

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

CAMILA XAVIER GONÇALVES DE FIGUEIREDO

LIPOSSOMA TERMOSENSÍVEL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS ANTITUMORAIS HIDROFÍLICOS

BELO HORIZONTE

2015

CAMILA XAVIER GONÇALVES DE FIGUEIREDO

LIPOSSOMA TERMOSENSÍVEL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS ANTITUMORAIS HIDROFÍLICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Engenharia de Materiais
do Centro Federal de Educação Tecnológica de
Minas Gerais como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Roberta Viana Ferreira

Co-orientadora: Danielle Marra Silva de Azevedo

BELO HORIZONTE

2015

CAMILA XAVIER GONÇALVES DE FIGUEIREDO

**LIPOSSOMA TERMOSSENSÍVEL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS ANTITUMORAIS HIDROFÍLICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Engenharia de Materiais do Centro Federal
de Educação Tecnológica de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de
Materiais.

Aprovado em 04/12/2015

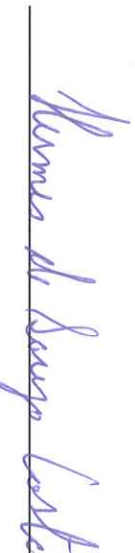
BANCA EXAMINADORA



Prof. Roberta Viana Ferreira – Orientadora, CEFET-MG



Prof. Danielle Marra Silva de Azevedo - Co-orientadora, CEFET-MG



Prof. Hermes de Souza Costa, CEFET-MG



Prof. Marcello Rosa Dumont, CEFET-MG

Dedico esse trabalho ao meu padrinho, Tio Carlinhos. Que pesquisas como esta contribuam para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para câncer e tragam esperança para pessoas como ele.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem a base da pessoa que eu sou hoje.

Ao CEFET-MG, por fazer parte da minha formação, proporcionando um ambiente criativo e amigável, e me preparar para os desafios profissionais com os quais vou me deparar.

À UFMG, pela disponibilização do espaço físico de seus laboratórios para a condução de parte dos testes realizados durante esse trabalho.

À minha orientadora, Roberta, pelo amplo suporte, correções, incentivo e contribuição para o aprimoramento do meu trabalho.

Ao Davyston, pela prestatividade e suporte nos ensaios conduzidos na UFMG.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação e auxiliaram na concretização desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Um grande número de pessoas é diagnosticado com câncer diariamente no mundo. Os tratamentos convencionais disponíveis nem sempre são eficazes no combate e cura da doença. Sendo assim, a busca por tratamentos alternativos tem sido alvo de pesquisas atuais. Dentre os diversos sistemas para liberação controlada de drogas, os lipossomas entram como dispositivo promissor devido a sua versatilidade com relação à obtenção de propriedades específicas de acordo com a composição, métodos de preparação e encapsulamento de diferentes fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos. O presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica a respeito da utilização dos lipossomas como carreadores de fármacos antitumorais, seguido do procedimento experimental utilizado para obtenção e avaliação de lipossomas contendo o fármaco antitumoral gencitabina. Os lipossomas constituídos de uma bicamada do fosfolípido DPPC e colesterol foram preparados a partir da técnica de hidratação do filme lipídico. A concentração de gencitabina e DPPC esperadas na formulação lipossomal foram 0,05mg/ml e 2,76mg/ml respectivamente. Análises por espectrofotometria UV-visível mostraram que a eficiência de aproveitamento do DPPC foi 74,52%. A mesma análise realizada para avaliar o encapsulamento do fármaco mostrou resultados inconclusivos. Medidas de DLS e potencial zeta mostraram que os lipossomas são carregados negativamente e tem diâmetro médio próximo de 181,70nm. Os testes de liberação do fármaco realizados em condições que simulam o meio fisiológico sugerem que à 37°C não há liberação significativa de fármaco. Considerando a eficiência de encapsulamento de 50%, as liberações nas temperaturas de 46°C foram de 1,92% e 12% após 48 e 72 horas respectivamente.

Palavras chave: Sistema para liberação controlada de drogas, Lipossoma, Gencitabina, DPPC.

ABSTRACT

A great number of people is diagnosed with cancer daily worldwide. In some situation, the conventional treatments are not efficient at treating and curing the disease. Hence, the searching for alternative treatments have been subject of recent research. Among several drug delivery systems, liposome are a promising device due to its versatility related to the obtention of specific properties according to the composition, formulation methods and encapsulation of diverse hydrophilic and lipophilic drugs. This work presents a bibliographic revision about the use of liposomes as antitumoral drug carriers, followed by the experimental procedure used to obtain and evaluate the liposomes containing the antitumoral drug gemcitabine. Liposomes constituted by a bilayer of phospholipid DPPC and cholesterol were prepared using the lipidic film hydration technic. The gemcitabine and DPPC expected concentrations were, respectively, 0,05mg/ml and 2,76mg/ml. UV- vis spectrophotometry analysis shown that the DPPC efficiency were 74,52%. The same analysis were carried out for evaluate the drug encapsulation. However it shown inconclusive results. DLS and zeta potential measurements shown that liposomes were negatively charged and presented average diameter close to 181,70nm. The drug release assay carried out in conditions that simulate the fisiological environment suggested that there is no significant release at 37°C. At 46°C it was observed a 1,92% release after 48 hours and 12% release after 72 hours.

Key words: Drug delivery system, Liposome, Gemcitabine, DPPC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Concentração de um fármaco seguida de absorção do agente terapêutico em função do tempo.....	17
Figura 2 - Esquema de dispositivo transdérmico para liberação controlada de drogas..	18
Figura 3 - Esquema de sistema osmótico de liberação controlada de drogas.....	18
Figura 4 - Tipos de materiais encapsulantes.....	19
Figura 5 - Estrutura básica de um dendrímero.....	20
Figura 6 - Estrutura esquemática de lipossoma e micela.	22
Figura 7 - Lipossomas multilamelares e unilamelares pequenas e grandes.....	24
Figura 8 - Características estruturais dos vários tipos de lipossomas.....	26
Figura 9 - Formação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação de filme lipídico.....	27
Figura 10 - Liberação de gencitabina por lipossomas termossensíveis (A) lipossoma encapsulando doxorrubicina, (B) lipossoma encapsulando gencitabina.	29
Figura 11 - Fórmula molecular do cloridrato de gencitabina.	36
Figura 12 - Esquema do procedimento experimental.	39
Figura 13 - Curva de Calibração do DPPC.....	42
Figura 14 - Espectros FTIR para (A) colesterol, (B) DPPC e (C) lipossoma.	45
Figura 15 - Distribuição de tamanho por intensidade.	47
Figura 16 - Evolução do diâmetro hidrodinâmico médio.	48
Figura 17 - Evolução potencial zeta.	48
Figura 18 - Varredura da amostra de gencitabina (solvente TBS).....	50
Figura 19 - Estrutura química Tris	50
Figura 20 - Curva de calibração da gencitabina para $\lambda=267,5\text{nm}^{-1}$	51
Figura 21 - Quantificação gencitabina.	52
Figura 22 - Cinética de liberação controlada do fármaco.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de casos de câncer agrupado por sexo.	14
Tabela 2 - Fosfolídeos constituintes de lipossomas.....	23
Tabela 3 - Posologia de gencitabina.	37
Tabela 4 - Amostras UV-vis para quantificação de DPPC.	42
Tabela 5 - Concentrações de soluções de gencitabina utilizadas na confecção da curva de calibração.	43
Tabela 6 - Absorção referente ao fosfolípido DPPC nas Soluções Lip/Gen no UV-visível.	49
Tabela 7 - Absorbância UV à 267,50nm das amostras de gencitabina com concentrações conhecidas.....	51
Tabela 8 - Absorção amostras liberação controlada.	53
Tabela 9 - Concentração amostras liberação controlada.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACS – *American Cancer Society* (Associação Americana de Câncer)
- DLS – *Dynamic light scattering* (Espalhamento dinâmico de luz)
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina
- DPPS – Dipalmitoilfosfatidilserina
- DSPC – Diestearoilfosfatidilcolina
- DSPE-MPEG – N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol)-diestearoilfosfatidiletanolamina
- FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia infravermelho com transformada de fourier)
- LUV – *Large unilamellar vesicles* (Vesículas unilamelares grandes)
- MLV – *Multilamellar vesicles* (Vesículas multilamelares)
- PDI – *Polydispersity index* (Índice de polidispersividade)
- PEG – Polietilenoglicól
- PGA – Ácido poliglicólico
- pH – Potencial hidrogeniônico
- PLA – Ácido polilático
- PLGA – Ácido poli(lático-co-glicólico)
- RNA – Ácido ribonucleico
- SBF – *Simulated body fluid* (Fluido corporal simulado)
- SUV – *Small unilamellar vesicles* (vesículas unilamelares pequenas)
- TBS – *Tris buffered saline*
- T_c – Temperatura crítica de transição de fase
- UV – Ultra violeta
- w – Peso molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Câncer	13
3.2	Tratamentos para câncer.....	15
3.3	Sistemas para liberação controlada de fármacos	16
3.4	Lipossomas	22
3.4.1	<i>Classificação dos lipossomas</i>	<i>24</i>
3.4.2	<i>Métodos de preparação dos lipossomas</i>	<i>26</i>
3.4.3	<i>Encapsulamento de fármacos em lipossomas</i>	<i>28</i>
3.4.4	<i>Estabilidade dos lipossomas</i>	<i>32</i>
3.4.5	<i>Aplicações terapêuticas dos lipossomas.....</i>	<i>33</i>
3.4.6	<i>Formulações lipossomais comerciais</i>	<i>35</i>
3.5	Gencitabina	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Formulação lipossomal	39
4.2	FTIR	40
4.3	Espalhamento dinâmico de luz e medidas de potencial zeta	40
4.4	Espectrofotometria UV-visível	41
4.4.1	<i>Quantificação do DPPC.....</i>	<i>41</i>
4.4.2	<i>Quantificação da gencitabina</i>	<i>43</i>
4.5	Liberação controlada	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1	FTIR	45
5.2	Espalhamento dinâmico de luz e medidas de potencial zeta	46
5.3	Quantificação de DPPC	49
5.4	Curva de calibração da gencitabina	49
5.5	Quantificação de gencitabina	52
5.6	Liberação controlada	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

1 INTRODUÇÃO

Segundo a *American Cancer Society* (ACS) (2014), um número expressivo de pessoas tem sido vítima de câncer no mundo. Esses números são cada vez mais alarmantes e os tratamentos disponíveis nem sempre são eficazes para a cura dos doentes, podendo gerar efeitos colaterais nocivos a tecidos saudáveis. Por esse motivo, muitos estudos a respeito de técnicas alternativas de tratamento têm ganhado espaço. Nesse contexto, entram os sistemas para liberação controlada de fármacos, os quais têm sido estudados para utilização com fármacos antitumorais (COSCO et al., 2012; DEBETS et al., 2013).

A gencitabina é um fármaco antineoplásico hidrofílico amplamente utilizado para o tratamento de cânceres de bexiga, pâncreas e mama, apresentando peculiaridades quanto ao modo de aplicação, dosagem e tempo de administração para o tratamento de cada tipo de neoplasia (GEMZAR, 2013). De maneira geral, a utilização desse fármaco na quimioterapia apresenta resultados efetivos no combate ao câncer, porém existem limitações quanto à dosagem e à frequência de exposição ao fármaco, uma vez que esse tipo de tratamento não distingue células saudáveis das cancerígenas. Dessa maneira, uma desvantagem da utilização de gencitabina como fármaco quimioterápico é a toxicidade sistêmica observada (ACS, 2014).

Uma técnica alternativa de utilização da gencitabina é seu encapsulamento em lipossomas. Os lipossomas são vesículas constituídas de bicamadas fosfolipídicas envolvendo um compartimento aquoso central. É possível encapsular fármacos hidrofílicos neste compartimento aquoso e fármacos lipofílicos entre as camadas de fosfolipídeos. O encapsulamento de fármacos em lipossomas é considerado um dispositivo de liberação controlada promissor, uma vez que é possível direcionar os lipossomas para o local carente de tratamento, minimizando os efeitos prejudiciais às células saudáveis e otimizando o consumo do fármaco (COSCO et al., 2012; KNEIDL et al., 2014).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo preparar dispositivos de liberação controlada de drogas baseados em lipossomas contendo fármaco hidrofílico encapsulado. Como objetivos específicos pode-se citar:

- a) Formular lipossomas utilizando colesterol e fosfolípídeo DPPC.
- b) Realizar o encapsulamento do fármaco gencitabina.
- c) Avaliar a estabilidade e efetividade de encapsulamento desse sistema.
- d) Avaliar a cinética de liberação do fármaco.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer

O câncer é causa da morte de um número expressivo de pessoas no mundo (DEBETS, et. al., 2013). Algumas células cancerígenas têm início com a proliferação de células de maneira incontrolada devido a mutações em seu DNA. Tais alterações no material genético, diferentemente do ciclo natural das células saudáveis, podem fazer com que células cancerígenas cresçam indiscriminadamente, de maneira que as taxas de crescimento e morte celular estejam em desequilíbrio. Dessa maneira, forma-se um tumor, o qual pode invadir tecidos adjacentes e migrar para outros tecidos saudáveis (metástase). De maneira geral, as modificações no DNA são resultado de erros durante a reprodução de células saudáveis, podendo decorrer de predisposição genética ou por influência de fatores ambientais externos (ACS, 2015; BROCHADO, 2013; GUIMARÃES, 2008).

O câncer é mais frequentemente causado por fatores ambientais do que pela predisposição biológica do indivíduo. Existe uma grande variedade de fatores de risco já conhecidos, os quais são passíveis de prevenção, na maior parte dos casos. Os principais fatores de risco incluem tabagismo, infecções e dieta (ACS, 2015).

