gel e nanovesículas lipossômicas.
- Avaliação da estabilidade das nanovesículas lipossômicas com e sem quitosana (mantidas em solução aquosa e temperatura ambiente) através de medidas do raio hidrodinâmico e verificação do pH.

4. Materiais

4.1. Fosfatidilcolina

A pureza dos fosfolipídios utilizados na preparação de vesículas lipossômicas para aplicação farmacêutica deve ser superior a 99%.¹⁵ Essa exigência representa uma limitação tecnológica na produção de lipossoma em escala industrial, sendo que os processos de purificação do fosfolipídio encarecem muito o produto final.

A fosfatidilcolina é o fosfolipídio natural de $M = 780 \text{ g/mol}^{15}$ e $\rho = 0,95 \text{ g/cm}^3$ ⁴¹ mais utilizado na produção de lipossomas. Faz parte da composição molecular das membranas biológicas e também encontra-se presente no plasma sanguíneo como constituinte de lipoproteínas. É biocompatível, biodegradável e tem ação detergente. Sua estrutura (Figura 4.1a) é formada por duas longas cadeias hidrocarbônicas, uma saturada e outra insaturada, que constituem a porção hidrofóbica ou apolar da molécula. A porção hidrofílica ou polar é formada pelo glicerol, o grupo fosfato e a colina.

A fosfatidilcolina é um sólido amarelado, higroscópico e pouco estável. É facilmente decomposta em altas temperaturas e degradada pela ação do oxigênio quando exposta ao ar e à umidade por longos períodos. Seu principal produto de degradação é a lisofosfatidilcolina (Figura 4.1b), resultante da hidrólise da função éster no carbono de posição 1 ou 2 do glicerol, fornecendo uma molécula com apenas uma cadeia apolar.⁴² Sua presença aumenta consideravelmente a permeabilidade das membranas de lipossomas,¹⁵ diminuindo a capacidade de retenção de material encapsulado nos lipossomas. Além disso, possui relativa toxidez.⁴³

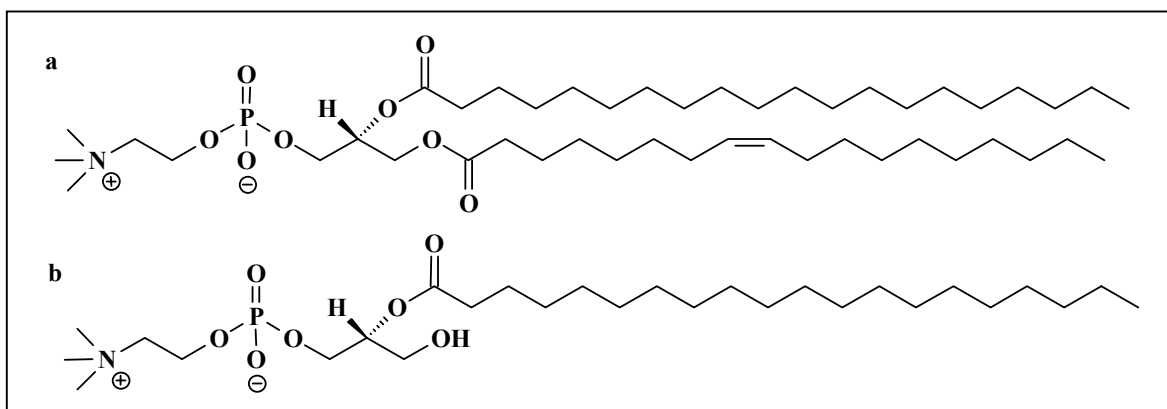


Figura 4.1: Estruturas moleculares de fosfatidilcolina (a) e lisofosfatidilcolina (b).

A fosfatidilcolina para produção de lipossomas vem sendo obtida a partir da gema de ovo assim como da lecitina de soja, sub-produto no processo de fabricação do óleo de soja. Estas duas matérias-primas são constituídas de uma mistura de um grande número de ácidos graxos, lipídios, proteínas, pigmentos e fosfolipídios de diferentes estruturas moleculares, com a fosfatidilcolina representando entre 10 e 20%. A purificação industrial e laboratorial é feita por cromatografia em coluna. Os processos mais acessíveis utilizam colunas de sílica⁴⁴ ou alumina⁴⁵ e misturas de clorofórmio:metanol como eluente. Vários métodos foram estudados, principalmente nas décadas de 50 e 60, que requerem colunas de alta capacidade, uso de pressão, atmosfera inerte, eluições muitas vezes demoradas, alto consumo de solventes e repetições do processo em mais de uma coluna para uma purificação eficiente. A substituição dos solventes de alta toxicidade também foi pesquisada, mas principalmente devido à baixa solubilidade dos fosfolipídios em solventes menos tóxicos como etanol e acetona, nenhum resultado satisfatório foi obtido. Um dos últimos trabalhos publicados data de 1982⁴⁶ onde os pesquisadores utilizam coluna de hidroxilapatita e várias misturas de acetona:metanol como eluente. Uma patente de 1988⁴⁷ descreve a utilização de coluna de sílica-gel desativada com metanol e uma mistura de clorofórmio:metanol:água como eluente para separar a fosfatidilcolina de outros fosfolipídios. Este eluente, na proporção 6,5:2,5:0,4, já vinha sendo utilizado na eluição de fosfolipídios em CCD⁴⁸ desde a década de 60.

4.2. Quitosana

Quitosana é um polímero obtido a partir da quitina que é encontrada em abundância na natureza, principalmente na carapaça de crustáceos. Quimicamente, a quitina é um polissacarídeo inerte e insolúvel com grupos acetila laterais (Figura 4.2a). Quando estes grupos são modificados por N-desacetilação, obtém-se a quitosana (Figura 4.2b) que é reativa e solúvel em ácidos fracos. Devido ao seu caráter básico (atribuído à presença de grupamentos amina nas unidades repetidas que impõem uma natureza catiônica) e à sua biodegradabilidade, esse polímero vem despertando bastante interesse devido as suas potencialidades como floculante, clarificador, espessante, fibra, filme, matriz para coluna cromatográfica, membrana seletiva de gás e produção de novos materiais especialmente na área biomédica.^{49, 50, 51}

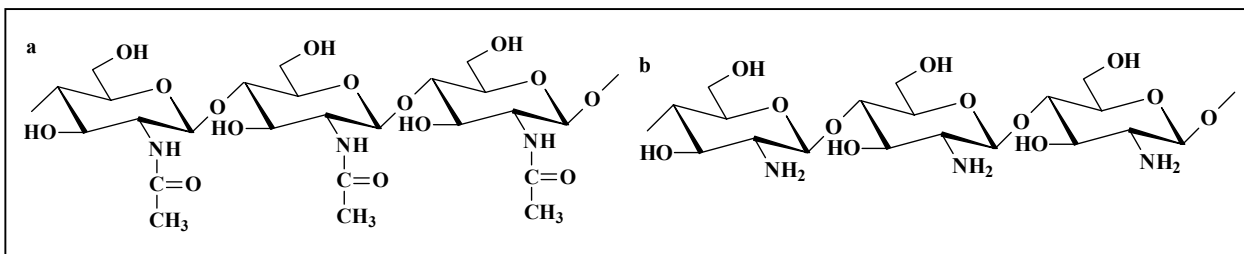


Figura 4.2: Estruturas moleculares de quitina (a) e quitosana (b).

Sendo polissacarídeos semelhantes, quitina e quitosana são polímeros lineares contendo unidades 2-acetamida-2-deoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-deoxi-D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4).¹⁴

Os grupos acetila predominam nas cadeias de quitina, enquanto que a quitosana contém mais grupos desacetilados. Considera-se que a quitosana corresponde ao polímero que contém mais de 50% de unidades desacetiladas.¹⁴ Este grau de desacetilação (GD) está relacionado com o processo e as condições de reação de obtenção da quitosana a partir da quitina. Na técnica mais difundida devido à sua simplicidade, a quitina permanece em refluxo numa solução de NaOH 40-50% por períodos que podem variar de uma a onze horas dependendo do GD pretendido. Após, são realizados processos de lavagem para a purificação da quitosana. Muitas modificações do método têm sido realizadas objetivando um conhecimento mais aprofundado da relação entre condições reacionais e o conseqüente GD. Para isso, mudanças no tempo de refluxo,^{50,52} na temperatura,⁵² lavagens seguidas de novos refluxos,⁵³ uso de atmosfera inerte⁵⁴ e adição de captadores de oxigênio^{55,56} para diminuir a degradação do polímero foram estudadas. Estes estudos concluíram que as mudanças nos parâmetros experimentais podem melhorar a performance da síntese proporcionando quitosanas de maiores GDs em períodos mais curtos de reação.

Da mesma forma que as condições de reação produzem diferentes GDs, cadeias poliméricas de diferentes tamanhos são obtidas, pois a quitina “quebra” em inúmeras cadeias de massas molares variáveis.

A quitosana é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, mas dissolve em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos onde os átomos de nitrogênio dos grupos amino são protonados a valores de pH inferiores a 5,5.¹⁴ Cargas positivas nos nitrogênios tornam o

polímero um polieletrólito catiônico capaz de se ligar fortemente a moléculas de caráter aniônico, o que o torna passível de ser utilizado no desenvolvimento de novos materiais nas mais diversas áreas de aplicação. Evidentemente esta propriedade está diretamente ligada ao GD, pois quanto mais grupos amino estiverem presentes ao longo das cadeias poliméricas, maior será a sua solubilidade e o conseqüente “poder catiônico”.

5. Métodos

5.1. Purificação da fosfatidilcolina e caracterização do grau de pureza

Neste trabalho utilizou-se o sistema de eluição da CCD descrito por Marinetti⁴⁸ para purificar a fosfatidilcolina através da CC. Setenta g de sílica-gel (Merck) foram compactados com o eluente clorofórmio:metanol:água (6,5:2,5:0,4). Sete g de lecitina de soja bruta dissolvidos em 150 mL de clorofórmio foram adicionados lentamente na coluna e em seguida eluídos com 400 mL do eluente. As frações foram recolhidas gota a gota em frascos de 6 mL e o processo foi acompanhado por CCD em placas de sílica (Merck) e o mesmo eluente tendo-se uma amostra de fosfatidilcolina de alta pureza fornecida pela indústria (Solae do Brasil S. A.) como padrão de comparação. As placas das frações de 26 a 38 corresponderam à placa desta fosfatidilcolina padrão e foram misturadas em balão de vidro com adição de sulfato de sódio anidro para absorção de água sob agitação manual por cinco minutos. Após, a solução foi filtrada para outro balão e os solventes eliminados em evaporador rotatório sob vácuo, a 30 °C, fornecendo uma massa de 0,8316 g de fosfatidilcolina.

Espectros de RMN do ¹H foram obtidos para a amostra padrão e para a amostra purificada respectivamente em equipamento Inova-300 (300 MHz) e Varian XL-200 (200 MHz) dissolvendo-se 40 mg de cada amostra em 1 mL de CDCl₃. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna.

Espectro de RMN do ³¹P foi obtido para a amostra purificada em equipamento Varian XL-200 (200 MHz) dissolvendo-se 40 mg de amostra em 1 mL de CDCl₃ e usando trifenilfosfato como padrão externo.

5.2. Quitosana

5.2.1. Obtenção

Uma massa de 5 g de quitina (Delaware) foi dispersa em 200 mL de solução de NaOH (Merck) 50% em balão de 500 mL. A solução foi aquecida a 100 °C sob agitação com condensador acoplado e permaneceu em refluxo por 10 h. Após resfriamento, o precipitado foi

filtrado e lavado com água até pH = 8,0. O precipitado foi dissolvido em 400 mL de solução de ácido acético (Merck) 5 mL/L (pH = 3,0) sob agitação por 12 h. A solução foi filtrada duas vezes sob vácuo com filtros de 8 e 0,45 µm de porosidade (Millipore) para eliminação de impurezas. O pH da solução filtrada foi ajustado para 8,5 com solução de NaOH 10% para precipitação da quitosana que foi filtrada em vidro sinterizado (G3), lavada com água (MilliQ) até condutividade 5 mS e com soluções de etanol (Nuclear):água (70:30; 80:20; 90:10; 100:0) e secada sob vácuo em dessecador com sílica-gel (Merck).

5.2.2. Caracterização da massa molar média por espalhamento de luz

O espalhamento de luz é um método absoluto para determinação da massa molar média (M_w) de macromoléculas, embora a obtenção de dados e a sua interpretação seja mais difícil quando as espécies em estudo apresentam comportamento associativo que pode resultar em agregados macromoleculares. Este problema pode ser evitado se forem escolhidas faixas de concentração adequadas para a diluição do polímero e solventes adequados, que no caso da quitosana costumam ser soluções aquosas de ácido acético⁵⁷ ou HCl⁵⁸ e soluções tampão de acetato de pH em torno de 4,5 e força iônica conhecida.⁵⁹

A presença de impurezas como contaminantes, poeira, fibras e partículas também prejudica as medidas de espalhamento de luz, por isso as amostras em solução devem ser cuidadosamente filtradas e/ou centrifugadas antes da realização das medidas.

No espalhamento de luz elástico considera-se apenas a quantidade média da luz espalhada em uma determinada direção, sem levar em conta a modificação ou distribuição de frequências. Neste caso, tem-se o espalhamento de luz estático (SLS)⁶⁰ onde mede-se o excesso de intensidade da luz espalhada por uma solução comparada à intensidade de luz espalhada pelo solvente puro. Um dos métodos mais empregados para análise da luz espalhada por macromoléculas é a relação de Zimm:⁶¹

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left[1 + \frac{16\pi^2 n_o^2}{3\lambda_o^2} \langle R_g^2 \rangle \text{sen}^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right] + 2A_2c \quad (5.1)$$

onde: K = constante óptica calculada a partir do incremento no índice de refração específico das amostras em solvente ($\delta n/\delta c$) no mesmo comprimento de onda da luz laser incidente na amostra; c = concentração; R_θ = razão de Rayleigh dada pela relação entre o excesso de luz espalhada e a intensidade da radiação incidente no sistema, levando-se em consideração a distância do volume de espalhamento até o detector; M_w = massa molar média; n_o = índice de refração do solvente; λ_o = comprimento de onda do feixe de luz incidente; R_g = raio de giro; θ = ângulo de medida da luz espalhada em relação ao feixe de luz incidente e A_2 = segundo coeficiente virial. A intensidade média da luz espalhada pelas macromoléculas em soluções de diferentes concentrações a diferentes ângulos de espalhamento, extrapolada para $\theta \rightarrow 0$ e $c \rightarrow 0$, fornece o valor absoluto da M_w , bem como o R_g , através do gráfico resultante de Zimm. Para a determinação do raio hidrodinâmico (R_h) da quitosana em solução, utilizou-se o espalhamento de luz dinâmico (DLS), descrito na seção **5.3.2.3**.

Dados da literatura mostram que os métodos de clarificação (filtração e centrifugação) exercem um papel importante na obtenção dos dados por espalhamento de luz⁶² na medida em que contaminantes levam a interpretações errôneas como a de que em altas concentrações necessariamente ocorram agregados⁵² e de que quitosanas de GDs maiores forneçam sempre M_w menor.

Para a caracterização da quitosana neste trabalho, oito soluções do polímero com concentrações de 0,10 (A), 0,15 (B), 0,20 (C), 0,25 (D), 0,50 (E), 1,00 (F), 1,30 (G) e 1,50 (H) mg/mL foram preparadas por dissolução em 10 mL de solução tampão de acetato de sódio (Aldrich) 0,02 M / ácido acético (Merck) 0,02 M (pH=4,5) e 0,1 M NaCl (Nuclear) sob agitação por 16 h. As amostras foram filtradas (1,20; 0,45 e 0,22 μm) para cubetas ópticas livres de poeira para determinação da M_w , do R_g e do R_h . Antes das medidas de espalhamento de luz, as amostras foram centrifugadas por 99 min a 4000 rpm na temperatura ambiente, para garantir a ausência de poeira e/ou agregados.