Outros fatores, como exposição à radiação ultravioleta (UV) e a poluentes, também podem levar ao desenvolvimento de câncer. Estima-se que a radiação UV advinda do sol e a radiação UV artificial cause 230 mil casos de melanoma (câncer de pele), os quais conduzem a 55 mil mortes mundialmente por ano. Com relação aos poluentes, trabalhadores dos setores industriais são submetidos diariamente a substâncias ou particulados finos carcinogênicos (ACS, 2015).

De acordo com a ACS (2012), o tipo de câncer mais comumente diagnosticado em homens no Brasil é o de próstata, enquanto na população feminina, o mais comum é o câncer de mama. No estado de São Paulo, o câncer é a terceira causa mais frequente de morte considerando os dois sexos, e a segunda se considerado somente o sexo feminino (GUIMARÃES, 2008). A Tabela 1 apresenta a incidência dos tipos de câncer mais frequentes de acordo com o sexo.

Tabela 1 - Distribuição de casos de câncer agrupado por sexo.

Sexo	Tipo de câncer	Incidência (%)
Feminino	Mama	26,3
	Pele	21,3
	Órgãos genitais femininos	19,4
	Órgãos digestivos	11,6
	Aparelho respiratório	4,3
	Sistema hematopoiético	3,6
	Tireóide/ outras glândulas	2,4
	Lábio/ cavidade oral/ faringe	2,2
	Olho/ cérebro e outros do SNC	1,8
	Outros	7,1
Masculino	Órgãos genitais masculinos	22,1
	Pele	19,5
	Órgãos digestivos	18,0
	Aparelho respiratório	11,8
	Lábio/ cavidade oral/ faringe	10,1
	Sistema hematopoiético	4,4
	Trato urinário	4,0
	Olho/ cérebro e outros do SNC	2,2
	Linfonodos	2,2
	Outros	5,8

Fonte: Adaptado de GUIMARÃES, 2008, p. 74.

Em cerca de 80% dos casos, o processo patológico da neoplasia só é identificado em estágios muito avançados, quando a doença é incurável e o tratamento, paliativo. O câncer representa um grande problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano, cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Dada a crescente incidência da doença, fica evidente a importância de se conscientizar a população em geral para a prevenção, além de dar acesso a serviços de saúde eficientes. A efetivação desses fatores leva à detecção do câncer em estágios iniciais, quando ele pode ser efetivamente tratado e curado (GUIMARÃES, 2008).

3.2 Tratamentos para câncer

Dentre os tratamentos para câncer mais comumente utilizados, pode-se citar cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Esses tratamentos podem ser utilizados individualmente ou combinados dependendo do tipo e estágio em que se encontra o câncer (ACS, 2014).

A cirurgia pode ser utilizada em uma variedade de situações. A maioria das pessoas com câncer serão submetidas a algum tipo de cirurgia e este método oferece as maiores chances de cura, especialmente se o câncer não tiver resultado em metástase. Todo tipo de procedimento médico tem riscos e as cirurgias não são uma exceção. Ainda que os avanços em técnicas cirúrgicas e o melhor entendimento de como prevenir infecções impliquem em cirurgias mais modernas, seguras e com menor potencial para causar danos à saúde do paciente, sempre há risco envolvido. Os riscos dependem de fatores como o tipo da cirurgia, a experiência do cirurgião, a extensão da cirurgia, o tipo de anestesia administrada e o estado de saúde geral do paciente. Durante a cirurgia podem ocorrer complicações como sangramentos, dano a tecidos adjacentes e reações a fármacos. Após a cirurgia é comum que o paciente sinta dor, e pode ainda ocorrer infecções, sangramentos, coágulos sanguíneos e recuperação muito lenta das funções corporais (ACS, 2014).

A quimioterapia consiste no uso de medicamentos com administração oral de pílulas, líquidos, além da possibilidade de administração intravenosa, para tratar o câncer. Existem mais de 100 fármacos disponíveis para utilização no tratamento quimioterápico, os quais são escolhidos de acordo com o tipo e o estágio do câncer que se pretende tratar. A quimioterapia pode ser utilizada para impedir que o câncer se espalhe, reduzir seu crescimento, matar células cancerígenas que tenham produzido metástase, aliviar sintomas como a dor causada pelo câncer ou ainda curar a doença. A quimioterapia produz ação para matar qualquer célula que apresente ritmo elevado de crescimento, ainda que esta não seja uma célula cancerígena. Como consequência, ela pode causar efeitos colaterais como náusea, vômito, perda de cabelo, feridas na boca e garganta, irritações na pele, diminuição do desejo sexual, infertilidade, mudanças na habilidade de memorizar, concentrar e pensar, além de alterações emocionais. Podem ainda ocorrer mudanças na medula óssea, o que resulta em decaimento da contagem de células sanguíneas acarretando consequências negativas à saúde do doente. O decaimento de glóbulos vermelhos resulta em anemia, dificuldade de respirar, fraqueza e fadiga. A queda de glóbulos brancos acarreta uma depressão do sistema imunológico e a diminuição das plaquetas gera dificuldade na coagulação (ACS, 2014; DEBETS et al., 2013).

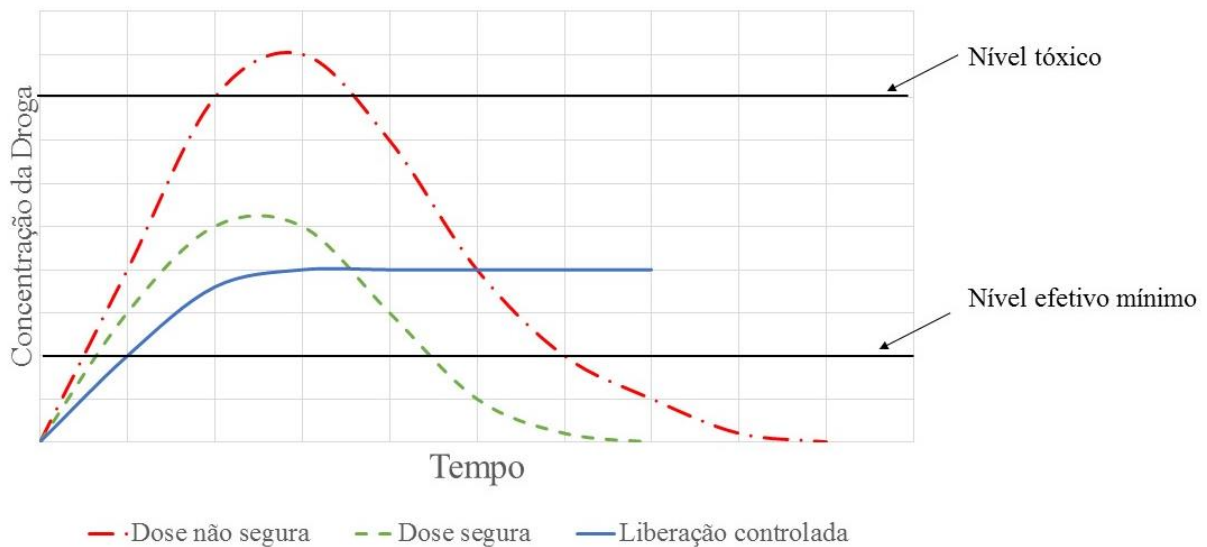
A procura por novos fármacos antitumorais mais efetivos para o tratamento do crescente número de pacientes é um dos desafios da medicina moderna. Os tratamentos de quimioterapia para câncer são geralmente limitados por toxicidade sistêmica adversa, a qual limita as doses de fármacos que podem ser administradas, considerando fatores como a resistência e metabolismo do fármaco em meio biológico, além da inacessibilidade ao alvo (SHARMA et al., 2006).

A radioterapia consiste na aplicação de altas doses de partículas ou ondas de alta energia com o objetivo de destruir ou causar danos às células cancerígenas. Diferentemente da quimioterapia, a radioterapia trata somente a região do tumor. A radiação aplicada afeta somente a parte do corpo que está sendo tratada e regiões adjacentes, enquanto os medicamentos utilizados na quimioterapia afetam todo o corpo. A aplicação de radiação pode ser feita através de uma máquina externa (teleterapia), de maneira que exista uma distância física entre o paciente e a fonte de radiação, ou por meio de objetos implantados em contato direto com o tecido (braquiterapia), os quais podem ser temporários (retirados depois de certo tempo) ou permanentes (a radiação fornecida vai diminuindo continuamente e o objeto permanece no corpo). Os efeitos colaterais mais comuns da radioterapia são fadiga, alterações na pele e perda de apetite. Outros efeitos colaterais são dependentes do local onde a radiação é aplicada (por exemplo, radiação na cabeça pode causar perda de cabelo; radiação no peito pode causar tosse ou dor de garganta). Existe uma preocupação em relação aos efeitos da radioterapia a longo prazo, os quais tem relação com as doses de radiação utilizadas (ACS, 2014; GUIMARÃES, 2008).

3.3 Sistemas para liberação controlada de fármacos

Sistemas para liberação controlada de fármacos são, de maneira geral, dispositivos capazes de encapsular fármacos em cavidades internas ou por meio de ligação com posterior liberação em presença de algum estímulo, seja temperatura, ligação enzimática ou ainda degradação (HELLER in RATNER et al., 2012). No desenvolvimento de sistemas para liberação controlada de fármacos, o direcionamento efetivo de agentes terapêuticos para órgãos específicos, tecidos ou tumores tem sido alvo de pesquisas atuais, visando a melhora dos índices terapêuticos e redução de efeitos colaterais (ZHAO et al., 2011). A Figura 1 apresenta a cinética de liberação de drogas considerando o nível efetivo mínimo e o nível tóxico da concentração da droga.

Figura 1 – Concentração de um fármaco seguida de absorção do agente terapêutico em função do tempo.



Fonte: Próprio autor.

A aplicação de doses únicas apresenta desvantagens, uma vez que o nível do fármaco no plasma sobe rapidamente e, em seguida, decai exponencialmente devido à metabolização ou eliminação da droga. A alta concentração do fármaco pode produzir efeitos colaterais indesejados. Caso seja aplicada uma dosagem muito baixa, essa pode não ser eficaz. A diferença apresentada na Figura 1 entre o nível tóxico e o nível efetivo mínimo é chamado índice terapêutico (HELLER in RATNER et al., 2012).

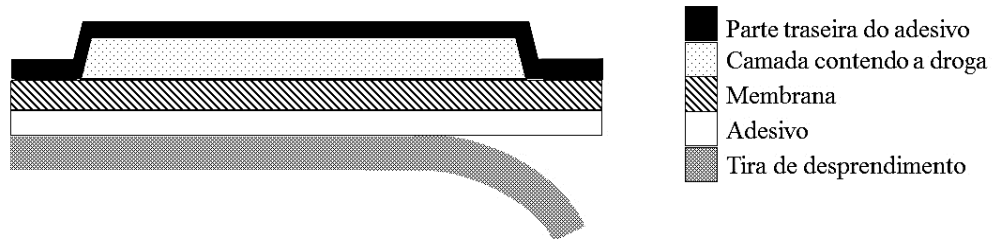
Com o objetivo de melhorar a seletividade e eficiência dos tratamentos para tumores, tem-se realizado diversas investigações a fim de se criar sistemas de liberação que transportem e liberem o fármaco no local desejado correspondente à região do tumor, prevenindo a exposição do tecido saudável, além de prolongar a ação desses agentes terapêuticos e minimizar a frequência entre as administrações. Um meio de aumentar a seletividade consiste na funcionalização desses sistemas com agentes como anticorpos e proteínas que interagem somente com receptores específicos da superfície de células cancerígenas e não com o tecido saudável (DEBETS, et. al., 2013; SHARMA et al., 2006; HELLER in RATNER et. al., 2012).

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de liberação da seguinte maneira:

- Difusão controlada (sistemas de reservatório e monolíticos): O agente está contido em um núcleo envolto por uma fina membrana polimérica ou disperso na matriz de um polímero e a liberação ocorre por meio da difusão através da membrana ou matriz.

Comercialmente, a aplicação mais comum de sistemas de difusão controlada são as transdérmicas, utilizadas por exemplo para liberação de anticoncepcionais (HELLER in RATNER et al., 2012). A Figura 2 apresenta um dispositivo transdérmico controlado por membrana.

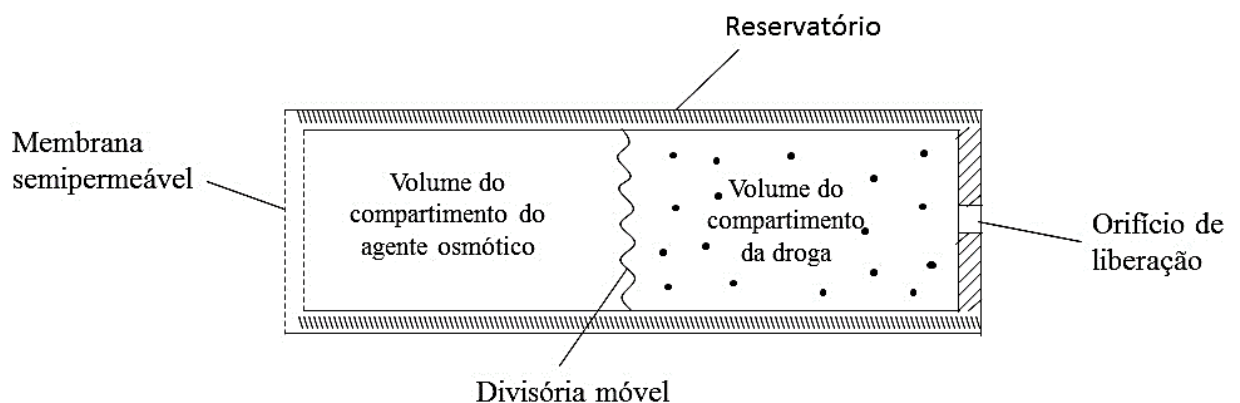
Figura 2 - Esquema de dispositivo transdérmico para liberação controlada de drogas.



Fonte: FONTE: Adaptado de HELLER in RATNER et. al., 2012.

- b) Penetração de água controlada (sistemas osmótico e de intumescimento controlados): a taxa de liberação é controlada pela taxa de difusão de água para dentro do dispositivo. Esse dispositivo é composto por um reservatório rígido contendo um agente osmótico e o fármaco a ser liberado, separados por uma divisória móvel. Uma das paredes desse reservatório é uma membrana semipermeável, a qual, em ambiente aquoso, permite a passagem de água, resultando em um aumento do volume no compartimento osmótico e, conseqüentemente, pressão na divisória móvel, a qual força a saída do fármaco pelo orifício de liberação (HELLER in RATNER et al., 2012). A Figura 3 representa um sistema osmótico.

Figura 3 - Esquema de sistema osmótico de liberação controlada de drogas.



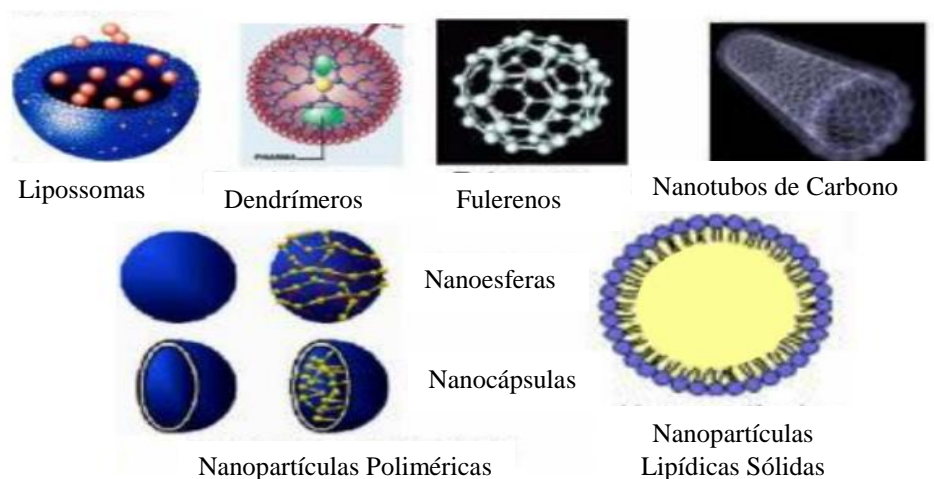
Fonte: FONTE: Adaptado de HELLER in RATNER et. al., 2012.

- c) Controlado quimicamente (sistemas de reservatório e monolítico biodegradáveis ou esqueleto polimérico biodegradável com drogas em grupos laterais): o agente encontra-se recoberto por uma membrana polimérica biodegradável de maneira que a taxa de liberação é controlada pela difusão através da membrana e posteriormente esta é decomposta (HELLER in RATNER et al., 2012).
- d) Responsivo química e fisicamente – temperatura, solventes, pH, íons –, mecanicamente, magneticamente, por ultrassom ou bioquimicamente: taxa de liberação é controlada por um fator ambiental externo, por exemplo, a temperatura, solventes, pH. Como exemplo, pode-se citar hidrogéis de N-isopropilacrilamida, os quais respondem à mudança de temperatura devido à transição de fase que ocorre à 31°C (HELLER in RATNER et al., 2012).
- e) Particulados: Micropartículas, polímeros conjugados com drogas, sistemas poliméricos de micelas, sistemas de lipossomas, conforme apresentado na Figura 4 (HELLER in RATNER et al., 2012).

A Figura 4 apresenta alguns tipos de material encapsulante, os quais podem ser utilizados em sistemas de liberação controlada (BROCHADO, 2013).

Independentemente do tipo, os sistemas de liberação devem apresentar estabilidade e serem capazes de carregar uma quantidade considerável de moléculas ativas, as quais são protegidas do ambiente externo. Além disso, esses sistemas não devem ser reconhecidos rapidamente pelo sistema imune, evitando sua eliminação prematura do organismo (DEBETS et al., 2013; KNEIDL, 2014).

Figura 4 - Tipos de materiais encapsulantes.

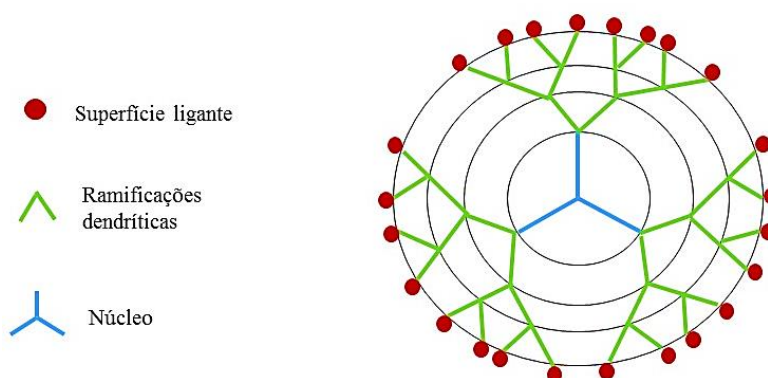


Fonte: Adaptado de BROCHADO, 2013.

Nanopartículas poliméricas são capazes de encapsular diversos fármacos e liberá-los de forma controlada por meio da difusão das moléculas do fármaco através de uma matriz polimérica ou pela dissolução de camadas diferenciais da superfície de revestimento ou erosão em massa das partículas. Podem ser orientadas, incorporando ligantes-alvo em sua formulação, de maneira a aumentar sua taxa de absorção, melhorando os resultados terapêuticos obtidos. Os polímeros mais utilizados para aplicações de liberação controlada de fármacos são ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA), ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) devido as suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação, que favorecem sua excreção do organismo através de sistemas metabólicos após terminada a liberação (BROCHADO, 2013).

Dendrímeros são moléculas poliméricas em escala nanométrica compostas por múltiplas unidades funcionais ramificadas que emergem radialmente a partir de um núcleo central, como representado na Figura 5 (BROCHADO, 2013).

Figura 5 - Estrutura básica de um dendrímero.



Fonte: Próprio autor.

O alto nível de controle sobre a estrutura dendrítica (tamanho, funcionalidade das ramificações e densidade de superfície) permite que fármacos de tamanho molecular reduzido com atividade anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana possam ser conjugados com êxito a dendrímeros de poli (amidoamina), poli (propileno-imina) e poli (éter-hidroxilamina) através de interações físicas ou ligações químicas. Os dendrímeros tem sido aplicados em terapia oncológica, particularmente para veiculação de cisplatina, com resultados significativos (BROCHADO, 2013).

As nanopartículas à base de proteína formam potenciais sistemas coloidais para a veiculação de fármacos. Sua formulação tem como ponto de partida albuminas de soro humano e bovino, gelatina (fibras colágenas) e proteínas de origem vegetal (gliadina extraída do glúten).

Esse tipo de nanopartículas apresenta características de interesse para aplicação no meio biológico por serem biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicos, não imunogênicos, metabolizáveis e facilmente adaptáveis à conjugação com ligantes e fármacos, através da modificação da superfície (BROCHADO, 2013).

Nanopartículas superparamagnéticas exibem atividade magnética somente quando expostas a um campo magnético externo. Uma vez retirado, observa-se a dissipação de qualquer magnetismo residual. Em geral, utiliza-se partículas de óxido de ferro, devido à sua disponibilidade, baixo custo, facilidade de preparo e estabilidade, revestidas por polímeros como o dextrano, melhorando a estabilidade e biocompatibilidade da nanopartícula superparamagnética. Têm sido aceitas para aplicações como agentes de imagem multimodais e sistemas de liberação controlada de fármacos. No entanto, estudos tem sido feitos para avaliar a toxicidade potencial desse tipo de nanopartícula à longo prazo (BROCHADO, 2013).

Nanopartículas cerâmicas são geralmente compostas por hidroxiapatita, zircônia, sílica, titânia ou alumina. Estudos recentes mostram que a sílica mesoporosa pode ser sintetizada em uma grande variedade de tamanhos e formas, além de apresentar elevada área superficial e estrutura de poros ajustáveis, configurando alto potencial na área terapêutica clínica. Uma desvantagem das nanopartículas cerâmicas se refere à sua grande dimensão, que limita o acesso a determinados tecidos (BROCHADO, 2013; WANG J-X. et al., 2008).

Fulerenos (forma alotrópica do carbono) e nanotubos de carbono (cilindros de carbono compostos por anéis benzênicos) são aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos e diagnóstico por imagem. No entanto, sua toxicidade é muito discutida (BROCHADO, 2013).

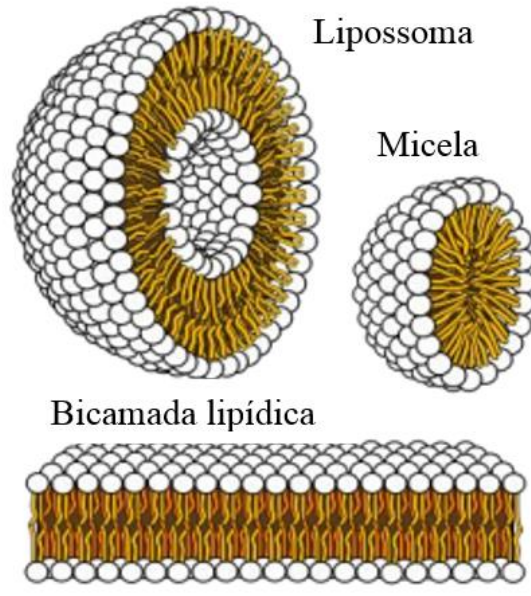
Outro sistema para liberação controlada bastante explorado na literatura e até mesmo comercialmente são as nanopartículas lipídicas. Dentre esses tipos de nanopartículas, pode-se citar micelas e lipossomas (BROCHADO, 2013).

As micelas convencionais são formadas por uma camada de hidrocarbonetos de ácidos graxos de cadeia longa, os quais possuem cabeça polar (hidrofílica) e cauda apolar (hidrofóbica). Essas moléculas são organizadas de maneira a formar vesículas esféricas cujo núcleo é hidrofóbico, possibilitando o encapsulamento de fármacos lipofílicos (BROCHADO, 2013).

Lipossomas, por sua vez, são constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por um meio aquoso, podendo encapsular fármacos hidrofílicos (no compartimento aquoso central) e/ou fármacos lipofílicos (inseridos ou adsorvidos na

membrana) (BROCHADO, 2013; CHANG e YEH, 2012). A Figura 6 apresenta esquematicamente a estrutura de micelas e lipossomas.

Figura 6 - Estrutura esquemática de lipossoma e micela.



Fonte: Adaptado de BROCHADO, 2013.

3.4 Lipossomas

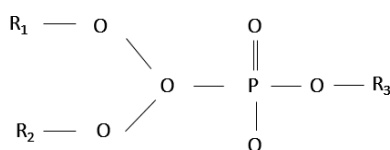
Cristais líquidos foram preparados espontaneamente por Bangham em 1965, após dispersão de lecitina em meio aquoso. Ainda que os resultados iniciais *in vivo* tenham sido promissores, o desenvolvimento propriamente dito dos lipossomas ocorreu em 1982 e desde então têm se mostrado como ferramenta versátil nas áreas biológica, bioquímica e médica (SHARMA et al., 2006; CHANG e YEH, 2012; KNEIDL et al., 2014).

Lipossomas são vesículas esféricas, microscópicas constituídas por membrana com uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso, como representado na Figura 6. Essas vesículas podem ser utilizadas como carreadores de fármacos, além de encapsular uma variedade de moléculas tais como proteínas, nucleotídeos, plasmídeos, vírus, dentre outros compostos biologicamente ativos. O compartimento aquoso dos lipossomas pode ser utilizado para encapsular fármacos hidrofílicos, enquanto fármacos lipofílicos podem ser incorporados no interior da parede da membrana. A constituição básica dos lipossomas são fosfolipídeos (naturais ou sintéticos), esteróis e antioxidantes, e essas

vesículas são geralmente classificadas como biocompatíveis (SHARMA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; KNEIDL et al., 2014, CHANG e YEH, 2012).

Os fosfolípidos apresentam uma temperatura crítica de transição de fase (T_c), na qual a membrana passa de uma fase gel (onde a cadeia encontra-se ordenada) para uma fase de cristal líquido (onde as moléculas apresentam movimentos livres e os radicais hidrofílicos agrupados se tornam completamente hidratados). T_c é influenciada pelo comprimento e saturação da cadeia lipídica, portanto, diferentes membranas apresentarão diferentes níveis de fluidez quando submetidos à mesma temperatura. A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa a temperaturas abaixo de T_c (BATISTA et al., 2007; KNEIDL et al., 2014). A Tabela 2 apresenta alguns dos fosfolípidos utilizados na formulação de lipossomas e suas respectivas T_c .

Tabela 2 - Fosfolípidos constituintes de lipossomas.



Fosfolípido (R ₃)	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo (R ₁ , R ₂)	Nomenclatura e abreviatura	T _c (°C)	Carga
	CH ₃ (CH ₂) ₇ CHCH(CH ₂) ₇ O	Dioleifosfatidilcolina (DOPC)	<0	Anfótera
Fosfatidilcolina (PC)	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CO	Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	23	Anfótera
CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	42	Anfótera
	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	Diesteroilfosfatidilcolina (DSPC)	55	Anfótera
Fosfatidiletanolamina (PE)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CHCH(CH ₂) ₇ O	Dioleifosfatidiletanolamina (DOPE)	<0	Anfótera
CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	Diesteraroilfosfatidiletanolamina(DSPE)	74	Anfótera
Fosfatidilglicocol (PG)	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CO	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	13	Negativa
CH ₂ CHOHCH ₂ OH	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO	Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	35	Negativa
Fosfatidilserina (PS)	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	79	Negativa
CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	Diesteraroilfosfatidilserina (DSPS)	79	Negativa

Fonte: Adaptado de BATISTA et al., 2007.

Os fosfolípidos mais utilizados nas formulações lipossomais são os que apresentam forma cilíndrica, tendendo a formar uma bicamada estável em solução aquosa. Como exemplos, podem ser citadas fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline. As fosfatidilcolinas são as mais aplicadas em estudos de formulação de lipossomas por

apresentarem grande estabilidade frente a variações de pH e concentração de sal no meio (BROCHADO, 2013).