Para a obtenção do gráfico de Zimm, a intensidade da luz espalhada foi medida em intervalos de 5° entre os ângulos de 35° e 145° para cada amostra. O tolueno foi usado como padrão. Para o cálculo da constante óptica K , o incremento no índice de refração em função da concentração foi obtido refratometricamente (Brookhaven Instruments BI-DNDCW) para as mesmas concentrações a 620 nm como $\delta n/\delta c = 0,198 \text{ mL/g}$ a temperatura de 20 °C.

5.2.3. Determinação do grau de desacetilação

O GD da quitosana tem sido determinado por técnicas como potenciometria e condutimetria ou por métodos espectroscópicos como UV, IV e RMN.¹⁴

A RMN permite a determinação direta dos grupos acetamida ao longo das cadeias de quitosana através da análise dos espectros obtidos pelas técnicas de ^1H , ^{13}C e ^{13}C em estado sólido,⁵⁶ resultando em melhor acuracidade e reprodutibilidade. Em RMN de ^1H , o próton do grupo N-acetila ($\delta = 2,1$ ppm / TMS) permite a determinação do GD, mas para uma baixa quantidade de grupos acetila, ou seja, altos GDs, este método não é suficientemente sensível.⁶⁵ Outra limitação é a insolubilidade da quitosana em solventes orgânicos, o que obriga o uso de água deuterada e DCI^{66,67} e mesmo assim a dissolução de relativamente altas quantidades de amostras comumente requeridas nas práticas de RMN é difícil para quitosana de baixos GDs.

Entre as técnicas espectroscópicas de determinação do GD, o IV é o mais popular devido à facilidade de preparação das amostras (em pastilhas de KBr ou filmes) e obtenção dos espectros. Deve-se apenas tomar os cuidados requeridos e fazer uma boa escolha das linhas de base e bandas de referência.

Pelo método proposto por Moore e Roberts em 1980,⁶⁶ o GD pode ser determinado relacionando-se a banda de amida I a 1655 cm^{-1} e a banda de hidroxila a 3450 cm^{-1} , que serve como banda de referência interna, pois é relativamente isolada e a sua intensidade é aproximadamente constante para todas as faixas de GD. A porcentagem dos grupos aminoacetilados (%N-acetila) é obtida pela equação:

$$\% \text{ N-acetila} = (A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33 \quad (5.2)$$

onde: A_{1655} = absorvância a 1655 cm^{-1} ; A_{3450} = absorvância a 3450 cm^{-1} e 1,33 é uma constante que representa a razão A_{1655} / A_{3450} para amostras de quitina completamente N-desacetiladas.

Segundo Canella e Garcia,⁵³ alguns trabalhos mostram que é insignificante o efeito da água absorvida no polímero sobre a intensidade da banda de estiramento O-H a 3463 cm^{-1} , o que poderia interferir na banda de referência interna de 3450 cm^{-1} . Mesmo assim, a absorção atribuída à deformação de água a 1630 cm^{-1} pode interferir na resolução das bandas de amida I e

II, dificultando a determinação da absorvância a 1655 cm^{-1} . As pastilhas ou filmes devem, portanto, estar bem secas. A escolha adequada da linha de base também é fundamental.

Brugnerotto *et al.*¹³ também pesquisaram diferentes linhas de base e bandas características para quitinas e quitosanas oriundas de fontes diversas com vários GDs e diferentes graus de pureza. Concluíram que a razão de absorvância A_{1320} / A_{1420} fornece resultados excelentes, independentemente dos parâmetros experimentais da técnica, estado e pureza da amostra, através da relação:

$$\% \text{ N-acetila} = 31,92 (A_{1320} / A_{1420}) - 12,20 . \quad (5.3)$$

A relação de Moore e Roberts⁶⁶ tem-se consolidado como a mais adequada para a determinação do GD acima de 50%, onde há a predominância de grupos amina ao longo das cadeias poliméricas, característica da quitosana. Através desta equação foi determinado o GD para a quitosana preparada neste trabalho. Pastilhas de quitina:KBr (Aldrich) e quitosana:KBr foram preparadas na proporção 2:100 mg e analisadas em espectrofotômetro FT-IR Shimadzu com acúmulo de 64 *scans* em resolução de 4 cm^{-1} .

5.3. Nanovesículas lipossômicas

5.3.1. Preparação

Neste trabalho, vesículas lipossômicas foram preparadas pelo método da evaporação em fase reversa. Segundo a literatura¹⁵ este processo, descrito em **2.5.f.**, segue as etapas representadas na Figura 5.1, onde:

1. Dissolução do fosfolipídio em solvente orgânico.
2. Adição de água (formação de duas fases).
3. Sonicação (formação das micelas reversas (MR)).
4. Evaporação do solvente orgânico.
5. Formação de um organogel.
6. Formação das vesículas pela adição de água sob agitação manual.

As estruturas em 3, 4, 5 e 6 estão representadas pela sua secção transversal.

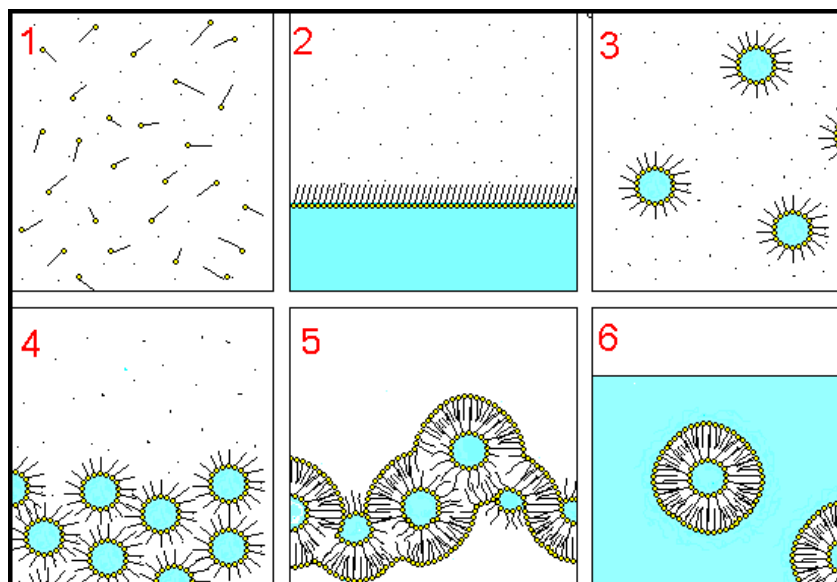


Figura 5.1: Esquema para o processo de preparação de vesículas lipossômicas pela evaporação em fase reversa.¹⁵

A extrusão das vesículas formadas permite a escolha do tamanho médio final das mesmas. Neste trabalho foi utilizada membrana filtrante com porosidade de 0,45 μm .

Este processo constitui um método acessível às condições laboratoriais. É um processo multi-etapas que leva à formação de dois tipos de estruturas organizadas, as MR na etapa 3 e os lipossomas na etapa 6. Na etapa intermediária é formado o organogel, onde as cadeias de fosfolípido se auto-organizam nas lamelas constituintes dos lipossomas. Tanto MR^{68,69} quanto o organogel⁴¹ e especialmente os lipossomas,² apresentam diversas aplicações, e foram caracterizados físico-quimicamente neste trabalho.

Através desta técnica de preparação obtém-se LUV que possuem um grande núcleo aquoso, o que é vantajoso quando se deseja um alto encapsulamento de substâncias hidrofílicas.

Neste trabalho foram preparadas vesículas lipossômicas de fosfatidilcolina sem quitosana (LFC) e vesículas lipossômicas de fosfatidilcolina com quitosana (LFCQ).

Para a preparação de LFC, uma porção de 60 mg de fosfatidilcolina de lecitina de soja 99% (Solae do Brasil S. A.) com percentual de hidratação de 6,2% determinado pelo método de Karl Fisher, foi dissolvida em 10 mL de acetato de etila (Merck) e outra em 10 mL de éter etílico (Synth). Duzentos μL de água (MilliQ) foram adicionados em cada solução. Em seguida, as soluções foram submetidas ao ultrassom (2 - 4 min) fornecendo dispersões opalescentes e

homogêneas de MR. Os solventes orgânicos foram evaporados em evaporador rotatório a 25 - 35° C sob vácuo, formando um organogel que reverteu em vesículas lipossômicas pela adição de 100 mL de água sob agitação manual. Desta solução, porções de 1, 2, 3, 5 e 7 mL foram diluídas a 10 mL e então filtradas a 0,45 µm (Millipore) para cubetas livres de poeira para as medidas de espalhamento de luz.

LFCQ foram preparadas pelo mesmo processo descrito acima com acetato de etila como solvente orgânico e ao invés de 200 µL de água, foram adicionados 200 µL das soluções de quitosana 0,10 (A), 0,50 (E) e 1,00 mg/mL (F) obtendo-se respectivamente as amostras LFCQA, LFCQE e LFCQF.

Com a finalidade de melhor compreender a fase pré-vesicular das amostras, soluções de MR em acetato de etila também foram preparadas com adições de pequenas porções de água ou amostra A, iniciando-se com 40 µL e adicionando-se subsequentes porções de 10 e 20 µL até atingir 420 µL. A cada porção adicionada, as soluções foram submetidas ao ultrassom e em seguida foram feitas medidas de viscosidade, intensidade de espalhamento de luz (turbidimetria), absorvância em UV-visível e medidas do R_h a 90° para o acompanhamento das mudanças estruturais no sistema.

Os organogéis formados com adição de 420 µL de água ou amostra A, bem como amostras de LFC, LFCQA, LFCQE e LFCQF, formadas pela adição de 5 mL de água no respectivo organogel e não extrusadas também foram caracterizados por SAXS.

5.3.2. Caracterização

5.3.2.1. Viscosimetria

Durante o aumento da porção de água ou amostra A nas soluções de fosdatidilcolina/acetato de etila, as mudanças na viscosidade foram determinadas em viscosímetro Cannon-Fenske a 20,0 e 19,5 °C ($\pm 0,2^\circ$) respectivamente, tomando as médias de pelo menos cinco medidas a cada nova adição. As viscosidades foram calculadas pela equação:

$$\eta_0 = \frac{t_1}{t_2} \cdot \frac{\rho_1}{\rho_2} \quad (5.4)$$

onde: η_o = viscosidade relativa; t_1 = tempo de escoamento da solução; t_2 = tempo de escoamento do solvente (48,08 s a 20 °C); ρ_1 = densidade da solução e ρ_2 = densidade do solvente.

5.3.2.2. Turbidimetria e ultra-violeta visível

Da mesma forma que para a viscosimetria, foram feitas medidas de turbidimetria por intensidade de luz espalhada no equipamento de espalhamento de luz (laser He-Ne, 35 Mw, 632,8 nm, modelo 127 da Spectra-Physics; goniômetro BI-200M, versão 2.0 e correlador digital BI-9000AT da Brookhaven Instruments) e de absorvância em espectrômetro de UV-visível (Pharmacia Biotech) a 20 °C.

5.3.2.3. Espalhamento de luz

O R_h das vesículas lipossômicas, das MR e também das amostras de quitosana em solução, foi caracterizado por DLS onde se considera as flutuações de intensidade e as distribuições de frequência (Γ) originadas da difusão translacional das partículas em solução. A função obtida a partir destas flutuações de luz espalhada no tempo é dada por uma integral de Laplace do tipo:

$$G(t) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \cdot e^{-\Gamma t} \cdot d\Gamma \quad (5.5)$$

Relacionando-se Γ com o vetor de onda q , determina-se o coeficiente de difusão translacional (D_T):

$$D_T = \Gamma / q^2 \quad (5.6) \quad \text{onde} \quad q = (4\pi n_o / \lambda_o) \text{ sen } \theta / 2 \quad (5.7)$$

Extrapolando-se para ângulo (θ) e concentração (c) zero, obtém-se o valor do coeficiente de difusão a diluição infinita (D_o) através da equação:

$$D_c = D_o (1 + k_D c) \quad (5.8)$$

Este, quando relacionado com a temperatura (T) e a viscosidade (η_o) do solvente, permite o cálculo do R_h das espécies em solução pela relação de Stokes-Einstein:

$$D_o = \frac{k_B T}{6\pi\eta_o R_h} \quad (5.9)$$

Para análise das funções de correlação temporal foi utilizado o *software* CONTIN.^{70,71}

Variando-se os ângulos de observação entre 45° e 145°, a dependência angular do R_h foi determinada para as MR sem quitosana.

Uma análise da luz espalhada (SLS) entre 45° e 145° permite ainda o cálculo do R_g da estrutura espalhante, de acordo com o formalismo a seguir.⁷² A dissimetria angular $d_s(\theta)$ é definida como:

$$d_s(\theta) = I(\theta) / I(180^\circ - \theta) \quad (5.10)$$

onde: $I(\theta)$ = intensidade de luz espalhada no ângulo de observação e $I(180^\circ - \theta)$ = intensidade de luz espalhada no ângulo de 180° subtraído da intensidade de luz espalhada no ângulo de observação.

Utilizando-se a relação:

$$d_s(\theta) \cong 1 + 2 (R_g^2 / 3) q^2 \quad (5.11)$$

obtém-se o R_g aproximado.

5.3.2.4. Testes de estabilidade

A estabilidade dos lipossomas em solução aquosa à temperatura ambiente foi acompanhada por medidas do R_h , a 90°, em função do tempo (vinte dias) para as amostras LFC, LFCQA, LFCQE e LFCQF. Medidas do pH foram realizadas com pH-metro Digimed DM-20 à temperatura ambiente após a preparação das amostras e no vigésimo quinto dia após a preparação.

5.3.2.5. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

No espalhamento de raios-X utiliza-se raios de alta energia com comprimentos de onda da ordem de 1,5 Å que correspondem às dimensões atômicas. A radiação interage com os elétrons fornecendo informações sobre a organização da densidade eletrônica do material, a qual obedece à densidade atômica do mesmo.^{73,74,75}

Os comprimentos de onda espalhados por diferentes átomos combinam-se resultando em interferências construtivas ou destrutivas, de acordo com as fases relativas dos diferentes comprimentos de onda. Estas fases dependem das posições relativas dos átomos e assim a amplitude de uma onda difratada numa dada direção depende da distribuição espacial dos átomos na amostra. Desta forma obtém-se a ordem translacional presente na amostra.

Quando o material é perfeitamente organizado em nível atômico, o espectro de raio-X obtido contém um perfil de difração (reflexões de Bragg) altamente definido. Neste caso há espalhamento cooperativo onde todas as unidades espalhantes estão em fase. De outra forma, num material atômicamente desorganizado o espalhamento é difuso e abrange uma ampla faixa angular.^{73,76}

A intensidade difratada pode ser assumida como uma função do vetor de espalhamento q , que representa a mudança no vetor de onda do feixe difratado. O módulo do vetor de onda é dado por:

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda_0 . \quad (5.12)$$

Como no espalhamento de luz, o vetor de onda q está relacionado com o tamanho do objeto observado e para o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) obtém-se informações dimensionais de estruturas significativamente maiores do que as dimensões atômicas. Portanto, o domínio típico dessa técnica compreende valores de q menores do que 0,1 Å⁻¹ ($\theta \approx 1^\circ$).

Equivalentemente, a lei de Bragg pode ser escrita como:

$$q = n (2\pi / d) \quad (5.13)$$

onde n é um número inteiro e d é a separação entre dois planos espalhantes.