A versatilidade dos sistemas para liberação de fármacos utilizando lipossomas deve-se ao fato de que suas propriedades, tais como tamanho das vesículas, quantidade de camadas, carga da superfície e fluidez da membrana, podem ser modificadas pela composição lipídica ou método de preparação da membrana. Os lipossomas entram como uma alternativa altamente versátil para pesquisa terapêutica e aplicações analíticas por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (BATISTA et al., 2007; SHARMA, et al., 2006; COSCO et al., 2012; KNEIDL et al., 2014).

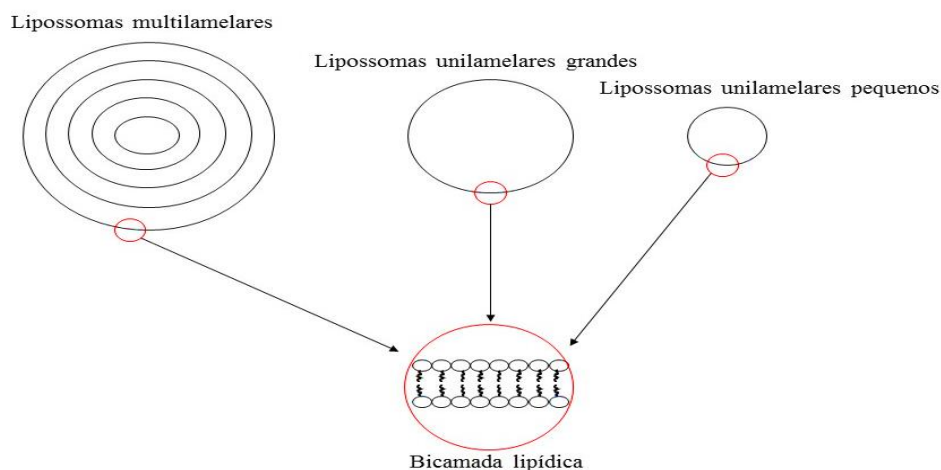
3.4.1 Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com a quantidade de camadas, tamanho das vesículas, método de preparação, ou ainda quanto as características de interação com sistemas biológicos.

Quanto à quantidade de lamelas, os lipossomas podem ser unilamelares ou multilamelares (BATISTA et al., 2007).

Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas (small unilamellar vesicles - SUV), variando de 15nm a 25nm, ou grandes (large unilamellar vesicles - LUV), possuindo diâmetros na ordem de 100nm. Já as vesículas multilamelares (multilamellar vesicles - MLV) podem variar de 100nm a 1000nm (BATISTA et al., 2007; BRAGA, 2010; GIUBERT, 2007). A Figura 7 apresenta esquematicamente as vesículas multi e unilamelares citadas.

Figura 7 - Lipossomas multilamelares e unilamelares pequenas e grandes.



Quanto as características de interação com sistemas biológicos para utilização como carreadores de fármacos, os lipossomas podem ser classificados como se segue:

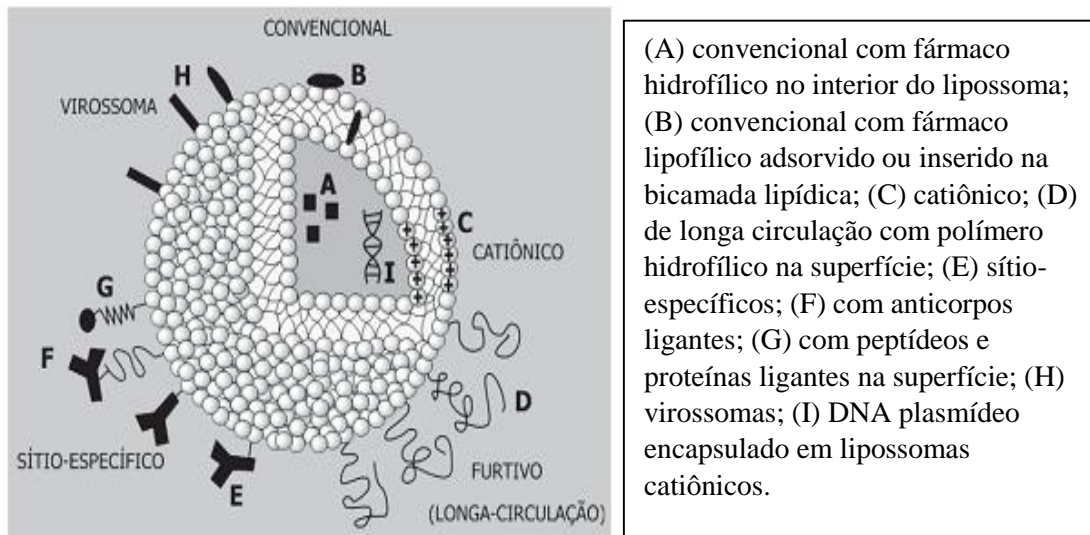
- a) Lipossomas convencionais são constituídos de fosfolipídeos, colesterol e um lipídeo com carga positiva ou negativa para melhorar a dispersão das vesículas, aumentando a sua estabilidade em suspensão. Uma vez no sistema biológico, os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, resultando em rápida remoção das vesículas da circulação (BATISTA et al., 2007).
- b) Lipossomas de longa duração são obtidos a partir do revestimento da superfície lipossomal utilizando componentes hidrofílicos naturais (monossialogangliosídeo ou fosfatidilinositol) ou sintéticos (polietilenoglicóis - PEG). Essa camada hidrofílica superficial dificulta o reconhecimento e associação de opsoninas no plasma, inibindo o processo de reconhecimento molecular e captura pelo sistema fagocitário mononuclear (BATISTA et al., 2007).
- c) Lipossomas sitio-específicos foram desenvolvidos na tentativa de aumentar a especificidade da interação de lipossomas com células alvo e elevar a quantidade de fármaco liberado. Utilizam ligantes acoplados a sua superfície, como anticorpos, os quais conferem seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação. Como exemplos, pode-se citar as imunolipossomas (imunoglobulinas da classe IgG são ligantes mais utilizados); carreadores de proteínas e peptídeos (compostos biologicamente ativos de origem protéica ou peptídica – enzimas, hormônios peptídicos ou citocinas); virossomas (hemaglutina na superfície – liga-se a resíduo de ácido siálico – potencializa o efeito de vacinas encapsuladas com liberação específica do antígeno) (BATISTA et al., 2007). Em geral, fragmentos de anticorpos são mais utilizados como ligantes, uma vez que a inserção de uma molécula de anticorpo inteira na superfície do lipossoma acelera sua excreção da circulação (SHARMA et al., 2006).
- d) Lipossomas polimórficos se tornam reativos devido à uma mudança na estrutura desencadeada por alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática (BATISTA et al., 2007).
- e) Lipossomas sensíveis ao pH são utilizados para liberar o fármaco no citoplasma ou no sítio intersticial de células tumorais, uma vez que o pH desse meio é baixo, comparado ao pH fisiológico (BATISTA et al., 2007).
- f) Lipossomas termossensíveis são formados por misturas de lipídeos sintéticos (ex: DPPC e DSPC) que possuem T_c alguns graus acima da temperatura fisiológica, a qual é

facilmente alcançada em local de hipertermia como o do tecido tumoral (KNEIDL et al., 2014).

- g) Lipossomas catiônicos apresentam carga positiva na superfície. São utilizados para liberação de ácidos nucleicos dentro da célula. Esse tipo de lipossomas é caracterizado por um alto perfil de toxicidade e rápida limpeza do sangue após aplicação intravenosa (BATISTA et al., 2007; KNEIDL et al., 2014).

A Figura 8 apresenta os vários tipos de estrutura possíveis para lipossomas, considerando sua interação com o sistema biológico.

Figura 8 - Características estruturais dos vários tipos de lipossomas.



Fonte: Adaptado de BATISTA et al., 2007.

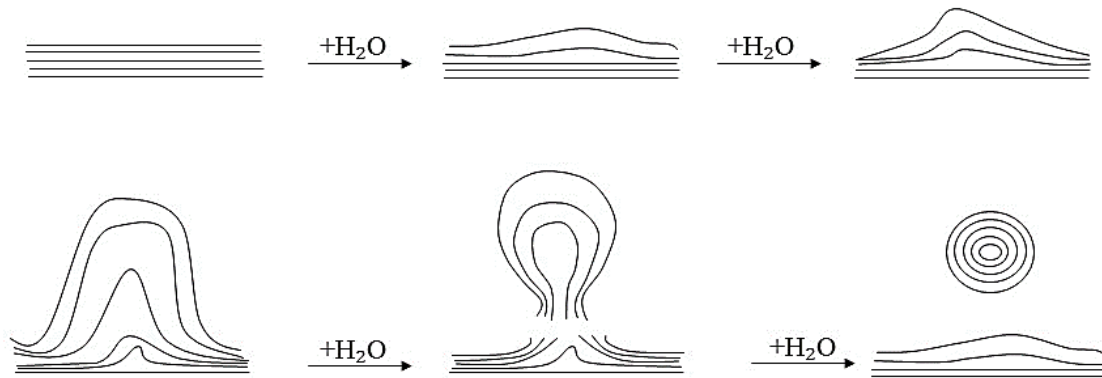
3.4.2 Métodos de preparação dos lipossomas

O encapsulamento de drogas no interior de lipossomas pode ocorrer de forma passiva ou ativa. Diversos métodos de preparação estão disponíveis no mercado. (BATISTA et al., 2007; BRAGA, 2010; TAZINA et al., 2011).

A hidratação de filme lipídico é um dos métodos de encapsulamento passivo mais utilizados. O método é dividido em duas etapas. A primeira consiste na solubilização dos lipídeos em solvente orgânico, seguido de evaporação do solvente com conseqüente formação do filme lipídico. Já a segunda etapa consiste em hidratar o filme lipídico com água ou solução tampão, sob agitação mecânica vigorosa, resultando na dispersão de lipossomas multilamelares, como ilustra a Figura 9. A vantagem desse método consiste na possibilidade de encapsular tanto

fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos. Os compostos lipossolúveis a serem incorporados na membrana são adicionados ao solvente orgânico, enquanto os compostos a serem incorporados no compartimento aquoso do lipossoma são dissolvidos na solução aquosa inicial. A desvantagem desse método consiste no baixo encapsulamento para fármacos hidrofílicos, tamanho heterogêneo das vesículas e necessidade de processamento posterior para homogeneização. É comum realizar uma pré-hidratação com solução sulfato de amônio afim de gerar um gradiente de pH e aumentar a eficiência de encapsulamento de fármacos hidrofílicos no interior do lipossoma. Além disso, o encapsulamento passivo de drogas hidrofílicas pode ser otimizado pelo processo de desidratação-reidratação pelo qual uma dispersão lipossomal é adicionada a uma solução aquosa contendo o fármaco. Posteriormente realiza-se a desidratação via liofilização, evaporação ou ciclos repetidos de congelamento-descongelamento das vesículas multilamelares afim de melhorar a hidratação e consequentemente o encapsulamento (BATISTA et al., 2007; MACHADO et al., 2007; BRAGA, 2010; COSCO et al., 2012; TAZINA et. al., 2011)

Figura 9 - Formação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação de filme lipídico.



FONTE: Próprio autor.

A partir da dispersão de MLV, diferentes métodos são utilizados para produzir dispersões homogêneas de vesículas unilamelares, sejam elas grandes ou pequenas. Os mais populares são a extrusão através de membranas de policarbonato, prensa de French ou homogeneizador/microfluidificador e a sonicação (BATISTA et al., 2007).

O método de extrusão consiste em forçar a passagem dos lipossomas através de membranas de policarbonato, de maneira que o tamanho da vesícula após a extrusão será determinado pelo tamanho do poro da membrana utilizada. Em geral, é possível obter LUV através desse método (BRAGA, 2010; COSCO et al., 2012; MACHADO et al., 2007).

O método de sonicação consiste em submeter a formulação lipossomal à irradiação ultrassônica de maneira que essa energia seja suficiente para desarranjar e rearranjar as vesículas em tamanhos mais homogêneos. A sonicação seguida de ciclos de congelamento e descongelamento é um método simples e rápido, resultando em alta proporção de SUV (BRAGA, 2010; MACHADO et al., 2007).

3.4.3 Encapsulamento de fármacos em lipossomas

Lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas (no compartimento aquoso) e/ou lipofílicas (na bicamada lipídica). A eficiência do encapsulamento de fármacos depende do método de encapsulamento e seu princípio de ação (gradiente de pH, hidratação, etc), além das propriedades químicas do lipossoma, conseqüentemente, de sua formulação (BATISTA, 2007; TAZINA et al., 2011).

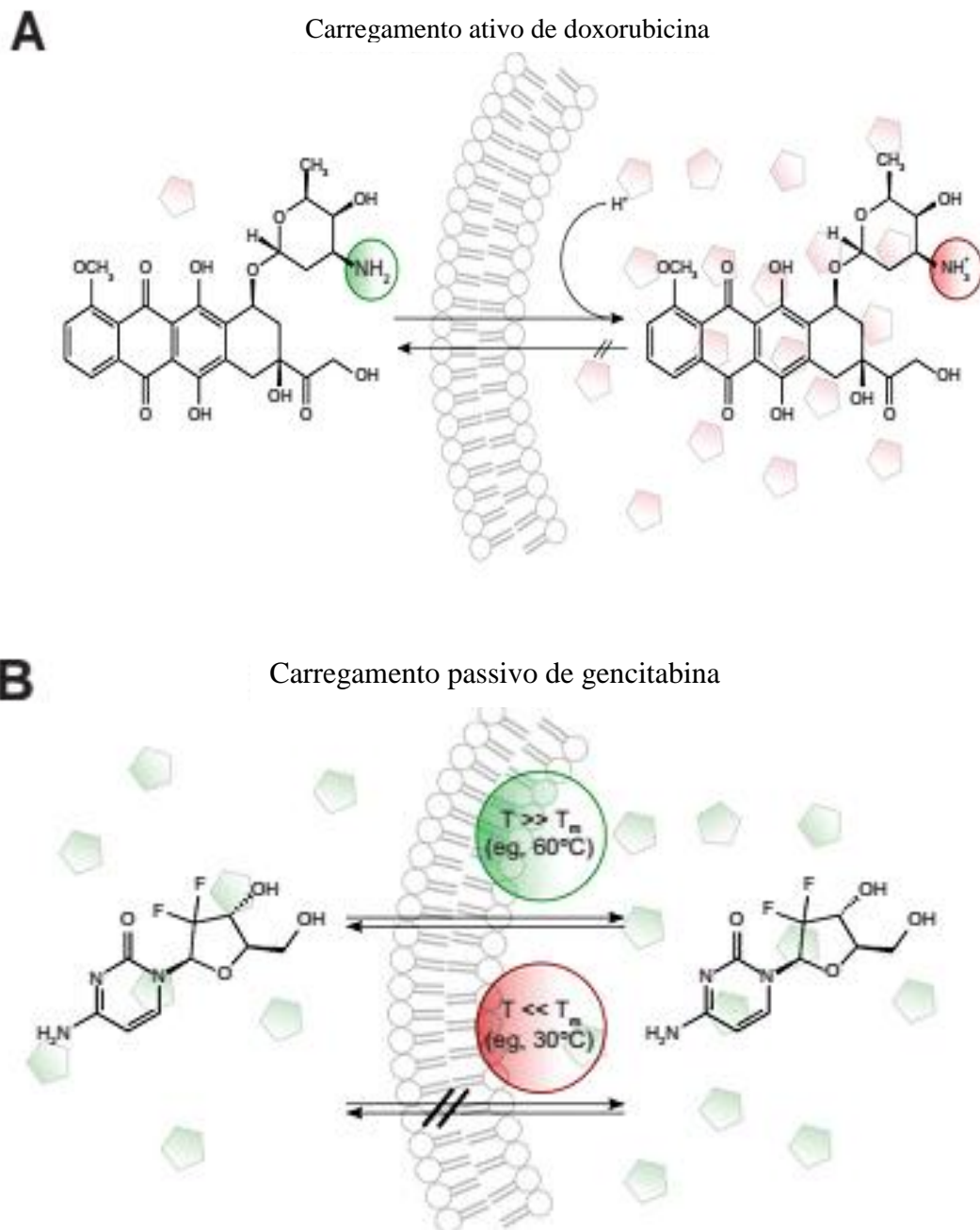
Durante a formulação dos lipossomas pelo método de hidratação de filme lipídico, compostos lipossolúveis a serem incorporados na membrana são adicionados ao solvente orgânico, enquanto os compostos a serem incorporados no compartimento aquoso do lipossoma são dissolvidos na solução aquosa inicial. A desvantagem desse método consiste na baixa encapsulação para fármacos hidrofílicos. O fármaco não encapsulado permanece no meio aquoso em torno das vesículas (BATISTA et al., 2007; BRAGA, 2010; TAZINA et al., 2011). É mais dispendioso encapsular fármacos anfifílicos em lipossomas pois eles não se ligam à bicamada lipídica e penetram rapidamente na membrana. Nesses casos, usa-se métodos de encapsulamento ativo, no qual primeiramente a vesícula é preparada e depois as moléculas de fármaco são encapsuladas utilizando um gradiente trans-membrana. Desvantagem desse método é a susceptibilidade dos lipídios a pH ácidos, bases fortes e altas temperaturas requeridas pelo processo, podendo causar hidrólise dos fosfolipídios e/ou desnaturação da droga (TAZINA et al., 2011).

A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa a temperaturas abaixo de T_c . Na temperatura crítica (T_c), a estrutura da bicamada lipídica muda de uma fase gel sólida para uma fase de líquido cristalino. A membrana passa a ser mais permeável à água e aos fármacos hidrofílicos na fase de líquido cristalino do que na fase sol-gel. A permeabilidade de fármacos hidrofílicos é maior em temperaturas próximas de T_c devido à coexistência das duas fases na membrana, resultando na formação de contornos de grão. O fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é o principal componente usado na formulação da maioria

dos lipossomas termossensíveis devido a sua T_c (42°C) ser ligeiramente acima da temperatura corporal (KNEIDL et al., 2014; BATISTA et al., 2007).

A Figura 10 apresenta exemplo do processo de encapsulamento de fármacos por lipossomas termossensíveis.

Figura 10 - Liberação de gencitabina por lipossomas termossensíveis (A) lipossoma encapsulando doxorubicina, (B) lipossoma encapsulando gencitabina.



Fonte: Adaptado de KNEIDL et al., 2014

A figura 10A apresenta o encapsulamento ativo de doxorubicina em lipossomas pré-formadas com um gradiente de pH. Na região externa ao lipossoma a droga não carregada é capaz de passar pela bicamada lipídica. No interior, a droga é protonada devido ao meio ácido e aprisionada. Esse método pode atingir uma eficiência de encapsulamento de até 98%. Na Figura 10B, o encapsulamento passivo de gencitabina é realizado a partir da incubação da droga e vesículas à temperatura em que a membrana se encontra na fase líquida, desorganizada e, portanto, permeável. Após resfriamento, a membrana fica no estado sol-gel, diminuindo sua permeabilidade. Por esse método, a eficiência de encapsulamento é baixa e a formulação deve ser purificada para separação do fármaco não encapsulado (KNEIDL et al., 2014).

Foi observado por Calvagno et al. (2007) que o tamanho médio dos lipossomas é influenciado pela composição fosfolipídica e pelo método de preparo. Lipossomas preparados pelo método de hidratação de filme lipídico seguido de dez ciclos de congelamento e descongelamento, desidratação e reidratação, formaram vesículas multilamelares com tamanho médio variando de 0,55 μ m a 7,00 μ m e índice de polidispersidade de 0,40 a 1,00, evidenciando, portanto, uma distribuição de tamanho bastante heterogênea devido à composição dos mesmos. A adição de alguns compostos à estrutura da membrana de DPPC e colesterol interferem na rigidez da vesícula e, conseqüentemente, na distribuição de tamanho. O ácido oléico aumenta a fluidez da bicamada lipídica, funcionando como ativador de borda. O dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), por sua vez, influencia o empacotamento estrutural da bicamada em função do ambiente, promovendo propriedades fusogênicas. Sendo assim, pode-se concluir que a fluidez da bicamada e as características fusogênicas podem promover a formação de agregados multivesiculares, explicando a ampla distribuição de tamanho e os altos valores de tamanho médio. Menor tamanho médio (0,55 μ m) e distribuição de tamanho reduzida (índice de polidispersidade 0,40) foram obtidos para a formulação composta por DPPC, colesterol e N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol)-diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-MPEG), devido à estrutura rígida da bicamada e à estabilidade coloidal proporcionada pelo colesterol e pelo DSPE-MPEG. A redução de tamanho não foi efetiva com a utilização de ácido oleico pelo processo de extrusão, uma vez que a fluidez da bicamada faz com que as vesículas se deformem durante a passagem pelos poros de 400nm e 200nm da membrana de PC. Por outro lado, as formulações contendo DPPS e DSPE-MPEG foram reduzidas efetivamente através de membranas com poros de 200nm e 100nm (CALVAGNO et al., 2007).

O encapsulamento de gencitabina no interior dos lipossomas também exerce influência no tamanho das vesículas. Lipossomas cuja bicamada se mostra mais flexível apresentam menor tamanho médio quando encapsulando fármacos se comparado com a vesícula vazia, uma

vez que a gencitabina interage fortemente com a cabeça polar negativa dos lipídeos. A interação do fármaco com ácido oleico leva à redução da fluidez da bicamada, resultando em agregados vesiculares, o que facilita a redução do tamanho por extrusão, explicada pelo aumento da rigidez da bicamada. Para formulações sem adição de ácido oléico, a presença da gencitabina não influenciou significativamente esses parâmetros (CALVAGNO et al., 2007).

A adição de PEG na composição de lipossomas resulta em redução considerável no valor absoluto do potencial zeta (valores próximos a zero), uma vez que os radicais de PEG protegem os grupos da cabeça polar do DPPC, caracterizando vesículas mais estáveis (CALVAGNO et al., 2007; COSCO et al., 2012).

No que diz respeito à capacidade de encapsulamento de gencitabina, os lipossomas preparados através do método de hidratação do filme lipídico apresentaram encapsulamento superior a $14\mu\text{l}/\mu\text{mol}$. A capacidade de encapsulamento foi aumentada com ciclos de congelamento e descongelamento, chegando à melhor performance após submetida à desidratação e reidratação. Esse último processo otimizou não somente a quantidade de fármaco encapsulado, mas também a interação entre gencitabina e a bicamada fosfolipídica do lipossoma. Foi observado que o encapsulamento de gencitabina no interior do lipossoma é maior quando o fármaco é adicionado no início do preparo, durante a formação do filme lipídico, e não na etapa final de desidratação e reidratação da vesícula (CALVAGNO et al., 2007). A investigação da influência da aplicação de um gradiente ácido de pH entre o interior do lipossoma e o meio externo resultou em encapsulamento de gencitabina de 94%, segundo Calvagno et al. (2007), eficiência de 90% de acordo com Cosco et al. (2012), comportamento atribuído à presença de um grupo amino protonável na molécula de gencitabina.

Considerando a composição dos lipossomas, um melhor encapsulamento foi observado para a formulação contendo DPPS, o qual interage de maneira eficaz com a gencitabina, permitindo encapsulamento de até 89% (CALVAGNO et al., 2007).

A liberação de drogas por lipossomas termosensíveis ocorre na temperatura de transição de fase da bicamada lipídica. Sendo assim, é possível controlar a liberação através do controle da composição fosfolipídica da vesícula. O DPPC é o fosfolipídio mais utilizado em formulações termosensíveis, pois sua T_c (42°C) é superior à temperatura corporal (KNEIDL et al., 2014).

3.4.4 Estabilidade dos lipossomas

A estabilidade de lipossomas pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos. A meia-vida dos lipossomas depende intimamente da sua composição e formulação final. Além disso, variações de pH favorecem a hidrólise dos lipídeos. O pH ideal para manter a estabilidade da formulação fica em torno de 6,00. Alternativas a esses problemas são a conservação dos lipossomas em atmosfera de nitrogênio e argônio, utilização de antioxidantes como alfa-tocoferol na preparação, e ainda a liofilização da formulação final com a ajuda de um crioprotetor (BATISTA et al., 2007; CHANG e YEH, 2012).

A instabilidade física é causada principalmente pela agregação e fusão das vesículas, e o extravasamento do fármaco encapsulado. Em solução, a introdução de pequena quantidade de lipídeos com carga durante a preparação, a fim de produzir uma repulsão eletrostática entre as vesículas, reduz sua agregação e fusão. A inclusão de colesterol e esfingomielina na formulação diminui a permeabilidade e o extravasamento do fármaco (diminui a fluidez da membrana) e pode ainda elevar a temperatura de transição de fase (BATISTA et al., 2007).

A instabilidade biológica depende da presença de agentes que interajam com os lipossomas, portanto estão diretamente relacionadas à via de administração. Devido à adsorção às proteínas do plasma (opsoninas) pelos fosfolipídeos da membrana, os lipossomas convencionais são reconhecidos e capturados pelo sistema fagocitário mononuclear, o qual é composto de células (macrófagos e monócitos) capazes de remover corpos estranhos da circulação sanguínea e de fornecer células fagocitárias em processos inflamatórios seguido de seu recrutamento pelas citocinas ou proteínas do sistema do complemento. Parâmetros físico-químicos como o tamanho da vesícula, natureza dos componentes lipídicos e carga elétrica da superfície influenciam na eliminação de lipossomas da circulação. A presença de carga eletrostática na superfície dos lipossomas promove a interação com biomoléculas tais como opsoninas, e células, sendo então removidos mais rapidamente da circulação. A hidrofília conferida à superfície dos lipossomas furtivos estende a meia-vida em meio biológico, uma vez que a incorporação de componentes hidrofílicos evita o reconhecimento e captura dos lipossomas pelo sistema fagocitário mononuclear. Em geral, são utilizados lipossomas unilamelares homogêneos com diâmetro variando entre 50nm e 100nm, pois essa faixa compreende uma boa eficiência de encapsulamento (aumenta com o aumento do diâmetro), estabilidade do lipossoma (cuja faixa ótima vai de 80nm a 200nm) e capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro). A incorporação de PEG nas vesículas promove redução na velocidade de fagocitose, ainda que sem inibi-la. Dessa maneira, os

lipossomas com PEG apresentam aumento da meia vida, distribuição uniforme no sangue e pequena porcentagem de captação pelo fígado (10% a 15%) se comparado aos lipossomas convencionais (80% a 90%) (BATISTA et al., 2007; GIUBERTI, 2007; MACHADO et al., 2007).

3.4.5 *Aplicações terapêuticas dos lipossomas*

Os lipossomas apresentam uma diversidade de aplicações biológicas, sendo muitas vezes utilizados no tratamento de câncer, desenvolvimento de vacinas, terapia gênica, tratamento de infecções, dentre outros.

a) Lipossomas no tratamento de câncer

A terapia convencional com fármacos antineoplásicos causa toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais. Parte das células cancerígenas tem características muito comuns às células saudáveis, das quais foram originadas. Dessa maneira, torna-se difícil encontrar um alvo único contra o qual o fármaco possa ser direcionado. Efeitos colaterais de quimioterapias limitam as doses do fármaco. Se muito baixa, essa dose pode não atingir o nível efetivo, o que pode levar à metástase ou desenvolvimento de resistência ao fármaco (HELLER in RATNER et. al., 2012).

Uma terapia alternativa para o tratamento de câncer seria o uso de lipossomas como carreadores de fármaco antitumoral, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Sendo assim, lipossomas protegem o paciente dos efeitos colaterais advindos dos fármacos antineoplásicos, uma vez que diminuem a exposição de tecidos saudáveis. Além disso, lipossomas prolongam a duração de exposição do fármaco, agindo como um reservatório de lenta liberação para diversos fármacos encapsulados, prevenindo a liberação antecipada e a inativação (COSCO et al., 2012; KNEIDL et al., 2014).