Quando existe uma série de planos igualmente espaçados, a intensidade espalhada $I(q)$ é quase sempre zero, exceto onde a lei de Bragg é satisfeita. Neste caso, a difração fornece uma série de picos igualmente espaçados a uma distância $2\pi / d$ ao longo da direção normal aos planos.⁷⁴

Se uma amostra possui muitos microdomínios, com diversas orientações distribuídas aleatoriamente, as condições de Bragg serão satisfeitas para todos os valores de n e será possível a observação simultânea de todos os possíveis picos de difração.⁷³

A intensidade de espalhamento medida no detector varia somente com a magnitude de q e não com sua direção. Assim, o perfil de espalhamento é representado por um gráfico de intensidade em função de q .

Os espectros de SAXS neste trabalho, foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brasil. O comprimento de onda empregado foi de 1,608 Å e os espectros foram obtidos com o auxílio de um detector linear. As amostras foram colocadas em porta-amostras de aproximadamente 0,5 mL a um tempo de exposição de 600 segundos e temperatura de 20 °C. A distância amostra-detector foi ajustada em 43,5 cm.

6. Resultados e discussão

6.1. Purificação da fosfatidilcolina e caracterização do grau de pureza

A massa de 0,8316 g obtida na purificação da fosfatidilcolina corresponde a um rendimento de 12% (m/m). Este rendimento encontra-se dentro do esperado para o percentual de fosfatidilcolina na lecitina de soja (10 a 20%).^{77,78} A CCD para a lecitina de soja bruta (Figura 6.1a) mostrou a presença de pelo menos oito componentes diferentes. O acompanhamento da CC pela CCD permitiu o monitoramento da purificação. A Figura 6.1b representa a placa obtida pela eluição da fosfatidilcolina purificada, que coincide com os resultados da literatura,⁴⁵ ao lado (Figura 6.1c) representa-se a eluição de fosfatidilcolina purificada fornecida pela indústria, que já apresentava indícios de degradação. A Figura 6.1d representa a placa de CCD da amostra purificada no nosso laboratório, que foi mantida em solução de clorofórmio P.A., sob atmosfera de argônio, ao abrigo da luz e a temperatura baixa (-14 °C) sete dias após a purificação, quando foram feitas as medidas de RMN. Nota-se que a fosfatidilcolina degrada facilmente e por isso todos os cuidados possíveis de conservação devem ser tomados. A conservação em clorofórmio seco em *freezer* e atmosfera inerte é a forma mais adequada.

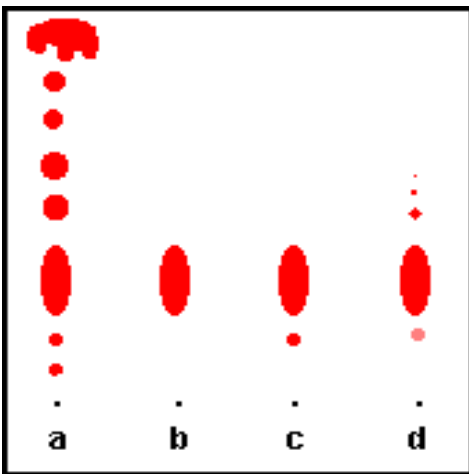


Figura 6.1: Representação para CCD de lecitina de soja bruta (a), fosfatidilcolina purificada (b), fosfatidilcolina fornecida pela indústria (c) e fosfatidilcolina purificada após sete dias (d).

Além da CCD a fosfatidilcolina foi caracterizada por RMN do ^1H (Figura 6.2). O pico em torno de 3,3 ppm nos espectros de RMN do ^1H corresponde aos hidrogênios das metilas da colina e foi usado para o cálculo de relação de pureza da amostra purificada, pela comparação das razões de integração dos sinais das metilenas (1,3 e 1,6 ppm) dividida pela integração do sinal das metilas da colina (3,3 ppm) como esquematizado na Figura 6.2. Os resultados estão na Tabela I.

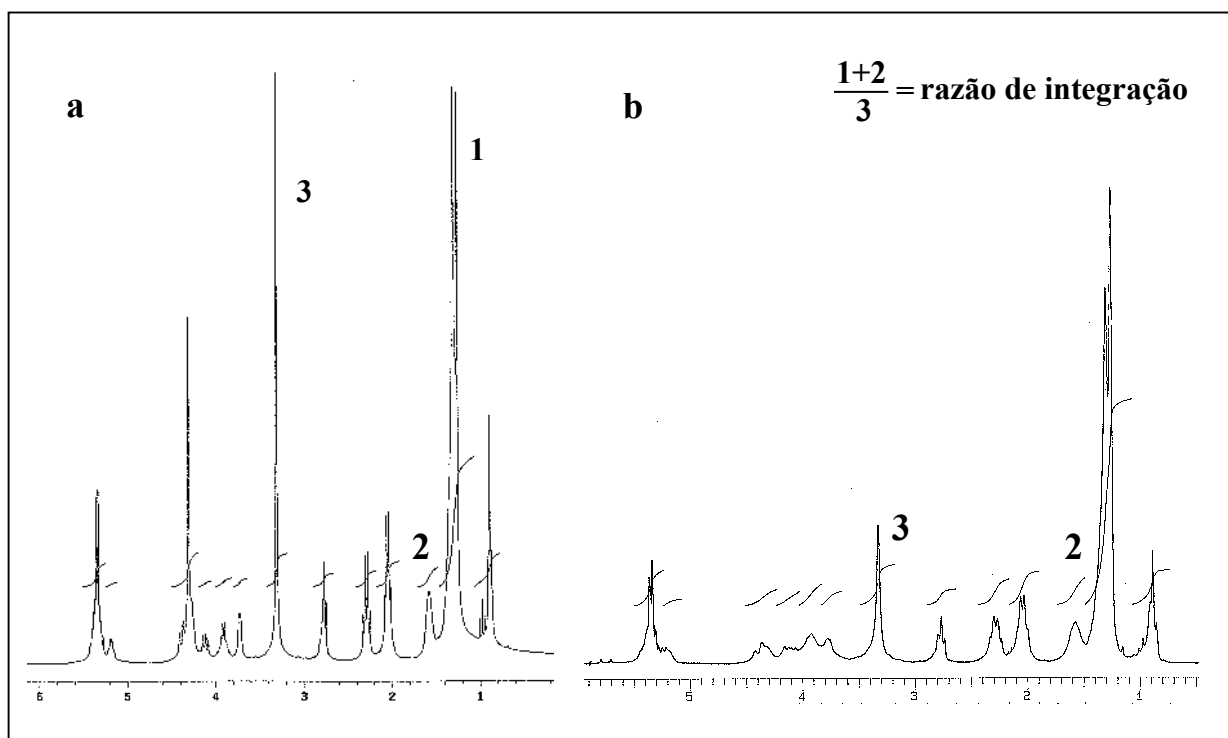


Figura 6.2: Espectros de RMN do ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, ppm, padrão interno TMS) da fosfatidilcolina da indústria (Solae do Brasil S. A.) (a) e purificada no laboratório (b).

Tabela I: Relação de pureza da lecitina (RMN do ^1H).

Amostra	Razão de integração
Lecitina de soja bruta*	21,05
Fosfatidilcolina da indústria*	4,53
Fosfatidilcolina purificada	5,60

*Solae do Brasil S.A.

Estes resultados mostram que a fosfatidilcolina foi purificada com sucesso e que a amostra analisada apresentou um grau de pureza próximo ao da fosfatidilcolina fornecida pela indústria. Deve-se salientar, ainda, que a razão de integração da fosfatidilcolina purificada provavelmente teria sido menor (mostrando assim uma pureza maior) do que a razão de integração obtida nesse experimento se as medidas de RMN tivessem sido feitas no mesmo dia da purificação, já que houve alguma degradação como constatado pela CCD.

O espectro de RMN do ^{31}P da fosfatidilcolina purificada (Figura 6.3) confirmou a presença do grupo fosfato da fosfatidilcolina na região de -0,8 ppm de acordo com espectros da literatura^{79,80} obtidos nas mesmas condições.

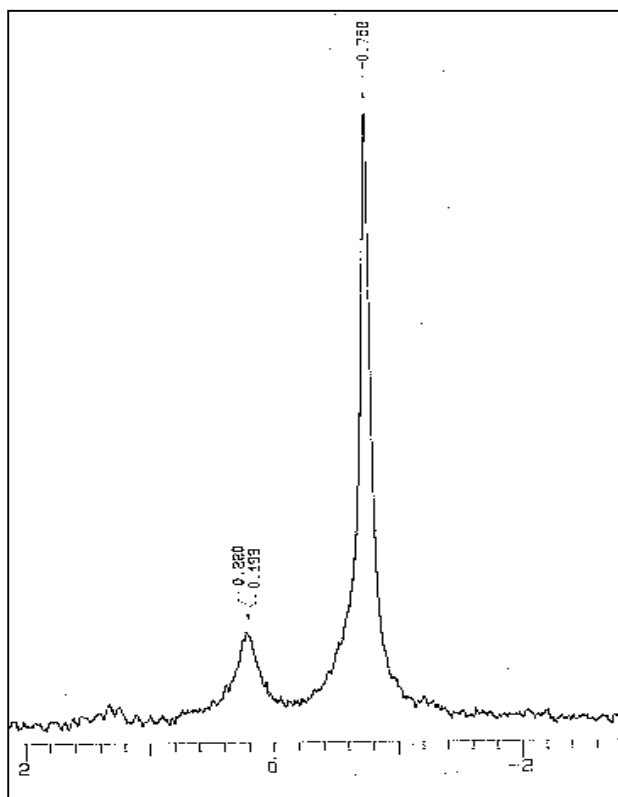


Figura 6.3: Espectro de RMN do ^{31}P (CDCl_3 , 80 MHz, ppm, padrão externo trifenilfosfato) da fosfatidilcolina purificada no laboratório.

O pico na região de 0,2 ppm corresponde provavelmente ao grupo fosfato da lisofosfatilcolina segundo a mesma literatura, mostrando que realmente este é o primeiro produto de degradação.

6.2. Quitosana

A massa de quitosana obtida na reação de hidrólise foi de 1,5 g e corresponde a um rendimento em massa de 30%. A Figura 6.4 mostra o espectro de IV obtido para a quitina comercial que sugere a presença de impureza(s) orgânica(s) na amostra, pois a intensidade da banda em 1415 cm^{-1} não corresponde à região de impressão digital dos espectros da literatura^{13,53} para o mesmo composto. A(s) impureza(s) pode(m) ter ocasionado o baixo rendimento de quitosana.

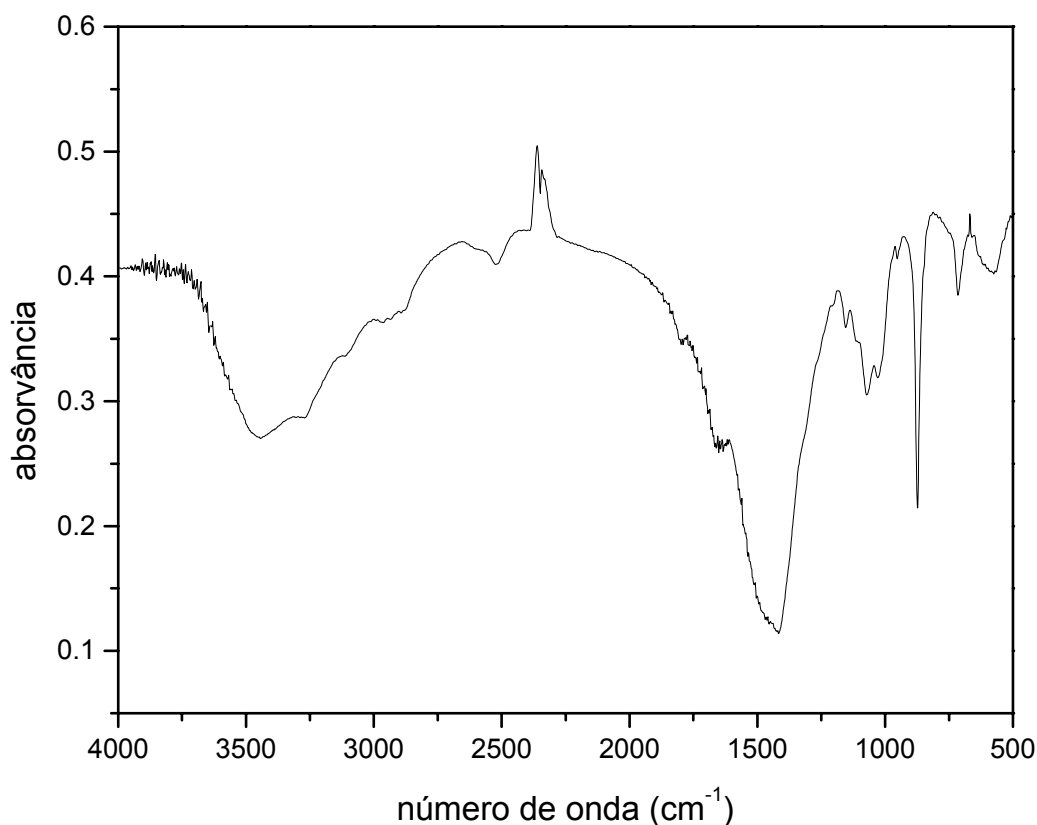


Figura 6.4: Espectro de IV (pastilha KBr) para quitina comercial (Delaware).

Dois métodos de purificação da quitina (extração de compostos protéicos e despigmentação)⁵³ foram procedidos, mas não houve uma redução significativa da banda de impureza e a reação de hidrólise desta quitina resultou no mesmo rendimento obtido com a quitina não purificada.

A técnica de espectroscopia no IV é útil para comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila da estrutura da quitina, através da redução da integração da banda de estiramento da carbonila da amida.⁵³ A Figura 6.5 mostra o espectro de IV para a quitosana obtida. A banda de amida I está a 1649 cm^{-1} enquanto que a banda de deformação N-H de amina aparece a 1598 cm^{-1} . Aplicando-se a equação de Moore e Roberts,⁶⁶ o GD resultante foi de 83%. Considerando que a reação foi procedida em uma única etapa, sem uso de atmosfera inerte e na ausência de captadores de oxigênio, estes resultados são razoáveis. Além disso, o processo de purificação da quitosana também é susceptível a perdas de rendimento devido às inúmeras lavagens seguidas de filtrações. A dissolução do polímero na solução tampão foi eficiente sendo que na concentração máxima de $1,5\text{ mg/mL}$ não foram visualizadas partículas remanescentes após 16 h de agitação a temperatura ambiente.