Lipossomas de longa duração podem ser passivamente direcionadas para vários tipos de tumores, pelo fato de eles poderem circular por tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada. Tumores sólidos crescentes, assim como regiões de infecção e inflamação, têm capilares com permeabilidade aumentada como resultado da angiogênese. O diâmetro dos poros desses capilares é da ordem de 100nm a 800 nm. Os lipossomas contendo fármacos podem ser preparados com tamanho variando entre 60nm e 150nm, sendo, portanto,

suficientemente pequenos para extravasar do sangue para o espaço intersticial do tumor (BATISTA et al., 2007).

O direcionamento ativo é a estratégia de acoplar um ligante específico na superfície dos lipossomas, aumentando sua seletividade de interação com as células ou tecido tumoral, através da ligação destes com marcadores específicos localizados na membrana da célula ou tecido (BATISTA et al., 2007).

b) Lipossomas no desenvolvimento de vacinas

Vacinas alternativas, focadas no desenvolvimento de adjuvantes e sistemas de liberação controlada, tem sido pesquisadas (BATISTA et al., 2007).

Normalmente, antígenos peptídicos ou protéicos são fagocitados por macrófagos e eventualmente acumulados em lisossomas. Nos lisossomas, os peptídeos degradados são apresentados ao complexo de histocompatibilidade classe II, ligado na superfície dos macrófagos, resultando na estimulação das células T-helper específicas e, finalmente, na estimulação de linfócitos B específicos, o que resulta na subsequente secreção de anticorpos (BATISTA et al., 2007).

Uma estratégia para aumentar o efeito da vacina é liberar especificamente o antígeno no órgão alvo. A conjugação de proteínas virais na membrana de lipossomas (virossomas) permite explorar o direcionamento e propriedades fusogênicas de membranas de proteínas virais, o que dribla o inconveniente da degradação pelos lisossomas (CHANG e YEH, 2012).

c) Lipossomas na terapia gênica

A transferência de material genético para o interior das células alvo pode utilizar-se de dois grupos de veículos: os sistemas biológicos e os não biológicos. Cada grupo tem vantagens e limitações. Estas limitações são menos encontradas em carreadores de genes não virais, como, por exemplo, os lipossomas. Os lipossomas catiônicos interagem com o DNA através de interações eletrostáticas, já que a molécula do DNA é carregada negativamente. A carga total, no entanto, se mantém com valor positivo. Dessa forma, ocorre a interação eficiente do carreador com a carga negativa da membrana celular, penetrando na célula, principalmente através de endocitose (BATISTA et al., 2007).

d) Lipossomas na terapia de doenças infecciosas e parasitárias

Aumento da eficácia do tratamento dessas doenças devido à captura dos lipossomas pelos órgãos (fígado, baço, medula óssea) e células (macrófagos teciduais) nas quais se localizam os parasitas causadores da doença. Estudos do tratamento de Leishmaniose, Esquistossomose e doença de Chagas mostraram maior eficácia com a utilização de fármacos encapsulados em lipossomas (BATISTA et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

e) Lipossomas aplicados a outras terapias

A liberação local de fármacos em doenças cardiovasculares representa grande potencial terapêutico (BATISTA et al., 2007).

Insulina encapsulada em lipossomas modificados com lectina conjugada na superfície apresentaram efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos (BATISTA et al., 2007).

O emprego de lipossomas no tratamento de acidentes vasculares encefálicos vem sendo estudado. Propõe-se a administração intraespinhal de vasodilatadores encapsulados, visando um maior tempo de permanência da droga na circulação e diminuindo os riscos ao paciente (MACHADO et al., 2007).

Em dermatologia, utiliza-se lipossomas em terapias com antimicóticos, anti-inflamatórios, promovendo um aumento da concentração do fármaco na epiderme e derme (MACHADO et al., 2007).

3.4.6 Formulações lipossomais comerciais

O primeiro lipossoma produzido comercialmente, Doxil® (Bem Venue Laboratories, Inc Bedford, OH), foi aprovado em 1995 pela *US Food and Drug Administration* para o tratamento quimioterápico de sarcoma Kaposi em pessoas com AIDS. Doxil consiste no encapsulamento do fármaco doxorrubicina e foi observada uma diminuição de seus efeitos colaterais e aumento da meia vida no organismo na forma encapsulada. Atualmente existem aproximadamente doze formulações lipossomais aprovadas para uso clínico e outras estão em diferentes estágios de testes clínicos (CHANG e YEH, 2012).

A maior parte dos lipossomas comerciais são estabilizados por liofilização. O congelamento e secagem desses produtos aumenta a validade do produto e o preserva na forma

seca até serem reconstituídos com água para injeção no momento da administração (CHANG e YEH, 2012).

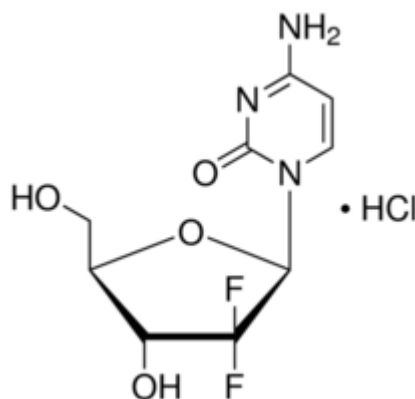
Os Anexos I e II apresentam, respectivamente, formulações de lipossomas encapsulando fármacos aprovadas e disponíveis comercialmente, e formulações em testes clínicos.

3.5 Gencitabina

No início dos anos 80, Larry Hertel sintetizou vários desoxirribosídios nos quais os dois átomos de hidrogênio na posição 2 do anel eram substituídos por átomos de fluorina. Essas substâncias foram preparadas como potenciais agentes antivirais. No entanto, em 1990, o composto 2-2-difluorodesoxicidina mostrou-se um potente inibidor de crescimento de células de leucemia em cultura. Atualmente, esse composto é conhecido como gencitabina (SNEADER, 2006).

A gencitabina é um agente antineoplásico quimioterápico classificado como antimetabólito. Essa classificação se deve ao fato desse fármaco apresentar como principal princípio de ação a interferência nos componentes básicos da síntese de DNA. O potencial de destruição celular é diretamente proporcional ao tempo de exposição ao agente antitumoral, que é ditado pelo tempo de administração intravenosa e frequência entre as doses. A gencitabina age pela inibição de enzimas necessárias à síntese dos ácidos nucleicos – incorporação no DNA e RNA – resultando em apoptose celular (GUIMARÃES, 2008; GEMZAR, 2013; PUBCHEM). O fármaco é geralmente comercializado na forma de um pó estéril liofilizado à base de cloridrato de gencitabina, cuja fórmula molecular pode ser observada na Figura 11, de maneira que cada 50 ml corresponde a 1g de gencitabina em base livre (GEMZAR, 2013).

Figura 11 - Fórmula molecular do cloridrato de gencitabina.



Fonte: SIGMA ALDRICH, 2014.

Com relação às propriedades físico-químicas, o cloridrato de gencitabina é um sólido de transparente a branco em pH 8,5, solúvel em água, levemente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em etanol e em solventes orgânicos polares. Seu ponto de fusão fica em torno dos 168°C e a pressão de vapor, $1,70 \times 10^{-9}$ mm Hg à 25°C. Para reconstituição de gencitabina estéril é utilizado cloreto de sódio a 0,90%, sem conservantes, de maneira a formar uma solução com concentração máxima de gencitabina de 40mg/ml (GEMZAR, 2013; SIGMA ALDRICH, 2014; PUBCHEM)

A gencitabina é utilizada principalmente para tratamento do câncer de bexiga e adenocarcinoma do pâncreas. Isolado ou em combinação com cisplatina, é indicado como tratamento para câncer de pulmão de células pequenas localmente avançado ou metastático. A combinação de gencitabina e paclitaxel é aplicada como tratamento de câncer de mama irressecável, metastático ou localmente recorrente. As doses terapêuticas variam, em geral, de 1000mg/m² a 1250mg/m², de acordo com o tipo de câncer a ser tratado ou considerando o uso isolado ou combinado com outros fármacos. A Tabela 3 apresenta a posologia para diversos tipos de câncer considerando o uso de gencitabina isolado ou combinado com outros fármacos. O tempo de administração intravenosa e frequência da administração das doses também depende do tipo de câncer e da combinação ou não de fármacos (GEMZAR, 2013).

Tabela 3 - Posologia de gencitabina.

Tipo de câncer	Uso isolado (mg/m ²)	Uso combinado (mg/m ²)	
		Gencitabina	Fármaco 2
Bexiga	1250	1000	70 (cisplatina)
Pâncreas	1000	-	-
Pulmão	1000	-	-
Mama	-	1250	175 (paclitaxel)

Fonte: Adaptado de GEMZAR, 2013.

É comum o uso de lipossomas unilamelares modificadas com polietilenoglicol (PEG) para a liberação de gencitabina. Essa combinação protege o lipossoma da inativação metabólica e aumenta a localização intracelular do fármaco, resultando em melhora considerável de seus efeitos antitumorais (COSCO et al., 2012).

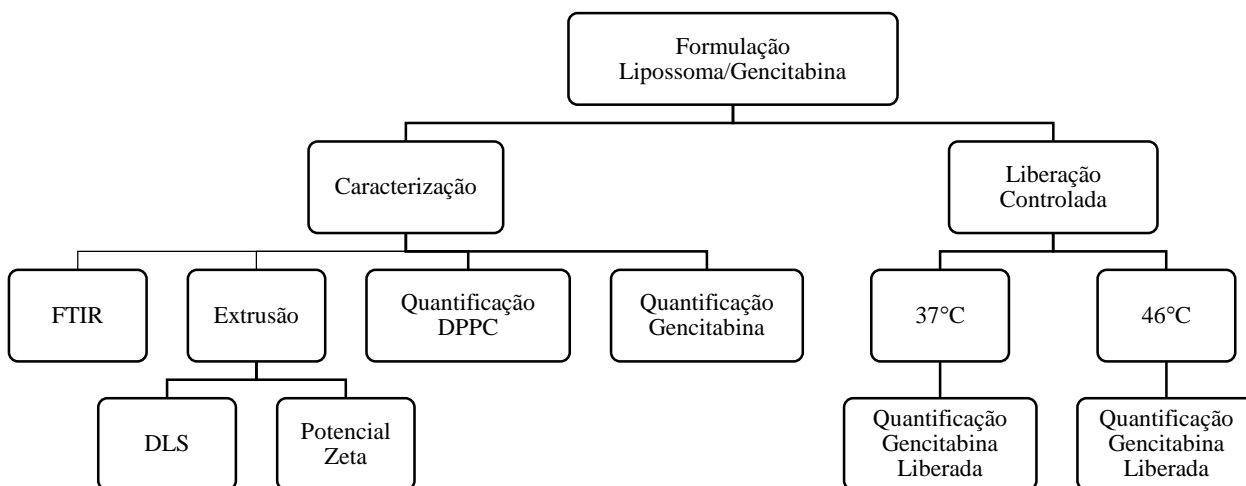
A liberação contínua do fármaco deve gerar alta concentração intravascular de gencitabina durante a exposição ao calor (hipertermia) em tecidos pré-selecionados, reduzindo o risco de saturação das enzimas de ativação da gencitabina. Em estudo farmacocinético clínico

realizado com lipossomas termosensíveis liberando gencitabina foi demonstrada a superioridade da exposição estendida do fármaco através do tempo de administração intravenosa prolongada (KNEIDL et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

De maneira geral, o procedimento experimental do presente trabalho foi realizado nas etapas apresentadas no fluxograma da Figura 12.

Figura 12 - Esquema do procedimento experimental.



Fonte: Próprio autor.

A seguir, são apresentados os detalhes de cada etapa.

4.1 Formulação lipossomal

A formulação lipossomal foi preparada pelo método da hidratação do filme lipídico, descrito por COSCO et al. (2012) e modificado por FERRIRA (2013), utilizando-se o fosfolípido DPPC, colesterol e o fármaco hidrofílico gencitabina.

Para formação do filme, 27,57mg de DPPC (Avanti Polar Lipids) e 3,15mg de colesterol foram misturados em 5ml de clorofórmio (Labsynth). Essa mistura foi levada ao Rotaevaporador (Marconi, Ma120) à 42°C, velocidade 3,5rpm, até a formação do filme no fundo do balão.

Para hidratação do filme, foi preparada uma solução de 2mg de gencitabina (Sigma Aldrich) em 1 ml de solução tris-NaCl/HCl (TBS). Em seguida, o filme foi hidratado com 0,25ml da solução de gencitabina 2mg/ml e 9,75ml de solução TBS, obtendo uma concentração final de gencitabina de 0,05mg/ml. Adicionou-se a solução final ao balão do filme e esse foi colocado em banho à 43°C por 40 minutos. Posteriormente a solução foi agitada vigorosamente

em agitador de tubos (Fenix, AP56) até o completo desprendimento do filme do fundo do balão, formando os lipossomas multilamelares. Sendo assim, as concentrações esperadas para DPPC e gencitabina nessa solução são, respectivamente, 2,76mg/ml e 0,05mg/ml, razão aproximada de 1:55.

A solução obtida foi submetida a 7 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho à 43°C, de maneira a propiciar a formação das vesículas unilamelares e encapsulamento mais eficiente do fármaco. Posteriormente a solução foi centrifugada por 10 minutos à 2000rpm (Centribio, 80-26), a fim de separar os lipossomas (pellet) da solução contendo gencitabina não encapsulada (sobrenadante). O sobrenadante foi armazenado separadamente e o pellet ressuspendido em 10ml de solução TBS com o auxílio do agitador, obtendo-se a formulação de lipossomas encapsulando gencitabina (Solução Lip/Genc).

4.2 FTIR

A solução Lip/Genc, o fosfolípídeo DPPC e o colesterol foram analisados através do FTIR (Espectrômetro Infravermelho Shimadzu IR Prestige 21). O objetivo dessa análise foi comprovar a presença dos componentes na formulação final pela análise das bandas de absorção.