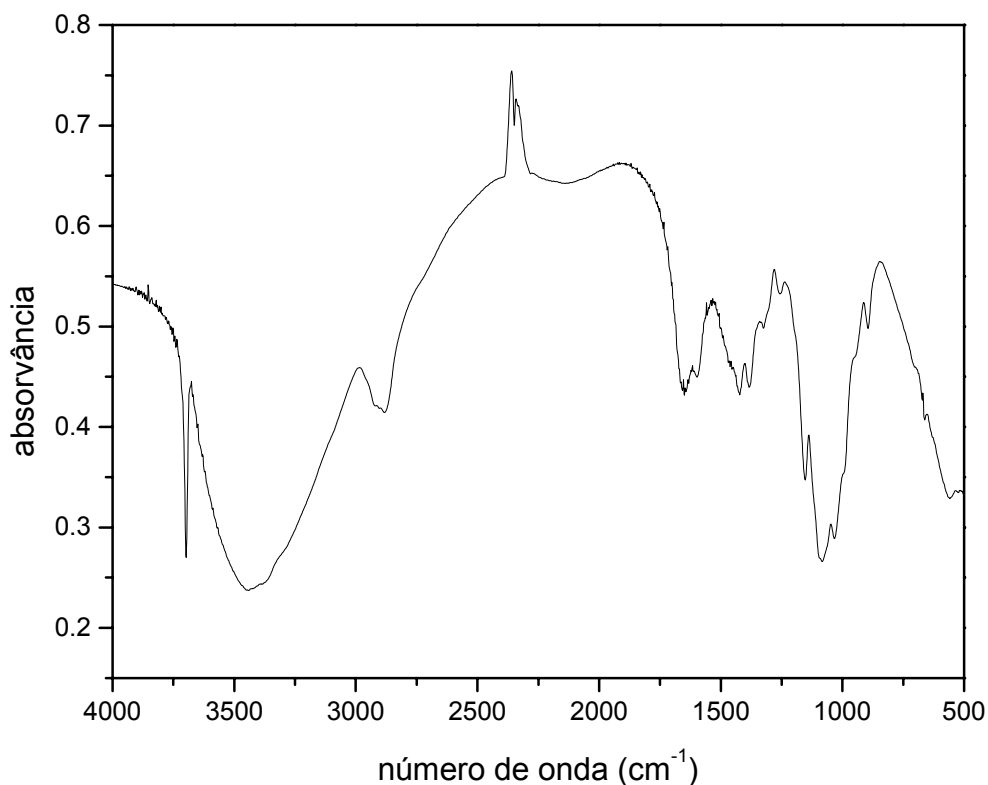


Figura 6.5: Espectro de IV (pastilha KBr) para a quitosana hidrolisada.

Os resultados obtidos pelo gráfico de Zimm (Figura 6.6) forneceram $M_w = 1,64 \cdot 10^5\text{ g/mol}$ ($\pm 5,8\%$ para concentração e $\pm 23,5\%$ para ângulo), $R_g = 43,5\text{ nm}$ e segundo coeficiente virial A_2

$= 2.87 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}/\text{g}^2$, indicando que a quitosana apresenta o comportamento de um polieletrólito do tipo bastão⁸¹ com boa interação com o solvente (solução tampão de pH = 4,5).

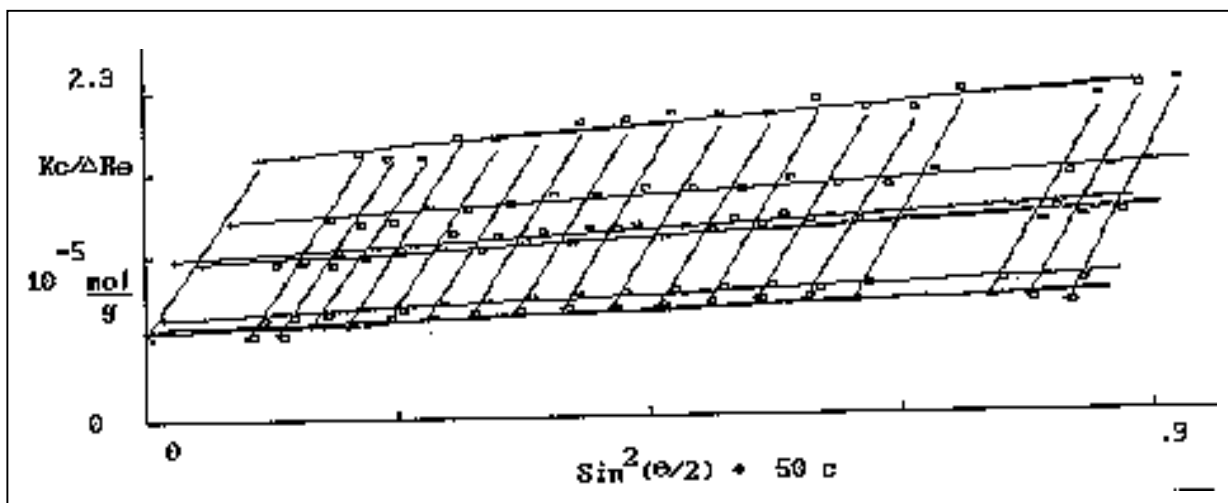


Figura 6.6: Gráfico de Zimm para quitosana em solução tampão.

Os valores de R_h obtidos para as diferentes soluções de quitosana por DLS estão na Tabela II. Pode-se observar a existência de duas faixas de tamanhos para o polímero em solução. As amostras mais diluídas, A-E, apresentaram R_h aparente menor e as mais concentradas, F-H, R_h maior. Este comportamento pode ser interpretado como efeito de agregação para as amostras mais concentradas,⁸² mas alguns autores⁶² sustentam que este comportamento se deve à presença de impurezas que devem ser completamente eliminadas pelos métodos de clarificação como filtração e ultracentrifugação.

Tabela II: Raios hidrodinâmicos aparentes a 90° para diferentes concentrações de quitosana em solução tampão de pH = 4,5 e a temperatura de 20°C .

Amostra	A	B	C	D	E	F	G	H
mg/mL	0,10	0,15	0,20	0,25	0,50	1,00	1,30	1,50
R_h (nm)	$25,5 \pm 2$	$27,7 \pm 2$	$28,5 \pm 3$	$39,5 \pm 2$	$37,7 \pm 9$	$120,1 \pm 10$	$126,4 \pm 9$	$91,1 \pm 6$

A extrapolação à diluição infinita dos valores de R_h para as amostras A-E (Tabela II) fornece $R_h = 24,4$ nm. A relação R_g / R_h fornece o valor de $1,8 \pm 0,4$. O erro deve-se à incerteza associada a determinação do R_g pelo método de Zimm (23,5%). Valores de R_g/R_h maiores do que 2,0 indicam estrutura do tipo bastão rígido, enquanto valores em torno de 1,7 indicam modelo aleatório.⁸⁶ Apenas o valor de R_g / R_h determinado neste trabalho, não permite uma conclusão definitiva acerca da estruturação do polímero em solução. Associando-se, no entanto, este valor com o valor de A_2 , pode-se sugerir que o mesmo encontra-se na forma de bastão rígido, típico de polieletrólitos.

Neste estudo foi calculada a concentração crítica ($c^* = M_w / N_A R_g^3 4\pi/3$) da quitosana como 0,79 mg/mL. Então pode ser considerado que o R_h de amostras de concentração próxima ou acima deste valor será mais alto do que o R_h de amostras mais diluídas o que corresponde ao comportamento observado. Como o interesse da quitosana neste trabalho reside na sua aplicação na produção das vesículas, três concentrações, uma baixa, uma intermediária e uma alta (A, E e F) foram escolhidas para o estudo. A concentração mais diluída (A) também foi escolhida para o estudo das MR e caracterização do organogel por SAXS.

6.3. Acetato de etila como solvente orgânico

No método da preparação em fase reversa, fosfatidilcolina pura deve dissolver muito bem no solvente orgânico utilizado. Existem em torno de 50 solventes em que o fosfolipídio dissolve,⁸³ mas muitos deles como os clássicos clorofórmio e éter etílico, tornam a etapa de preparação danosa à saúde do laboratorista. Os solventes também podem restar como traços na formulação final das vesículas comprometendo assim a sua performance, aumentando riscos ambientais e de saúde.⁸⁴ Outros como etanol, demandam períodos maiores para completa dissolução ou mesmo aquecimento, o que pode degradar as cadeias de fosfatidilcolina.

O acetato de etila foi proposto por Cortesi *et al.*⁸⁴ como um solvente alternativo no método de preparação por fase reversa. Sua toxicidade é similar a do éter etílico com limite de aceitação humana de 400 ppm para ambos, de acordo com Martindale.⁸⁵ Também o momento de dipolo do acetato de etila é próximo ao momento de dipolo da água, o que pode ser favorável para um aumento da eficiência de encapsulamento de fármacos hidrofílicos no método de preparação.⁸⁴

Neste trabalho, a dissolução de fosfatidilcolina, o R_h e o R_g de lipossomas (LFC) foram comparados para preparações em éter etílico e acetato de etila. Os 60 mg do fosfolipídio dissolveram em ambos os solventes com leve agitação por alguns minutos e sem aquecimento. Os resultados das medidas de DLS para as vesículas lipossômicas preparadas nestes solventes estão apresentados na Tabela III.

Tabela III: Dimensão das vesículas lipossômicas preparadas com diferentes solventes.

Solvente	R_h (nm)	R_g (nm)	R_g / R_h	$R_h - R_g$ (nm)
Éter etílico	$119,1 \pm 8$	82,7	0,7	36,4
Acetato de etila	$141,1 \pm 9$	113,3	0,8	27,8

Como no estudo de Cortesi *et al.*,⁸⁴ o R_h médio obtido para lipossomas preparados em ambos os solventes foi semelhante, mas com um leve aumento para lipossomas preparados em acetato de etila o que pode ser interpretado como efeito de traços de solvente que restaram após a etapa de evaporação. Um estudo para avaliar esta questão seria desejável, considerando que também o tamanho molecular dos solventes difere, o que pode significar uma mesma quantidade de solvente absorvido, porém como as massas atômicas diferem, o mesmo poderia ocorrer com a dimensão das estruturas. Os valores calculados para a relação R_g / R_h correspondem a estruturas esféricas.⁸⁶ Por outro lado, a diferença entre R_h e R_g indica uma camada de solvatação maior para as estruturas preparadas em éter etílico.

A maior vantagem do uso de acetato de etila sobre o éter etílico e outros é a sua baixa pressão de vapor (10 kPa a 20,4 °C)⁸⁷ em relação aos outros solventes, o que oferece menor perda por evaporação durante a preparação, reduzindo a exposição do laboratorista.

6.4. Viscosimetria, turbidimetria e ultra violeta-visível das micelas reversas

A Figura 6.7a mostra o comportamento da viscosidade com o aumento da porção aquosa na solução de fosfatidilcolina/acetato de etila, onde encontram-se as MR de fosfatidilcolina. Estudos anteriores mostraram que MR são formadas imediatamente quando fosfatidilcolina é dissolvida em meio apolar⁸⁸ devido à interação da extremidade polar do fosfolipídio ou logo após as primeiras adições de água.

As seguidas adições de água levam a um crescimento unidimensional das MR esféricas para longos cilindros chamados micelas *worm-like* devido às pontes de hidrogênio entre o grupo fosfato da fosfatidilcolina e a água.⁸⁸ Após atingir o comprimento máximo, as micelas estendidas iniciam um processo de agregação formando uma rede tridimensional temporal, um organogel termoreversível e isotrópico.⁸⁹

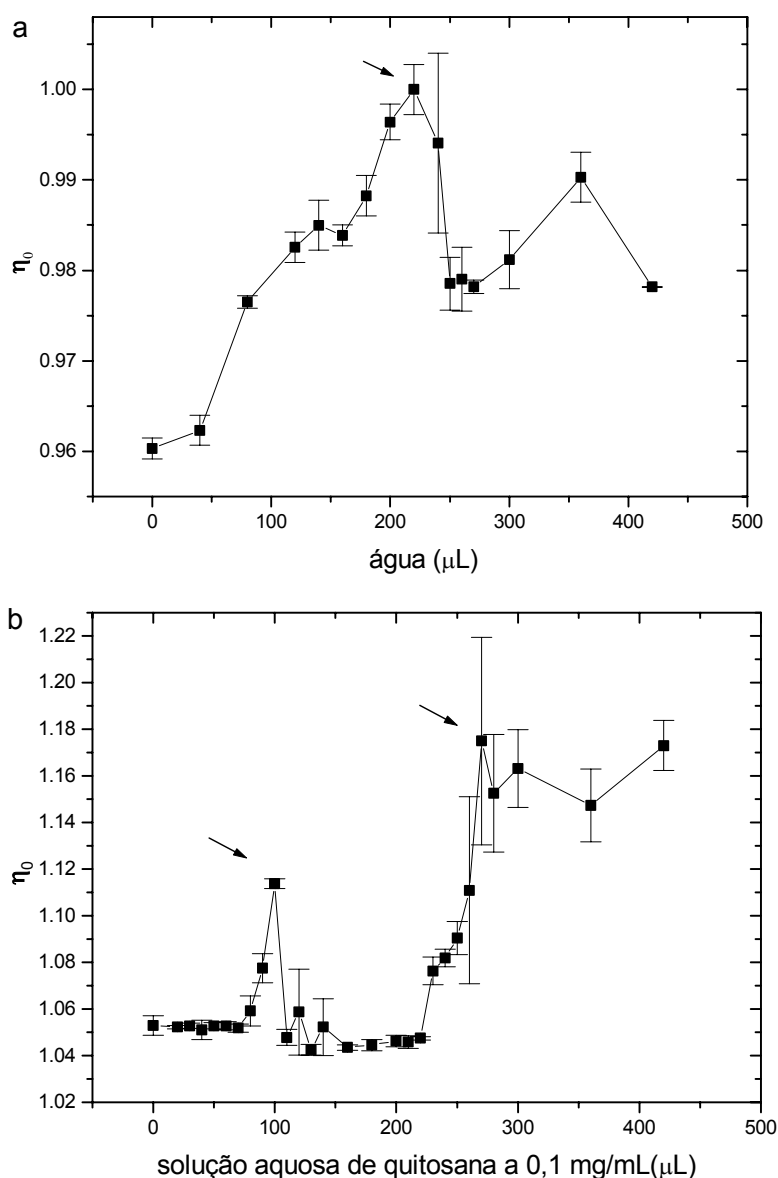


Figura 6.7: Viscosidade de MR sem quitosana (a) em função da adição de água a $20,0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2$ e viscosidade de MR com quitosana (b) em função da adição de solução tampão de quitosana $0,1\text{ mg/mL}$ a $19,5\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2$. As setas indicam os pontos de percolação do organogel.

Este comportamento é dependente do meio orgânico^{4,88} e para o acetato de etila foi encontrado pela viscosimetria, para a proporção 6 mg/mL, o ponto de percolação correspondente a razão molar de solvente polar (água) $w_o = \text{solvente polar} / \text{fosfatidilcolina} = 187,9$. Este valor significa um alto nível de hidratação e é utilizado para comparação da eficiência da formação do organogel fosfatidilcolina/água em diferentes solventes orgânicos.⁴¹ Neste ponto o organogel é formado por precipitação e assim a viscosidade da solução decresce. No entanto, restam MR na solução e nas seguintes adições de água outras pequenas precipitações ocorrem. Este processo parece repetitivo como pode ser observado na Figura 6.7a até que ocorre uma separação de fase, após a adição de 400 μL de água, onde a presença de água pode ser visualmente detectada. O fato de a viscosidade não decrescer novamente até o valor inicial pode ser interpretado como erro experimental inerente, pois pequenos aglomerados de microgéis aderem nas paredes do viscosímetro após a precipitação.

Um comportamento distinto pode ser observado quando a água é substituída pela amostra A, contendo quitosana (Figura 6.7b). Neste caso ocorre uma primeira precipitação com a adição de 100 μL de solução A. Uma segunda precipitação ocorre com a adição de 270 μL , sendo que esta última produz um maior volume visual de precipitado que incorpora no primeiro. Neste sistema, as interações entre as cadeias de fosfatidilcolina e quitosana devem ser avaliadas. Devido à protonação dos grupos amino da quitosana na solução tampão, estas cadeias carregam cargas positivas, que interagem com as cargas livres da extremidade polar da fosfatidilcolina. Este efeito é mais intenso do que as pontes de hidrogênio entre fosfatidilcolina e água relatado para o caso das MR sem quitosana.