4.3 Espalhamento dinâmico de luz e medidas de potencial zeta

As caracterizações utilizadas incluíram medidas do tamanho hidrodinâmico por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e medidas de potencial zeta.

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou atração das cargas entre partículas, sendo um parâmetro fundamental para análise da estabilidade (MALVERN). Esse parâmetro refere-se ao potencial existente entre a superfície de uma partícula e o líquido dispersante, variando de acordo com a distância da superfície da partícula (FERREIRA, 2011).

A técnica de medição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz consiste em medir o movimento Browniano das partículas em uma suspensão e relacioná-lo com o tamanho de partícula. Para isso as partículas são iluminadas com um laser e a intensidade das flutuações é analisada por meio da luz espalhada (FERREIRA, 2011).

Para execução desses testes, foi realizada a redução e uniformização do tamanho das vesículas presentes na Solução Lip/Genc em um extrusor (Avanti Polar Lipids, Inc). O processo consistiu da passagem da Solução Lip/Gen através de uma membrana de policarbonato de 100nm, sendo realizados 11 ciclos para a obtenção de uma formulação ideal.

As leituras de potencial zeta e DLS foram realizadas no equipamento Zeta Sizer Nano Series, marca Malvern Instrument, Modelo Nano ZS. As aferições foram realizadas em triplicata durante 9 dias após o preparo da formulação em pH 7,38, solvente TBS, de maneira a acompanhar a estabilidade estrutural da amostra.

4.4 Espectrofotometria UV-visível

O método da espectrofotometria UV-visível foi utilizado para a quantificação de DPPC e gencitabina presentes na Solução Lip/Genc formulada. O mesmo método foi utilizado para quantificação de gencitabina liberado no teste de liberação controlada, descrito no item 4.5. Esse método consiste basicamente em realizar a leitura de absorção UV-visível para o comprimento de onda de absorção máxima e, com o auxílio de uma curva de calibração construída, identificar as concentrações de determinado composto presente naquela solução.

4.4.1 Quantificação do DPPC

Os componentes da Solução Lip/Genc foram quantificados através da espectrofotometria UV-visível (Espectrofotômetro UV-mini 1240). Para análise da composição do lipossoma foi utilizado o método colorimétrico, que consiste em complexar o fosfolípideo que compõe o lipossoma com ferrotiocianato de amônio e verificar a absorção no comprimento de onda 488 nm no espectrofotômetro UV-visível.

O comprimento de onda utilizado foi obtido a partir da varredura de uma solução de DPPC, na qual foi verificado que o comprimento de onda onde ocorre a absorção máxima da radiação na região do UV-visível é o $\lambda = 488\text{nm}$. A Tabela 4 apresenta a composição das amostras preparadas.

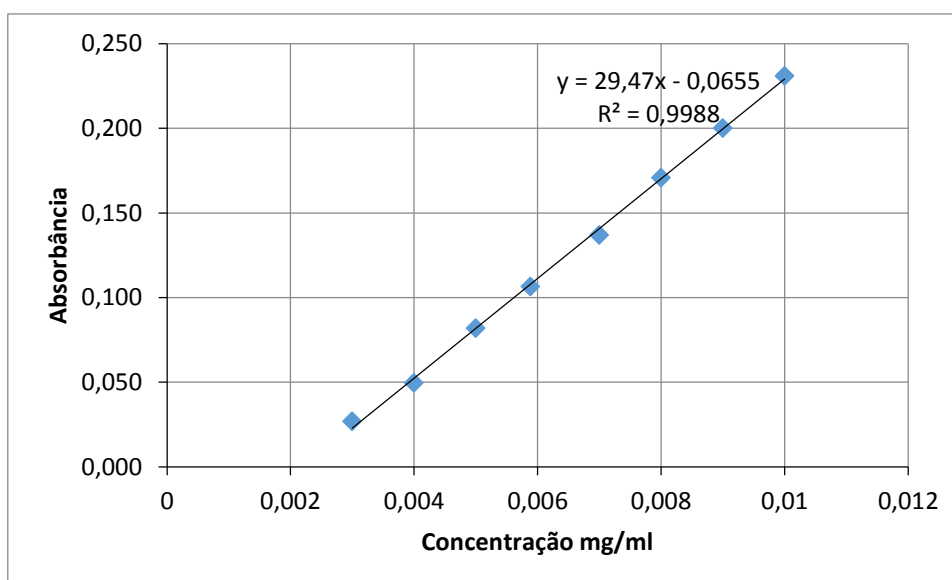
Tabela 4 - Amostras UV-vis para quantificação de DPPC.

Amostra	Ferrotiocianato de amônio (ml)	Clorofórmio (ml)	Solução Lip/Genc (ml)
A.Branco	4	4	0
A.1	4	3,75	0,25
A.2	4	3,75	0,25
A.3	4	3,75	0,25

Fonte: Próprio autor.

Todas as amostras foram agitadas no agitador mecânico por 1 minuto e centrifugadas por 10 minutos à 2000rpm. Utilizou-se 0,10ml da amostra A.Branco misturada à 0,90 ml de clorofórmio para zerar o espectrofotômetro (UV-mini 1240) e, posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância de 0,1ml de cada amostra com 0,90ml de clorofórmio para $\lambda = 488\text{nm}$. Os valores obtidos foram analisados com auxílio da curva de calibração confeccionada por FERREIRA (2011), apresentada na Figura 13, obtendo-se a concentração de fosfolípídeo DPPC na Solução Lip/Genc. A curva fornecida por FERREIRA (2011) foi confeccionada no mesmo equipamento, utilizando-se os mesmos parâmetros.

Figura 13 - Curva de Calibração do DPPC.



Fonte: Ferreira, 2011.

4.4.2 Quantificação da gencitabina

O fármaco presente na formulação obtida foi quantificado por espectrofotometria UV-visível. Para tal, se fez necessária a construção de uma curva de calibração. Para a construção da curva foram preparadas 10 soluções de gencitabina e TBS com concentrações conhecidas, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de soluções de gencitabina utilizadas na confecção da curva de calibração.

Amostra	Concentração (10⁻³mg/ml)
1	150
2	75
3	37,5
4	18,75
5	9,375
6	4,6875
7	2,34375
8	1,171875
9	0,585938
10	0,292969

Fonte: Próprio autor.

Realizou-se a varredura das amostras no espectrômetro UV/VIS/NIR Spectrometer, modelo Lambda 1050, Marca PerkinElmer, utilizando o acessório módulo de absorvância 3D WB Detector Module, a fim de determinar o comprimento de onda de absorção máxima da gencitabina (λ_{\max}). Posteriormente, foram feitas leituras de absorvância para cada uma das 10 amostras de concentrações conhecidas para λ_{\max} (267nm) e construiu-se uma curva Concentração x Absorvância.

Para quantificação da gencitabina presente na Solução Lip./Genc., 0,50ml da solução foi centrifugado por 10 minutos à 1200rpm, o sobrenadante descartado o pellet foi liofilizado. Adicionou-se 1ml de clorofórmio (CHCl₃) e a nova solução foi centrifugada novamente. Posteriormente, secou-se em capela, o pó restante foi ressuspenso em 2ml de TBS e fez-se a leitura no UV-visível para λ_{\max} (267nm).

4.5 Liberação controlada

Foram realizados testes de liberação controlada em TBS à temperatura fisiológica (37°C) e acima da temperatura de transição do fosfolípido (46°C).

Foram preparadas 6 amostras para cada temperatura de teste. Colocou-se 0,50ml da Solução Lip/Genc em 12 Tubos Falcon, centrifugou-se por 10 minutos à 1200rpm (Sin). O sobrenadante foi retirado com cuidado, adicionou-se 0,50ml de Tris e as amostras foram incubadas. As amostras incubadas a 36°C e 46°C foram retiradas após 24, 48 e 72 horas.

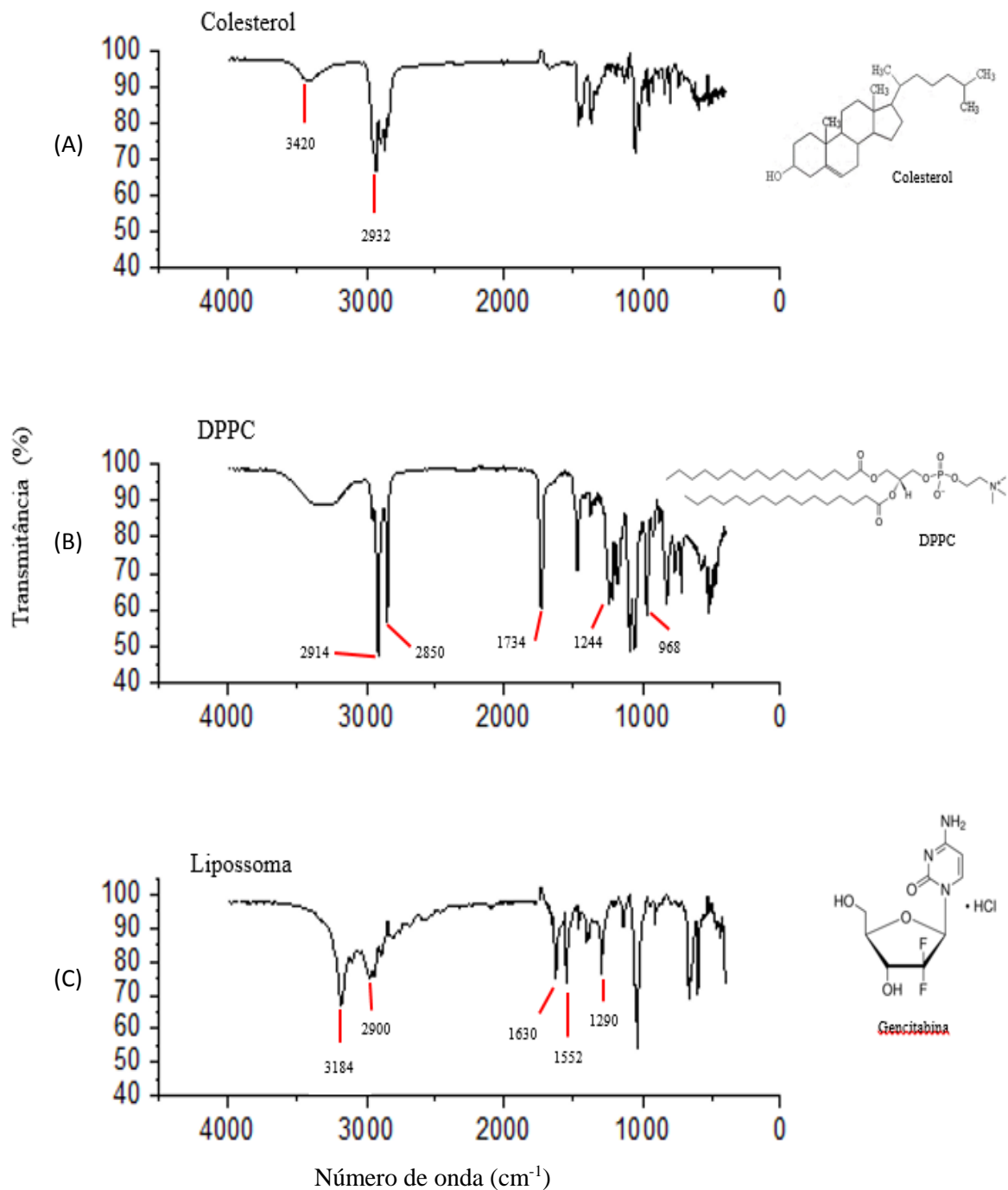
Após a incubação pelo tempo descrito, o sobrenadante foi coletado, adicionou-se 1,50ml de solução TBS e verificou-se a quantidade de gencitabina liberada através da espectroscopia UV-visível para o λ_{\max} (267nm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 FTIR

A figura 14 apresenta os espectros de FTIR obtidos para o colesterol, DPPC e formulação lipossomal.

Figura 14 - Espectros FTIR para (A) colesterol, (B) DPPC e (C) lipossoma.



Fonte: Próprio autor

A partir da análise do espectro de FTIR obtido para o colesterol é possível observar a presença de uma banda na faixa de 3420cm^{-1} associada ao estiramento da hidroxila do colesterol ou água adsorvida nos cristais. Além disso, é possível verificar uma banda em 2932cm^{-1} relativa ao estiramento das ligações C-H.

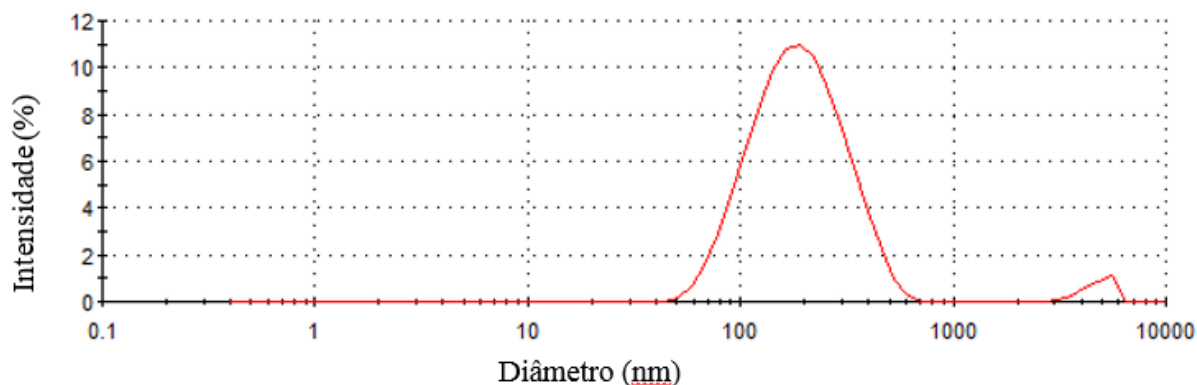
O espectro do DPPC mostra uma banda mais intensa na região 2850cm^{-1} e 2914cm^{-1} , devido aos grupos metileno observados na estrutura do fosfolípídeo. É possível perceber uma banda na região de 1244cm^{-1} associada ao grupo fosfato, além de outra na região 968cm^{-1} que evidencia a presença do grupo colina. Temos ainda banda em 1734cm^{-1} que se refere aos grupos carbolina presentes na estrutura do DPPC. A larga banda na região de 3400cm^{-1} mostra a presença de água adsorvida nos cristais.