O experimento de turbidimetria (Figura 6.8) mostra um comportamento similar para ambos os sistemas. Com adição de água (Figura 6.8a) o ponto de percolação é observado a 280 μL e com solução A (Figura 6.8b) o primeiro precipitado ocorreu com 120 μL e o segundo com 220 μL . Relacionando-se com a viscosimetria, estes valores são maiores devido à diferença no *stress* experimental a que as amostras são submetidas. Enquanto que na turbidimetria a amostra é mantida na cubeta durante todas as adições de água (ou solução A), sonicação e medidas de intensidade, na viscosimetria a mesma é vertida da cubeta para o viscosímetro e vice-versa a cada adição, o que pode causar perdas de amostra. Além disso, a viscosimetria mede a resistência do fluido ao fluxo, enquanto que a turbidimetria mede a intensidade de luz.

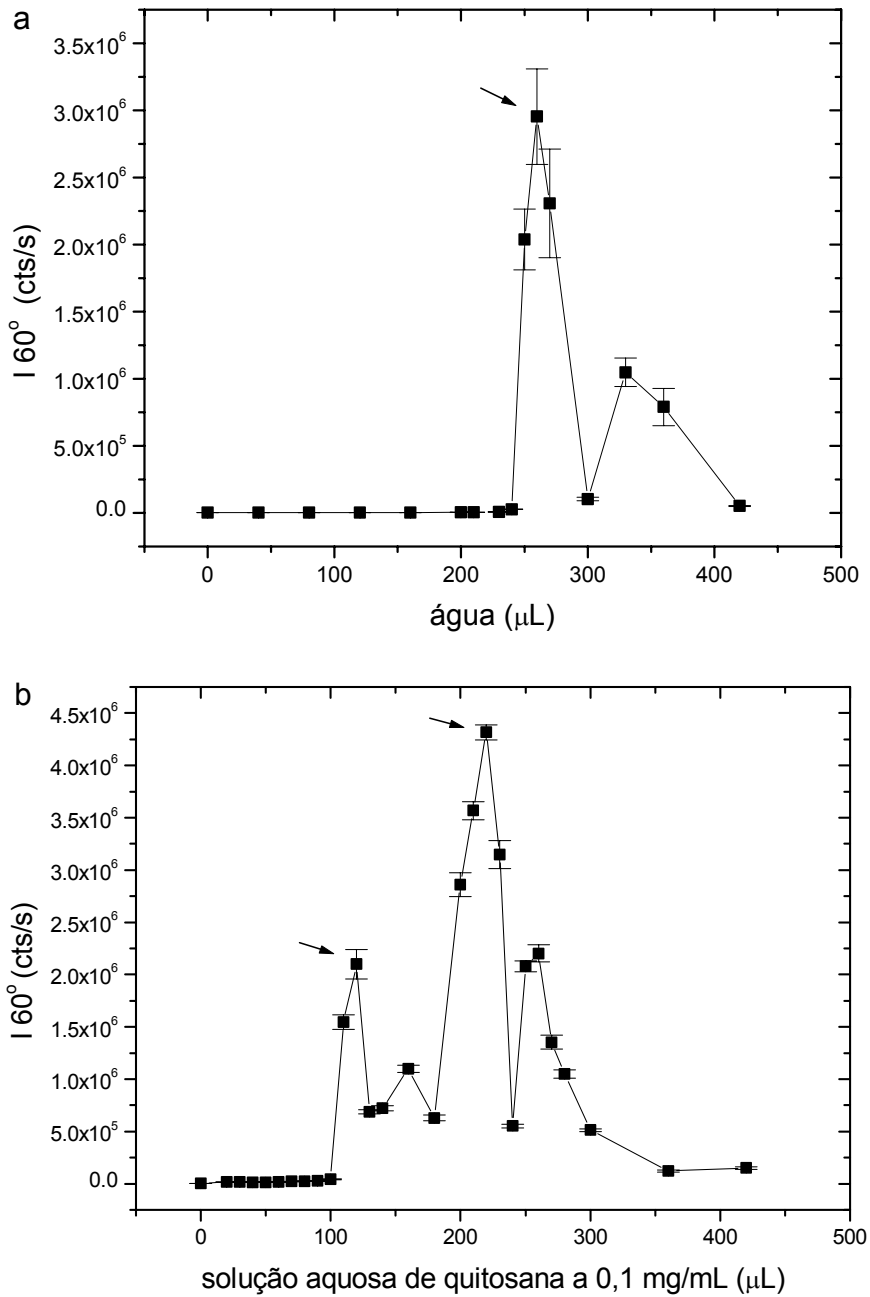


Figura 6.8: Variação da intensidade de luz espalhada para MR sem quitosana (a) e com quitosana (b). As setas indicam os pontos de percolação do organogel.

Da mesma forma as medidas de absorvância em UV visível (Figura 6.9) fornecem para MR sem quitosana um ponto de percolação a 230 μL de água ($A = 1.833$). Para MR com

quitosana o primeiro ponto de percolação foi a 120 μL ($A = 1.497$) e o segundo a 200 μL ($A = 1.429$).

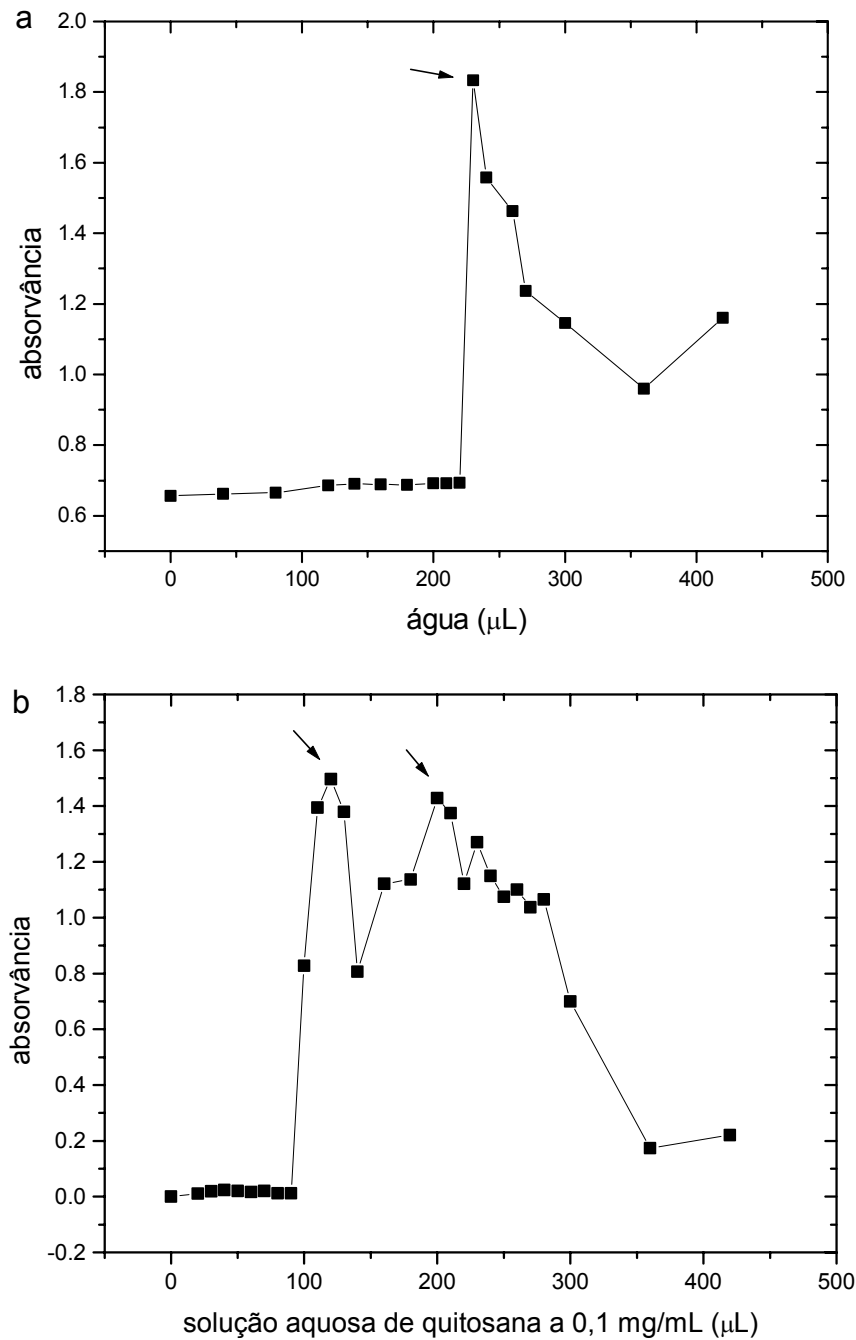


Figura 6.9: Variação da absorvância em UV-visível para MR sem quitosana (a) e com quitosana (b). As setas indicam os pontos de percolação do organogel.

O espalhamento de luz (turbidimetria) mostrou-se mais adequado para o acompanhamento dos pontos de percolação, pois a flutuação de intensidade de luz espalhada depende apenas da formação de estruturas cada vez maiores em solução (que determinam a formação do gel) e não do crescimento do número de MR, responsáveis pelo aumento da viscosidade.

6.5. Variação do raio hidrodinâmico das micelas reversas

A Tabela IV mostra os valores obtidos para o R_h de MR de fosfatidilcolina em acetato de etila, em função do ângulo de espalhamento de luz.

Tabela IV: Dependência angular para MR (200 μ L de água) preparadas em acetato de etila.

Ângulo ($^\circ$)	R_h (nm) \pm 10%
45	3,0
60	2,9
90	2,6
120	2,9
145	3,0

Estes resultados evidenciam a presença de uma estrutura com R_h médio de $2,9 \pm 0,3$ nm. Em ângulos menores do que 90° , observou-se também a presença de estruturas maiores em solução, relacionadas provavelmente a agregados precursores do organogel.

A variação do R_h das MR com crescentes adições de porção aquosa para ambos os sistemas com e sem quitosana também foi acompanhada e os resultados mostram que o comportamento do sistema corresponde ao que foi apresentado pelas técnicas anteriormente discutidas. Para MR sem quitosana (Figura 6.10a) o R_h aumenta relativamente pouco nas primeiras adições de solução aquosa. Na adição de 240 μ L há um aumento expressivo do R_h e com 260 μ L ocorre a precipitação do organogel. Estes dados demonstram que o crescimento das micelas aos agregados macromoleculares em acetato de etila ocorre rapidamente assim que a

concentração de estruturas em solução atinge um determinado valor, que neste caso corresponde à adição de 240 μL de água.

Após a primeira precipitação, estruturas que ainda não atingiram o ponto de percolação permanecem na solução e precipitam com as seguintes adições de água e assim o R_h decresce a cada nova adição.

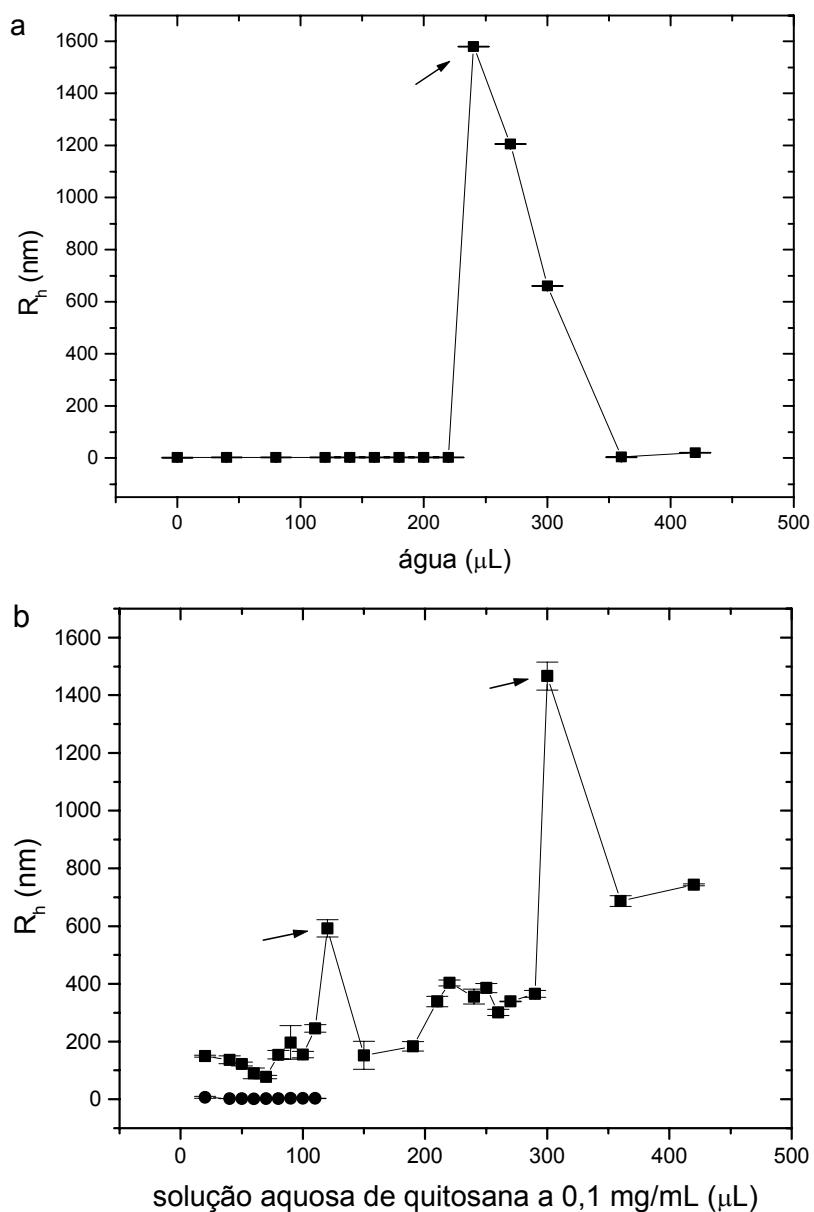


Figura 6.10: Variação do R_h para MR sem quitosana (a) e com quitosana (b) (■: MR com quitosana; ●: MR sem quitosana). As setas indicam os pontos de percolação do organogel.

Na interpretação da Figura 6.10b, alguns dados importantes devem ser considerados. MR em acetato de etila preparadas com adição de água apresentaram R_h médio em torno de 2,6 nm a $\theta = 90^\circ$. (Tabela IV). Quitosana em solução tampão forneceu um R_h à diluição infinita de 24,4 nm (de acordo com a extrapolação dos resultados da Tabela II) e $R_g = 43,5$ nm obtido pelo SLS. Estes dados sugerem que MR preparadas com solução de quitosana devem ser muito maiores do que as MR com água para que as mesmas possam conter o polímero. Além disso, o crescimento dos agregados macromoleculares, que precipitam no ponto de percolação, ocorre mais rapidamente com uma porção menor de solução aquosa contendo quitosana. No experimento da Figura 6.10b, notou-se a presença de duas diferentes distribuições na função de correlação temporal do DLS antes do primeiro ponto de percolação. Estas distribuições fornecem uma estrutura menor, com R_h entre 1,4 e 6,5 nm, e outra onde o R_h inicial é de 149,8 nm ($\pm 2\%$) e que sofre um decréscimo até 77,3 nm ($\pm 7\%$) com adição total de 70 μL de solução. Isto pode ser o resultado de uma divisão maior das estruturas devido às subseqüentes ultrasonicações. Em seguida ocorre um aumento contínuo do R_h que culmina a 592,4 nm ($\pm 5\%$), com a porção de 120 μL quando ocorre o primeiro ponto de percolação.

Estes dados sugerem que a estrutura menor corresponde à MR sem quitosana e a estrutura maior à MR com quitosana. Como o sistema colapsa no primeiro ponto de percolação, as MR sem quitosana também são desestruturadas, pois podem ser incorporadas nos agregados macromoleculares em formação. Isso pode ser suposto considerando que na porção de 120 μL de solução, onde as estruturas atingem os 592,4 nm, já não aparecem mais estruturas menores em percentual relevante.

6.6. Hipótese para o comportamento do sistema com quitosana

Uma hipótese para o que acontece em cada etapa do processo de adição de solução A à solução de fosfatidilcolina para produção de vesículas compósitas é proposta na Figura 6.11 onde:

1. Fosfatidilcolina é dissolvida em acetato de etila fornecendo uma solução de baixa η_0 .
A intensidade de luz espalhada e o R_h também são pequenos.

2. Primeira adição de solução A, com formação de duas fases onde as extremidades polares da fosfatidilcolina são atraídas pela fase aquosa contendo quitosana e as cadeias apolares pelo solvente orgânico.
3. Após sonicação, a solução torna-se turva contendo MR com e sem quitosana e cadeias livres de fosfatidilcolina que ainda não formaram estrutura micelar devido a baixa quantidade de porção aquosa nas primeiras adições; η_o , intensidade e R_h crescem a cada adição de solução A a medida que aumenta o número e o tamanho das MR.
4. No primeiro ponto de percolação, valores máximos de η_o , intensidade e R_h são atingidos; provavelmente neste ponto todas as moléculas de fosfatidilcolina estão envolvidas na formação de MR com quitosana que são mais pesadas e atingem o ponto de percolação com porção aquosa menor do que MR sem quitosana; sendo mais pesadas, estas micelas também não alcançam valores de R_h tão altos quanto as micelas sem quitosana o que pode ser observado comparando-se as Figuras 6.10a e b.
5. Após o primeiro ponto de percolação; com a precipitação η_o , intensidade e R_h decrescem substancialmente; MR com quitosana não podem incorporar mais polímero e a ação do ultrassom desestrutura o sistema; neste processo muitas MR rompem e precipitam.
6. Com as seguintes adições de solução A e sonicações, novas MR são formadas fornecendo novamente estruturas crescentes e conseqüente aumento de η_o , intensidade e R_h .
7. No segundo ponto de percolação; mais uma vez a solução está saturada de MR contendo quitosana.
8. Após o segundo ponto de percolação. O excesso de solução A leva a um novo equilíbrio onde mais uma vez as MR precipitam formando o organogel; intensidade e R_h diminuem mais do que a η_o , pois a viscosimetria torna-se imprecisa após este ponto.

A evaporação do solvente orgânico seguida da dispersão do organogel em água leva à formação de nanovesículas lipossômicas revestidas externa e internamente com quitosana.

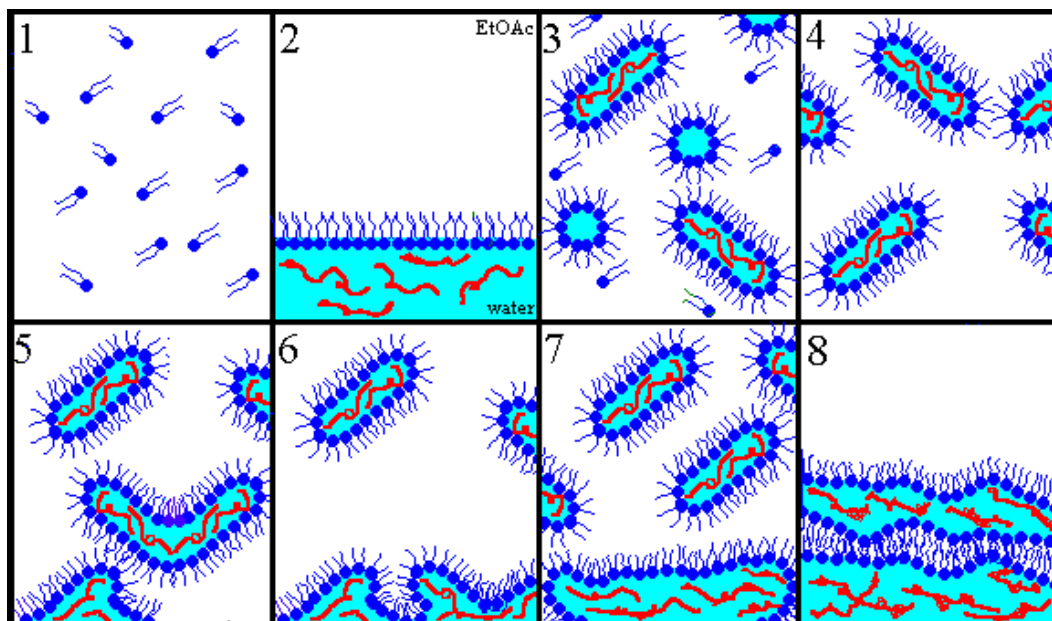


Figura 6.11: Esquema para hipótese do comportamento do sistema com quitosana.

A extrusão desta solução aquosa, através de membrana nanoporosa ($0,45 \mu\text{m}$), leva à formação de LFCQ.

6.7. Caracterização das vesículas lipossômicas por espalhamento de luz

No método de preparação das vesículas por evaporação em fase reversa, após a evaporação do solvente orgânico, todos os componentes da formulação estão no organogel. A dispersão deste gel em água pura leva à formação de lipossomas. O valor de pH para todas as soluções de lipossomas, diluídas a 100 mL, variou entre 5,5 e 5,7 a 20°C . A quitosana precipita a valores de pH maiores que 5,5,¹⁴ mas nenhuma imediata precipitação foi observada nas soluções. Uma precipitação visível de lipossomas ocorreu após três horas à temperatura ambiente apenas para as soluções de LFCQ não filtradas. Nenhuma precipitação ocorreu nas soluções filtradas a $0,45 \mu\text{m}$, durante vinte e cinco dias, a temperatura ambiente.

A Tabela V mostra os dados obtidos por espalhamento de luz para as amostras de lipossomas preparados com quitosana (LFCQ) e lipossomas preparados com água pura (LFC).

Tabela V: Parâmetros para vesículas lipossômicas com quitosana (LFCQ) e sem quitosana (LFC).

Amostra	LFC	LFCQA	LFCQE	LFCQF
I (cts/s)	19004 ± 3%	44246 ± 5%	79419 ± 3%	114346 ± 5%
R _h (nm)	141,1 ± 7%	173,8 ± 8%	246,1 ± 3%	285,5 ± 2%
R _g (nm)	113,3	131,5	191,9	192,3
R _g / R _h	0,8	0,8	0,8	0,7

Os resultados indicam que lipossomas sem quitosana (LFC) apresentam raios menores, enquanto que lipossomas produzidos com solução de quitosana (LFCQ) apresentam raios maiores. Além disso, todos os lipossomas são diluídos à mesma proporção, mas, como esperado, a intensidade é maior para os LFCQ. Segundo o estudo de Tanford,⁸¹ a forma geométrica das estruturas em solução está relacionada com a razão R_g / R_h. No presente estudo, os valores desta razão para os lipossomas concordam com estruturas esféricas.⁸⁶

Nenhuma larga distribuição de tamanhos nem mesmo a presença de altas proporções de estruturas secundárias foi constatada nas soluções de lipossomas estudadas.

Considerando-se as forças de interação entre a extremidade polar da fosfatidilcolina e as cadeias de quitosana positivamente carregadas, estes resultados sugerem que quitosana está revestindo externa e internamente LFCQ conforme esquematizado na Figura 6.12a, enquanto que LFC permanece sem revestimento polimérico (Figura 6.12b).

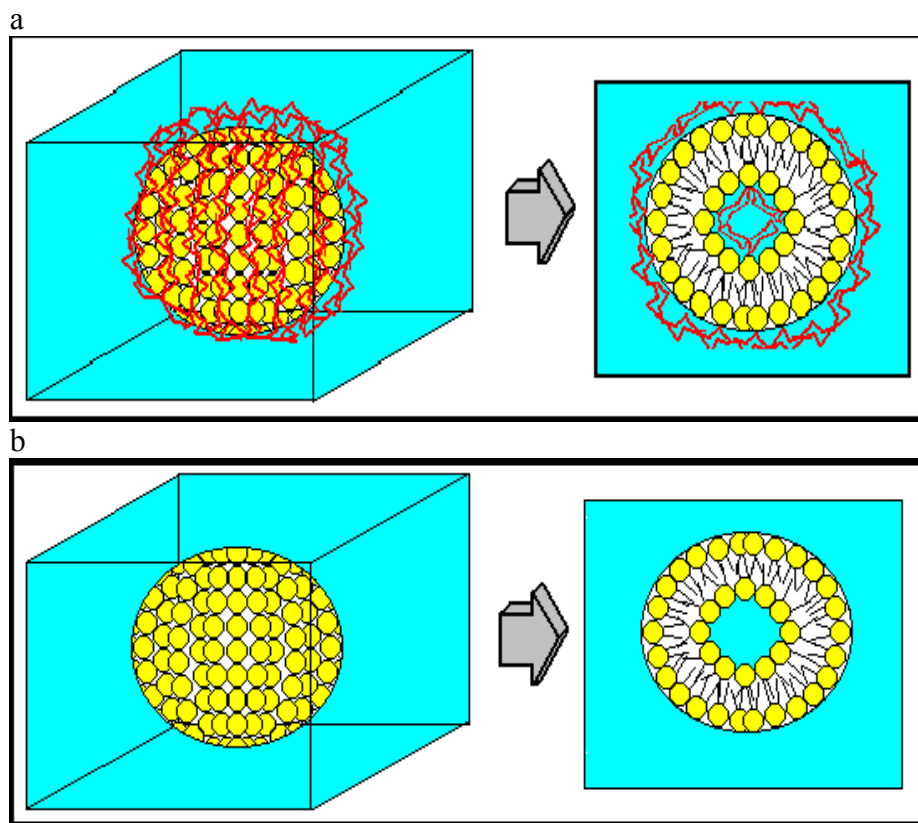


Figura 6.12: Representação externa e interna de LFCQ (a) e LFC (b).

6.8. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

A utilização da técnica de SAXS objetivou uma maior compreensão da estruturação lamelar dos organogéis, bem como da estrutura lamelar das diferentes vesículas, com e sem quitosana.

A Figura 6.13 mostra os espectros de SAXS obtidos para o organogel com e sem quitosana, onde pode-se observar os picos de Bragg. No organogel de fosfatidilcolina observa-se a existência de lamelas com 5,22 nm ($\pm 0,02$) de espessura. A relação entre os picos de Bragg neste caso (1:2:3), corrobora a existência de uma estrutura lamelar. No organogel com quitosana, as lamelas de fosfatidilcolina são menores (4,79 nm $\pm 0,02$) o que sugere que possam estar sendo

pressionadas pelo polímero. Neste caso também surgiram picos de intensidades menores, destacados pelas setas, que possivelmente correspondem às cadeias de quitosana existentes entre as duplas camadas lamelares de fosfatidilcolina e que, apesar de não formarem lamelas, possuem densidade de carga eletrônica que também pode ser detectada. Estes dados sugerem que houve uma reestruturação lamelar no organogel com a presença do polímero. A adição de água a este sistema, deverá levar à estruturação de vesículas de fosfatidilcolina, revestidas interna e externamente pela quitosana, a qual tem afinidade pela extremidade polar da fosfatidilcolina.

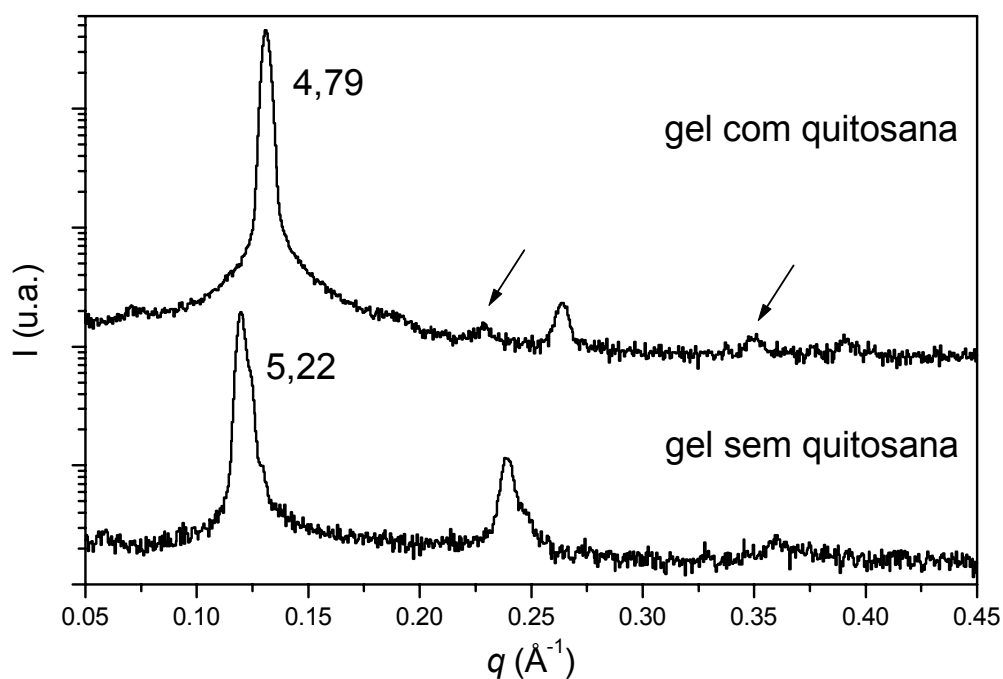


Figura 6.13: Espectros de SAXS para o organogel de fosfatidilcolina com e sem quitosana (valores indicados em nm). As setas indicam a presença de quitosana.

Na Figura 6.14 são apresentados os perfis de difração para as amostras vesiculares LFC, LFCQA, LFCQE e LFCQF. Deve-se salientar que os espectros foram obtidos antes da extrusão das soluções objetivando uma boa intensidade sinal/ruído. Assumindo-se que todas as vesículas agem como estruturas espalhantes individuais e independentes,⁷⁵ o primeiro pico de difração mostra, para todas as amostras, a presença de estrutura lamelar de aproximadamente 6,9 nm ($\pm 0,02$) de espessura (Tabela VII), obtidos por ajuste com uma função do tipo Lorenziana. Estes

ajustes estão exemplificados para LFC e LFCQF na Figura 6.15 e os parâmetros obtidos estão relacionados na Tabela VI.

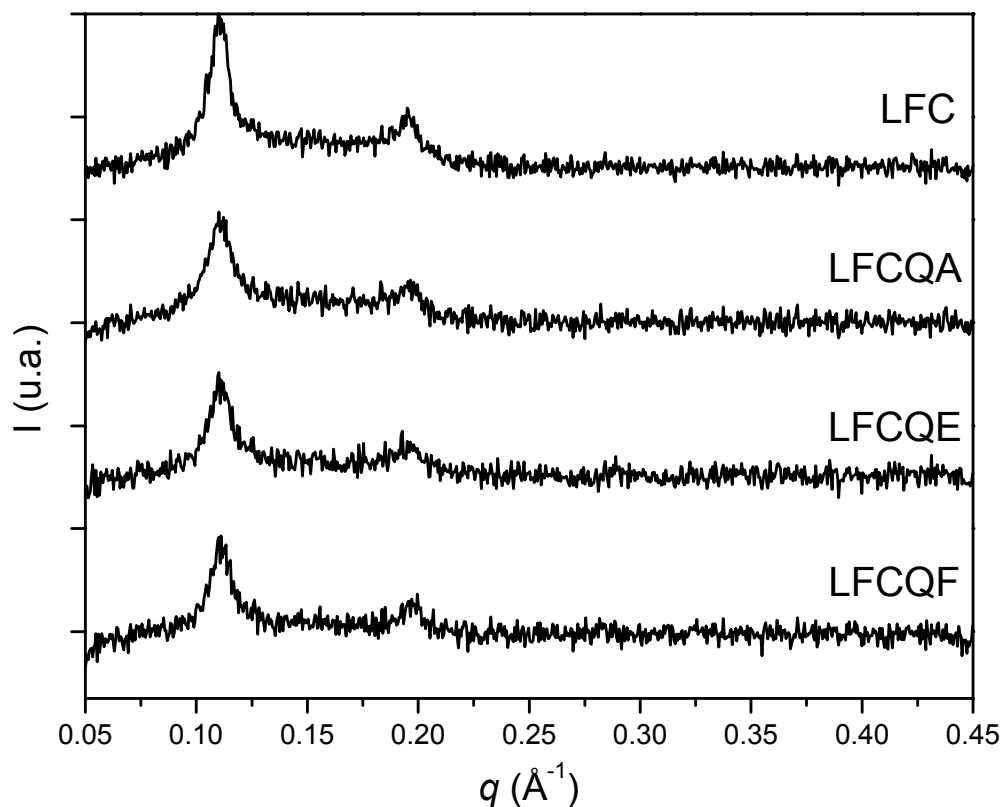


Figura 6.14: Espectros de SAXS para vesículas lipossômicas.

Na técnica de SAXS, a presença de estruturas multilamelares fornece picos de difração de primeira e segunda ordem estreitos e com intensidades elevadas enquanto que estruturas unilamelares produzem curvas largas de baixa intensidade.^{75,90,91} Nas estruturas unilamelares, vários efeitos, como desordenamento molecular na lamela, causam espalhamento incoerente, o que resulta numa intensidade difusa.^{75,90} Isto é devido principalmente ao fato de que, no regime hidrodinâmico, a vesícula unilamelar é menos rígida do que a multilamelar.

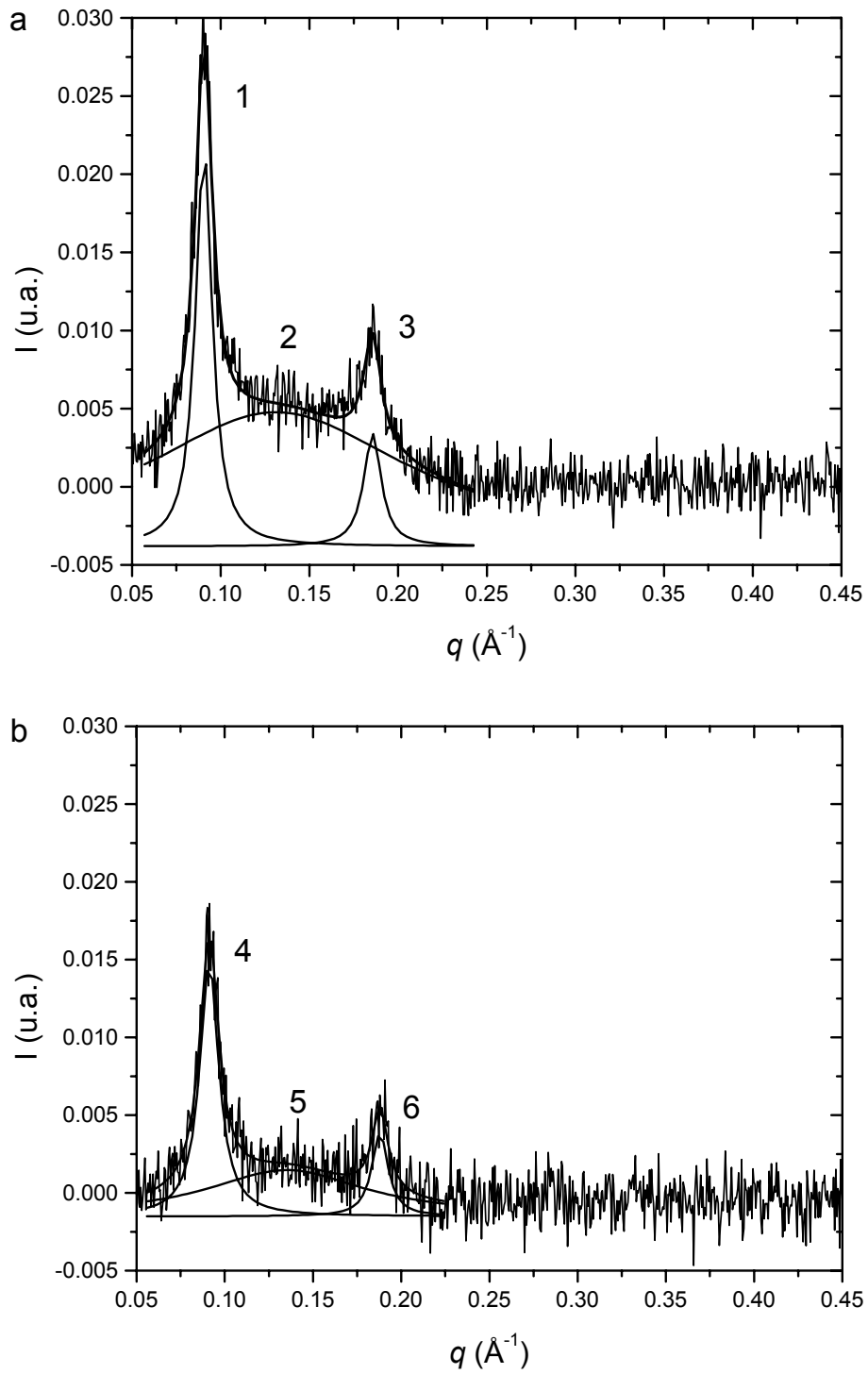


Figura 6.15: Espectros de SAXS para LFC (a) e LFCQF (b). As curvas correspondem ao ajuste com uma função Lorentziana.

Ao contrário do que foi observado nos espectros para o organogel (que constitui um sistema multilamelar), percebe-se que entre o primeiro e o segundo pico foi possível o ajuste com uma terceira Lorenziana, bastante alargada, que corresponde a estruturas unilamelares.⁷⁵ A intensidade desta curva diminui gradativamente em relação à intensidade do primeiro pico, em função do aumento da concentração de quitosana nas vesículas. Isto pode ser observado na Tabela VI comparando-se por exemplo os valores obtidos para altura, onde houve um decréscimo relativo bem maior entre os picos 2 e 5 do que para os picos 1 e 4 (Figura 6.15). Tal comportamento sugere que a presença de quitosana influencia a estruturação das vesículas de forma a aumentar o número de vesículas multilamelares. Vesículas multilamelares tendem a ser maiores do que unilamelares, o que concorda com os maiores valores de R_h e R_g obtidos para vesículas com quitosana (Tabela V).

Tabela VI: Parâmetros obtidos através do ajuste matemático das curvas de SAXS, de acordo com a Figura 6.15.

Pico	Largura	Altura	Área
1	$0,011620 \pm 0,00039$	0,025613	$0,00047 \pm 0,00001$
2	$0,165690 \pm 0,02873$	0,007953	$0,00207 \pm 0,00066$
3	$0,012081 \pm 0,00157$	0,007237	$0,00014 \pm 0,00002$
4	$0,013273 \pm 0,00081$	0,016379	$0,00034 \pm 0,00002$
5	$0,089658 \pm 0,03413$	0,002578	$0,00036 \pm 0,00018$
6	$0,011810 \pm 0,00202$	0,005328	$0,00010 \pm 0,00002$

Nos lipossomas as lamelas também estão menos pressionadas (já que as estruturas encontram-se em solução aquosa) do que no organogel, que constitui um estado líquido-cristalino, onde as moléculas estão mais próximas umas das outras. A curvatura inerente à forma esférica também pode competir para uma extensão maior das cadeias fosfolipídicas nas lamelas. Esta interpretação justifica o aumento de espessura da lamela nas vesículas. Estudos anteriores⁹² sugerem, inclusive, que em estruturas multilamelares existe a presença de água entre as lamelas fazendo interface com as extremidades polares dos fosfolipídios.

Comparando as espessuras lamelares das diferentes vesículas (Tabela VII), constata-se que há uma tendência discreta de diminuição das espessuras com o aumento da concentração de polímero. Isso também reforça a idéia de maior pressão interlamelar com a presença de quitosana.

Tabela VII: Vetor de onda q e espessura da lamela d para as amostras estudadas, obtidos por SAXS.

Amostra	q (\AA^{-1}) $\pm 0,00019$	d (nm) $\pm 0,02$
Gel de LFC	0,12026	5,22
Gel de LFCQA	0,13128	4,79
LFC	0,09045	6,95
LFCQA	0,09055	6,94
LFCQE	0,09092	6,91
LFCQF	0,09123	6,89

6.9. Estudo da estabilidade

As nanovesículas produzidas neste trabalho não foram projetadas como estruturas de longa estabilidade física e microbiológica em água, considerando-se que, não foram utilizados agentes convencionais tensoativos ou conservantes. Além disso, a apresentação de lipossomas carreadores de fármacos intravenosos em forma liofilizada é comercialmente mais interessante o que significa que, logo após a preparação, a água é eliminada. Sua reconstituição é feita por dispersão em água estéril para injeção somente na hora da aplicação, o que não vai requerer estabilidade prolongada em água, mas sim estabilidade relativa no meio intravenoso por onde as estruturas devem transportar o fármaco. Mesmo assim, a estabilidade físico-química em solução aquosa após a preparação pode fornecer indícios da estabilidade dos lipossomas em outros meios. Em um estudo comparativo como este, onde foi feita uma modificação dos lipossomas com a adição de quitosana, torna-se importante o conhecimento não apenas do aporte estrutural,

mas também de parâmetros como a estabilidade físico-química de um sistema em relação ao outro.

Os resultados do controle de pH das soluções contendo LFC e LFCQ estão apresentados na Tabela VIII. Não houve variação considerável em nenhuma das amostras estudadas, mas percebe-se que houve um pequeno aumento para lipossomas sem quitosana (LFC) e pequenas diminuições para as amostras de lipossomas com quitosana (LFCQ). Portanto há um comportamento diferente para as estruturas com quitosana, mais acentuado conforme aumenta a quantidade de polímero presente na nanovesícula.

Tabela VIII: Variação do pH após a preparação para as amostras de nanovesículas estudadas.

Amostra	1º dia	25º dia
LFC	5,51	5,63
LFCQA	5,51	5,44
LFCQE	5,67	5,56
LFCQF	5,70	5,39

Todas os lipossomas apresentaram R_h relativamente estável em água durante os cinco primeiros dias (Figura 6.16). No sétimo dia, notou-se uma distribuição de tamanhos para todas as amostras o que possivelmente pode ter sido ocasionado pela formação de agregados. A agregação por interações de van der Waals entre as estruturas pode ter ocasionado a variação de tamanhos. As medidas foram procedidas normalmente e considerou-se a média do R_h apenas da estrutura predominante, ou seja, de percentual maior, de acordo com os resultados da distribuição fornecidos pelo programa CONTIN.

Em relação ao primeiro dia, o R_h para LFC aumentou em torno de 170 nm enquanto que para LFCQE e LFCQF houve uma diminuição respectiva de 130 e 170 nm. Henriksen *et al.*³² haviam constatado o mesmo comportamento de redução no R_h para vesículas revestidas com quitosana dias após a preparação e este comportamento pode estar relacionado com uma estabilização estrutural do sistema onde as cadeias poliméricas, inicialmente mais estendidas e

hidratadas foram atenuando na superfície dos lipossomas pelo resultado de uma auto-agregação, reduzindo o R_h .

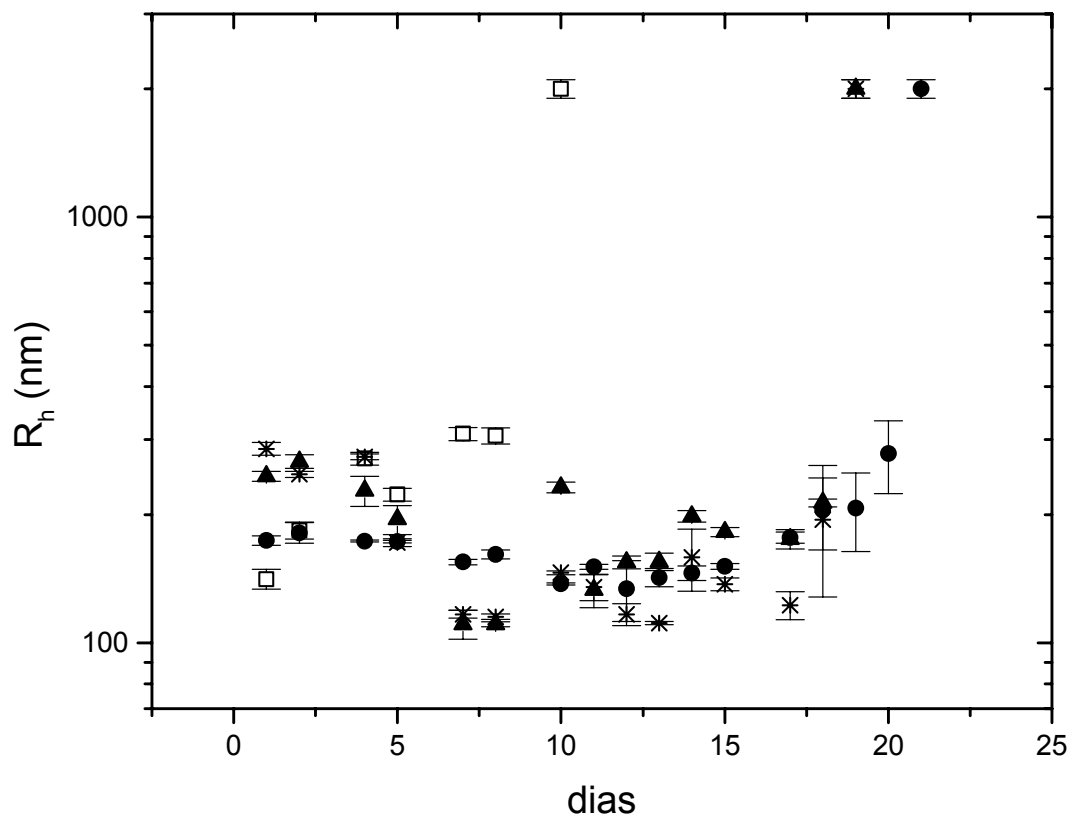


Figura 6.16: Variação do R_h em função do tempo após a preparação para as amostras de nanovesículas estudadas. ● : LFC; ◻ : LFCQA; ▲ : LFCQE; ✱ : LFCQF.

No décimo dia, estruturas micrométricas ou fora da faixa de detecção do equipamento de espalhamento de luz, foram observadas na amostra de LFC. O mesmo fenômeno foi observado para LFCQE e LFCQF no décimo oitavo dia e para LFCQA no vigésimo dia. No momento ainda não é possível afirmar com certeza se estas mudanças de R_h são resultado da formação de agregados. Mas como pode ser concluído pelos resultados da Figura 6.16, nanovesículas contendo quitosana mantiveram tamanho menor por mais tempo do que a nanovesícula sem quitosana. E dentre estas, a LFCQA, com menor concentração do polímero, apresentou um comportamento mais homogêneo. Portanto, a estabilidade física das nanovesículas foi aumentada com a modificação com quitosana.

7. Conclusões

O presente estudo de caráter fundamental a respeito da produção e caracterização de nanovesículas lipossômicas permitiu a compreensão da importância de todas as etapas envolvidas no processo, desde a obtenção e purificação das matérias-primas principais até a estruturação final do sistema vesicular.

A purificação da fosfatidilcolina, ao contrário de muitos métodos trabalhosos ou economicamente dispendiosos, foi obtida de forma simples através de uma única coluna cromatográfica sem uso de pressão ou atmosfera inerte e com o alto grau de pureza exigido para a produção de lipossomas. Verificou-se também que, apesar da eficiência da purificação, a conservação ou o impedimento da degradação deste fosfolípido constitui um desafio ainda maior considerando os resultados de cromatografia em camada delgada que após sete dias acusaram a presença de impureza da mesma forma que a amostra padrão fornecida pela indústria.

A hidrólise da quitina constitui um procedimento acessível às condições laboratoriais. Um estudo mais acurado, visando a otimização das condições experimentais para obtenção de quitosana com grau de desacetilação maior, seria desejável.

A substituição do acetato de etila ao éter etílico demonstrou ser absolutamente viável para dissolução da fosfatidilcolina e produção dos lipossomas pelo método da evaporação em fase reversa. O impacto ambiental pode ser reduzido no que diz respeito à exposição de pessoal envolvido na etapa de preparação e também na menor perda de solvente por evaporação. Resta ser avaliada a existência de traços do solvente nas estruturas finais.

A determinação do ponto de percolação, onde as micelas reversas colapsam formando o organogel na precipitação, demonstrou o alto grau de hidratação suportado pela fosfatidilcolina no acetato de etila. Este resultado pode significar um encapsulamento maior de compostos hidrofílicos.

A preparação dos lipossomas pelo método da evaporação em fase reversa adotada neste trabalho, demonstrou-se totalmente apropriada às condições laboratoriais disponíveis e possibilitou o estudo de três sistemas distintos nas diferentes etapas da preparação.

A combinação das técnicas utilizadas neste trabalho forneceu uma caracterização satisfatória dos sistemas estudados e proporcionou formação e acúmulo de conhecimento a elas relacionado.

Vesículas lipossômicas de fosfatidilcolina e vesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina e quitosana foram produzidas e caracterizadas neste trabalho mostrando que a sua obtenção é possível valorizando o uso da matéria-prima local. Sendo o Brasil, o segundo principal produtor de soja mundial (colheita de 52 milhões de toneladas na safra 2002/2003 segundo a Companhia Nacional de Abastecimento), a obtenção da fosfatidilcolina a partir da lecitina de soja representa um fator econômico gerador de divisas, que deveria ser explorado pela indústria local. Da mesma forma, o processamento da casca de camarão e siri, onde o país também está enquadrado como grande produtor deste tipo de pescado, considerando a extensão da costa marítima com a alta atividade de pesca, pode fornecer a principal fonte de obtenção da quitina e conseqüentemente produção de quitosana para uso comercial.

A modificação de vesículas lipossômicas com a adição de quitosana levou à formação de vesículas revestidas externamente e internamente com o polímero, o que proporcionou um aumento da estabilidade das estruturas em solução aquosa. Levando em conta as suas características morfológicas, pode-se considerar que neste trabalho foram obtidos lipossomas do tipo unilamelares grandes convencionais, para os constituídos unicamente de fosfatidilcolina, e quitossomas unilamelares grandes, para os revestidos com quitosana.

A caracterização das vesículas lipossômicas mostrou dados coerentes com parâmetros teóricos estabelecidos e condizentes com resultados de estudos semelhantes da literatura. Desta forma, é possível concluir que o objetivo geral de obtenção de nanovesículas foi atingido proporcionando a valorização de recursos materiais e técnicos disponíveis, a formação de conhecimento como recompensa maior e a geração de perspectivas para continuidade dos estudos relativos a produção de sistemas carreadores de fármacos, visando a contribuição ao desenvolvimento científico e tecnológico.

8. Bibliografia

-
- ¹ Polozova, A.; Yamazaki, A.; Brash, J.L.; Winnik, F.M. *Colloids and Surfaces A*. **1999**, 147, 17.
- ² Lasic, D.D. *Trends in Biotechnology*. **1998**, 16, 307.
- ³ Vries, A.H.; Mark, A.E.; Marrink, S.J. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 4488.
- ⁴ Mackeben, S.; Muller, M.; Muller-Goymann, C.C. *Colloids and Surfaces A*. **2001**, 183, 699.
- ⁵ Hernández-Borrell, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1998**, 47, 129.
- ⁶ Imura, T.; Otake, K.; Hashimoto, S.; Gotoh, T.; Yuasa, M.; Yokoyama, S.; Sakai, H.; Rathman, J.F.; Abe, M. *Colloids and Surfaces B*. **2003**, 27, 133.
- ⁷ Soppimath, S.K.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. *Journal of Controlled Release*. **2001**, 70, 1.
- ⁸ Johnsson, M.; Silvander, M.; Karlsson, G.; Edwards, K. *Langmuir*. **1999**, 15, 6314.
- ⁹ Johnsson, M.; Bergstrand, N.; Edwards, K.; Stalgren, J.J.R. *Langmuir*. **2001**, 17, 3902.
- ¹⁰ Henriksen, I.; Smistad, G.; Karlsen, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1994**, 101, 227.
- ¹¹ Perugini, P.; Genta, I.; Pavanetto, F.; Conti, B.; Scalia, S.; Baruffini, A. *International Journal of Pharmaceutics*. **2000**, 196, 51.
- ¹² Guo, J.; Ping, Q.; Jiang, G.; Huang, L.; Tong, Y. *International Journal of Pharmaceutics*. **2003**, 260, 167.
- ¹³ Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F.M.; Arguelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. *Polymer*. **2001**, 42, 3569.
- ¹⁴ Filho, S.P.C.; Desbrières, J. *Chitin, Chitosan and Derivatives*. In: *Natural Polymers and Agrofibras Based Composites*. São Carlos: Suprema Gráfica, **2000**, p. 41-71.
- ¹⁵ Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.R.; Shuber, F. *Les Liposomes*. Paris: INSERM, **1993**.
- ¹⁶ Pautot, S.; Frisken, B.J.; Weitz, D.A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2003**, 100, 10718.
- ¹⁷ Santos, N.C.; Castanho, M.A.R.B. *Química Nova*. **2002**, 25, 1181.

-
- ¹⁸ Paleos, C.M.; Sideratou, Z.; Tsiourvas, D. *Chembiochem*. **2001**, 2, 305.
- ¹⁹ Drummond, D.C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D.B.; Papahadjopoulos, D. *Pharmacological Reviews*. **1999**, 51, 691.
- ²⁰ Sapra, P.; Allen, T.M. *Progress in Lipid Research*. **2003**, 42, 439.
- ²¹ Crommelin, D.J.A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1984**, 73, 1559.
- ²² Kirby, C.; Clarke, J.; Gregoriadis, G. *Biochemical Journal*. **1980**, 186, 591.
- ²³ Gregoriadis, G.; Bacon, A.; Wanderley, W.C.; McCormack, Brenda. *Vaccine*. **2002**, 20, B1.
- ²⁴ Charrois, G.J.R.; Allen, T.M. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2003**, 1609, 102.
- ²⁵ Allen, T.M.; Hansen, C.B.; Kao, G.Y.; Ma, J.; Marjan, J.M.J.; Menezes, D.L.; Moase, E.H.; Qi, W.; Stuart, D. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1997**, 24, 243.
- ²⁶ Crommelin, D.J.A.; Storm, G.; Jiskoot, W.; Stenekes, R.; Mastrobattista, E.; Hennink, W.E. *Journal of Controlled Release*. **2003**, 87, 81.
- ²⁷ Mizuguchi, H.; Nakagawa, T.; Nakanishi, M.; Imazu, S.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1996**, 218, 402.
- ²⁸ Romanowski, S.A.; Chiamoni, N.S.; Lioy, V.S.; Gargini, R.A.; Viera, L.I.; Taira, M.C. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2003**, 122, 191.
- ²⁹ Cuyper, M.D.; Hødenius, M.; Lacava, Z.G.M.; Azevedo, R.B.; Silva, M.F.; Morais, P.C.; Santana, M.H.A. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2002**, 245, 274.
- ³⁰ Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B.W. *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, 240, 55.
- ³¹ Trotta, M.; Peira, E.; Debernardi, F.; Gallarate, M. *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, 241, 319.
- ³² Henriksen, I.; Vagen, S.R.; Sande, S.A.; Smistad, G.; Karlsen, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1997**, 146, 193.
- ³³ Casals, E.; Galán, A.M.; Escobar, G.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2003**, 125, 139.
- ³⁴ Lasic, D.D.; Papahadjopoulos, D. *Science*. **1995**, 267, 1275.
- ³⁵ Griese, N.; Blaschke, G.; Boss, J.; Hempel, G. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 979, 379.

-
- ³⁶ Lequaglie, C.; Giudice, G.; Massone, P.P.B.; Cataldo, I. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2000**, 16, 541.
- ³⁷ Redziniak, G. *Pathologie Biologie*. **2003**, 51, 279.
- ³⁸ Cevc G.; Blume, G. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2001**, 1514, 191.
- ³⁹ Cevc, G. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2004**, 56, 675.
- ⁴⁰ Brisaert, M; Gabriels, M.; Matthijs, V.; Vercammen, J.P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2001**, 26, 909.
- ⁴¹ Willard, D.M.; Riter, R.E.; Levinger, N.E. *Journal of the American Chemical Society*. **1998**, 120, 4151.
- ⁴² Kishimoto, T.; Soda, Y.; Matsuyama, Y.; Mizuno, K. *Clinical Biochemistry*. **2002**, 35, 411.
- ⁴³ Lutz, J.; Augustin, A.J.; Jager, L.J.; Bachmann, D.; Brandi, M. *Life Sciences*. **1995**, 56, 99.
- ⁴⁴ Lea, C.H.; Rhodes, D.N.; Stoli, R.D. *Biochemistry Journal*. **1955**, 60, 358.
- ⁴⁵ Singleton, W.S.; Gray, M.S.; Brown, M.L.; White, J.L. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1965**, 42, 53.
- ⁴⁶ Primes, K.J.; Sanchez, R.A.; Metzner, E.K.; Patel, K.M. *Journal of Chromatography*. **1982**, 236, 519.
- ⁴⁷ Roger, B. *Process for the purification of phosphatidylcholines and products obtained*. Patent number: FR2614621, **1988**.
- ⁴⁸ Marinetti, G.V. *Journal of Lipid Research*. **1962**, 8, 181.
- ⁴⁹ Yao, K.D.; Peng, T.; Yin, Y.J.; Xu, M.X.; Goosen, M.F.A. *Macromolecular Chemical Physics*. **1995**, C35, 155.
- ⁵⁰ Methacanon, P.; Prasitsilp, M.; Pothsree, T.; Pattaraarchachai, J. *Carbohydrate Polymers*. **2003**, 52, 119.
- ⁵¹ Khor, E.; Lim, L.Y. *Biomaterials*. **2003**, 24, 2339.
- ⁵² Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, Wen. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1991**, 13, 281.
- ⁵³ Canella, K.M.N.C.; Garcia, R.B. *Química Nova*. **2001**, 24, 13.

-
- ⁵⁴ Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikama, S. *Journal of Applied Polymer Science*. **1983**, 28, 1909.
- ⁵⁵ Domard, A.; Rinaudo, M. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1983**, 5, 49.
- ⁵⁶ Prashanth, K.V.H.; Kittur, F.S.; Tharanathan, R.N. *Carbohydrate Polymers*. **2002**, 50, 27.
- ⁵⁷ Roberts, G.A.F.; Domszy, J.G. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1982**, 4, 374.
- ⁵⁸ Tsaih, M.L.; Chen, R.H. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1997**, 20, 233.
- ⁵⁹ Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P.L. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1993**, 15, 281.
- ⁶⁰ Brown, W. (ed.) *Light Scattering, Principles and Development*. Oxford: Clarendon Press, **1996**.
- ⁶¹ Zimm, B.H. *The Journal of Chemical Physics*. **1948**, 16, 12.
- ⁶² Berth, G.; Dautzenberg, H.; Peter, M.G. *Carbohydrate Polymers*. **1998**, 36, 205.
- ⁶³ Desbrières, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1996**, 19, 21.
- ⁶⁴ Varum, K.M.; Anthonsen, M.W.; Grasdalen, H.; Smidsrod, O. *Carbohydrate Research*. **1991**, 217, 19.
- ⁶⁵ Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A.N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M.D.; Gupta, A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2003**, 32, 1149.
- ⁶⁶ Moore, G.K.; Roberts, G.A. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1980**, 2, 15.
- ⁶⁷ Shigemasa, Y.; Matsuura, H. Sashiwa, H.; Saimoto, H. *Biological Macromolecules*. **1996**, 18, 237.
- ⁶⁸ Riter, R.E.; Undiks, E.P.; Levinger, N.E. *Journal of the American Chemical Society*. **1998**, 120, 6062.
- ⁶⁹ Riter, R.E.; Willard, D.M.; Levinger, N.E. *Journal of Physical Chemistry B*. **1998**, 102, 2705.
- ⁷⁰ Provencher, S.W. *Computer Physics Communication*. **1982**, 27, 229.
- ⁷¹ Pohlmann, A.R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Silveira, N.P.; Guterres, S.S. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2002**, 16, 305.
- ⁷² Hellweg, T.; Eimer, W. *Colloids and Surfaces A*. **1998**, 136, 97.

-
- ⁷³ Pereira, F.V. *Comportamento Mesomórfico, Estrutura e Ordenação de Cristais Líquidos Poliméricos em Massa e em Solução: Um Estudo Através de Espalhamento de Luz e Raios-X*. Tese de doutorado, Porto Alegre, **2004**.
- ⁷⁴ Demus, D.; Goodby, J.; Gray, G.W.; Spiess, H.W.; Vill, V. *Handbook of Liquid Crystals* (vol. 1). New York: Willey-VHC, **1998**.
- ⁷⁵ Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, 64, 83.
- ⁷⁶ Davidson, P. *Progress in Polymer Science*. **1996**, 21, 893.
- ⁷⁷ Yung, H.C.; Jenn, J.S. *Aquaculture*. **1991**, 96, 167.
- ⁷⁸ Rioux, F.; Perea, A.; Yousef, I.M.; Lévy, E.; Malli, L.; Carillo, M.C.; Tuchweber, B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1994**, 1214, 193.
- ⁷⁹ Meneses, P.; Navarro, N. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. **1992**, 102, 403.
- ⁸⁰ Merchant, T.E.; Ven, L.T.M.; Minsky, B.D.; Diamantis, P.M.; Delpaz, R.; Galicich, J.; Glonek, T. *Brain Research*. **1994**, 649, 1.
- ⁸¹ Tanford; C. *Physical Chemistry of Macromolecules* (3rd ed). New York: Wiley, **1965**.
- ⁸² Wu, C.; Zhou, S.Q.; Wang, W. *Biopolymers*. **1995**, 35, 385.
- ⁸³ Shchipunov, Y.A. *Colloids and Surfaces A*. **2001**, 183, 541.
- ⁸⁴ Cortesi, R.; Esposito, E.; Gambarin, S.; Telloli, P.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C. *Journal of Microencapsulation*. **1999**, 16, 251.
- ⁸⁵ Martindale. *The Extra Pharmacopeia* (29th ed). London: The Pharmaceutical Press, **1989**.
- ⁸⁶ Burchard, W.; Richtering, W. *Progress in Colloid and Polymer Science*. **1989**, 80, 151.
- ⁸⁷ Lide, D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (78th ed). New York: CRC Press, **1997**.
- ⁸⁸ Shchipunov, Y.A.; Shumilina, E.V. *Materials Science and Engineering C*. **1995**, 3, 43.
- ⁸⁹ Willard, D.M.; Levinger, N.E. *Journal of Physical Chemistry B*. **2000**, 104, 11075.
- ⁹⁰ Jousma, H.; Talsma, H.; Spies, F.; Joosten, J.G.H.; Junginger, H.E.; Crommelin, D.J.A. *International Journal of Pharmaceutics*. **1987**, 35, 263.

⁹¹ Skalko, N.; Bouwstra, J.; Spies, F.; Stuart, M.; Frederik, P.M.; Gregoriadis, G. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**, 1370, 151.

⁹² Pidgeon, C.; McNeely, S. *Biochemistry*. **1987**, 26, 17.