Ao analisar o FTIR dos lipossomas, percebe-se que a larga faixa na região de 3400cm^{-1} observada no DPPC e colesterol desaparece. Isso se deve à liofilização utilizada no preparo da amostra de lipossoma para a leitura no FTIR, procedimento que retira toda a água adsorvida. É possível observar uma banda na faixa de 3184cm^{-1} , associada ao grupo NH associado em amida, a qual é observada na estrutura do fármaco encapsulado gencitabina. Temos ainda a banda em 1552cm^{-1} que é atribuído ao estiramento simétrico do grupo NH_2 . A banda em 1630cm^{-1} evidencia o grupo C=O em amidas, comprovando, mais uma vez, a presença do fármaco na composição do lipossoma. Além desses picos, é possível perceber a presença de bandas já citadas, associadas aos grupos característicos do colesterol e DPPC (2900cm^{-1} metilenos, 1290cm^{-1} fosfato).

5.2 Espalhamento dinâmico de luz e medidas de potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas foi quantificado por espalhamento dinâmico de luz e expresso pelo parâmetro z-médio $181,70 \pm 6,40\text{nm}$, com PDI igual a $0,28 \pm 0,05$. A intensidade de distribuição de tamanho está apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Distribuição de tamanho por intensidade.



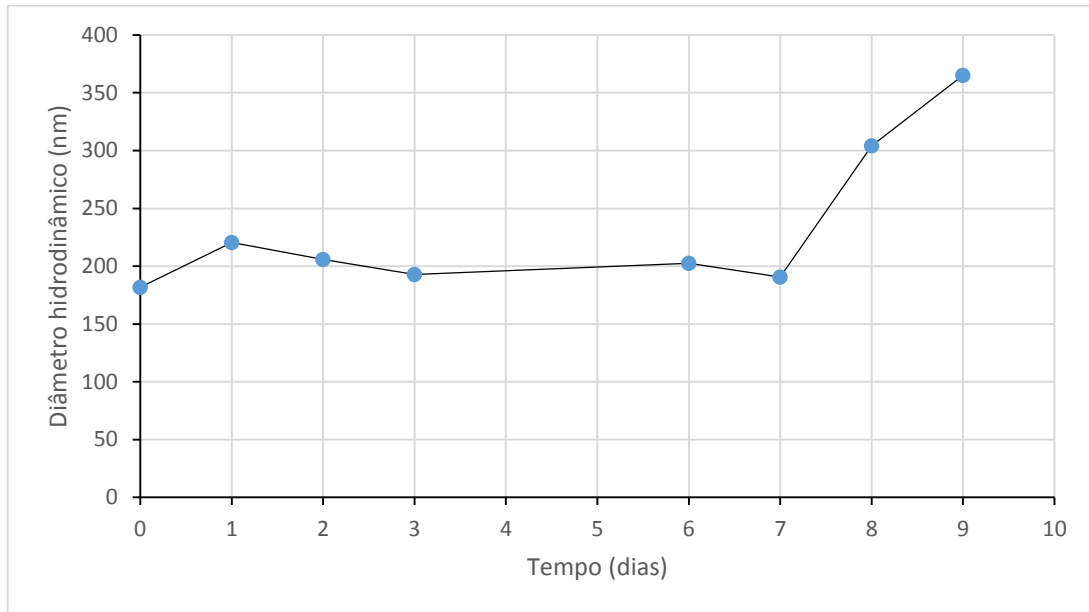
Fonte: Próprio autor.

Na Figura 15 percebe-se a existência de um pico principal em torno de 180nm que engloba 97,10% das partículas. Esse valor é satisfatório para a aplicação a que se propõe, uma vez que é esperado que lipossomas tenham diâmetro médio inferior a 200nm, para que não causem riscos à saúde quando em meio fisiológico, como trombos, por exemplo. Um pico secundário é observado em torno de 4500nm, correspondente a 2,90% das partículas. A existência do mesmo é atribuída à possível aglomeração de partículas que causam uma concentração do espalhamento da luz em um ponto.

O potencial zeta medido para a amostra foi igual a -9,19mV, indicando que a superfície dos lipossomas apresenta carga negativa. O potencial ideal para indicar estabilidade de partículas dispersas em uma solução é acima de +15mV ou abaixo de -15mV. Isso porque quanto maior o valor absoluto, maior a repulsão eletrostática entre as partículas, dificultando a aglomeração das mesmas e resultando em sistema disperso mais estável (ZHAO, 2011). Para conseguir um aumento da estabilidade dos lipossomas compostos por DPPC, COSCO, et al. (2012) reportaram a influência da combinação de outros fosfolípidos com o DPPC, como por exemplo DSPE-mPEG (-10,10mV), DOTAP (48,20mV) ou DMPG (-31mV).

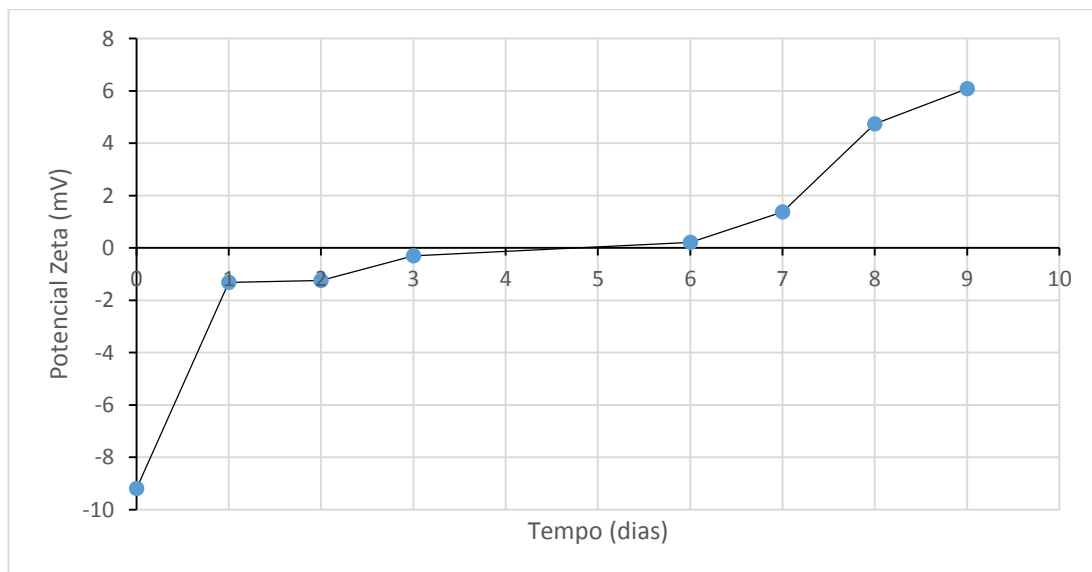
Foi realizado um acompanhamento desses parâmetros durante 9 dias a fim de verificar a estabilidade da formulação. A evolução do potencial zeta e tamanho hidrodinâmico são apresentadas nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 - Evolução do diâmetro hidrodinâmico médio.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Evolução do potencial zeta.



Fonte: Próprio autor.

A partir da análise dos resultados apresentados é possível constatar o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta se mantiveram estáveis durante sete dias. Após esse período, o diâmetro hidrodinâmico aumentou significativamente (de 181,70nm para 304,23nm aproximadamente). Acompanhando esse resultado, percebeu-se um aumento considerável no valor do potencial zeta, que se tornou positivo (de -9,19mV para 4,74mV). O aumento do

potencial zeta durante os seis primeiros dias pode ser relacionado à liberação controlada do fármaco, uma vez que a gencitabina é carregada positivamente. Após o sétimo dia, o aumento considerável no valor do diâmetro e potencial zeta convergem para o provável rompimento da parede dos lipossomas, indicando instabilidade.

5.3 Quantificação de DPPC

A Tabela 6 apresenta as medidas de absorvâncias obtidas para cada uma das amostras. Os valores obtidos foram analisados com o auxílio da equação da curva de calibração (Figura 13). Verificou-se que os valores de absorvância média obtidos pela análise correspondem às seguintes concentrações de DPPC na amostra:

Tabela 6 - Absorção referente ao fosfolípido DPPC nas Soluções Lip/Gen no UV-visível.

Amostra	Medição 1	Medição 2	Medição 3	Absorvância média	Concentração de DPPC (mg/ml)
A.1	0,121	0,126	0,145	0,131	0,00667
A.2	0,122	0,110	0,120	0,117	0,00619
A.3	0,118	0,112	0,138	0,123	0,00639

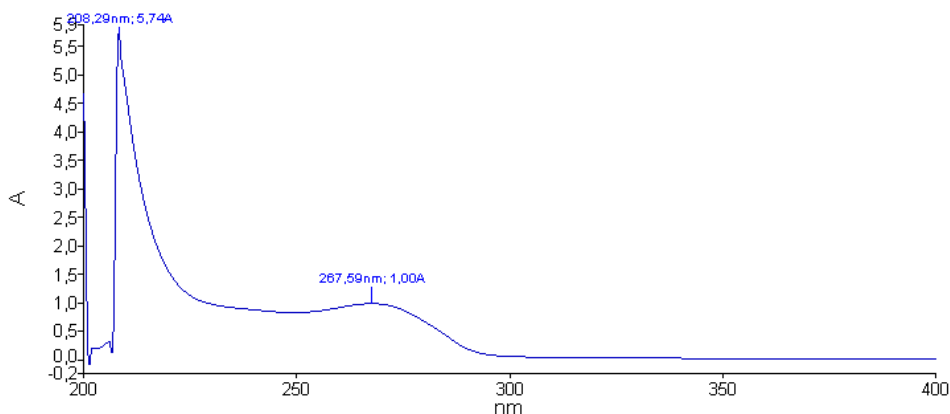
Fonte: Próprio autor.

A partir dessa análise e fazendo os cálculos para desconsiderar as diluições realizadas no procedimento, pode-se afirmar que a concentração média de DPPC na Solução Lip/Gen é 2,05mg/ml. Como descrito no item 4.1, a concentração esperada de DPPC era de 2,76mg/ml. Sendo assim, tem-se uma eficiência de 74,52%.

5.4 Curva de calibração da gencitabina

A varredura das amostras conhecidas mostrou maior absorção em torno do comprimento de onda 267,50nm, conforme mostra a Figura 18.

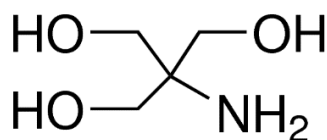
Figura 18 - Varredura da amostra de gencitabina (solvente TBS).



Fonte: Próprio autor.

A banda observada no comprimento de onda de 208,29nm possivelmente refere-se ao solvente utilizado (TBS), composto por tris, NaCl, HCl e água. Cutoff refere-se à faixa na qual o solvente absorve toda a radiação UV. De acordo com dados apresentados pelo *National Physical Laboratory* (NPL), o cutoff observado para a água é 190nm. Acredita-se que a presença dos demais componentes da solução TBS (tris, apresentado na Figura 19) podem ter deslocado o comprimento de onda de absorção do solvente. Isso porque a faixa de absorção dos grupos NH₂ e COH presentes no Tris são, respectivamente, 195nm e 240nm (NPL).

Figura 19 - Estrutura química Tris



Fonte: Sigma Aldrich, 2015.

Sendo assim, foram realizadas medições de absorbância para cada uma das amostras de concentração conhecida de gencitabina para $\lambda_{\text{max}}=267,50\text{nm}$. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

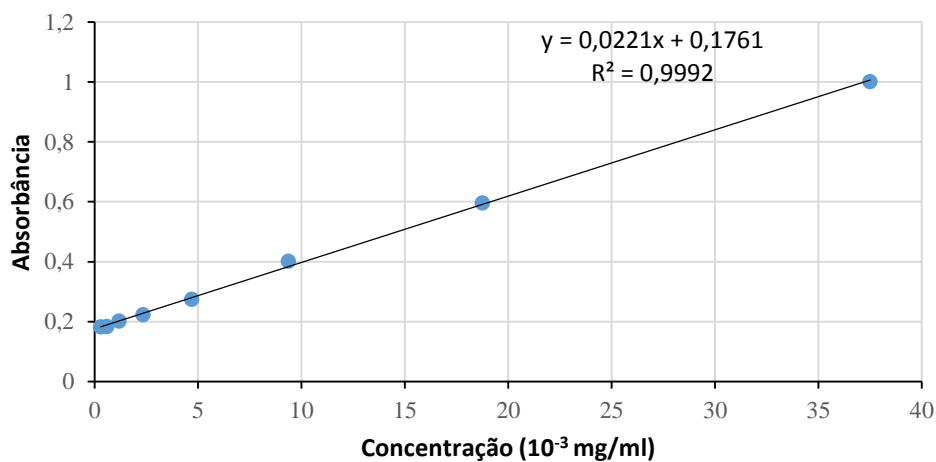
Tabela 7 - Absorbância UV à 267,50nm das amostras de gencitabina com concentrações conhecidas.

Amostra	Concentração (10^{-3} mg/ml)	Absorbância
1	150	3,57
2	75	1,86
3	37,5	1,00
4	18,75	0,5959
5	9,375	0,4017
6	4,6875	0,2744
7	2,34375	0,2229
8	1,171875	0,2019
9	0,585938	0,1829
10	0,292969	0,1822

Fonte: Próprio autor.

Considerando-se os dados obtidos, foi plotada a curva de calibração da gencitabina Figura 20, a qual foi ajustada linearmente pelo software Excell.

Figura 20 - Curva de calibração da gencitabina para $\lambda=267,5\text{nm}^{-1}$.



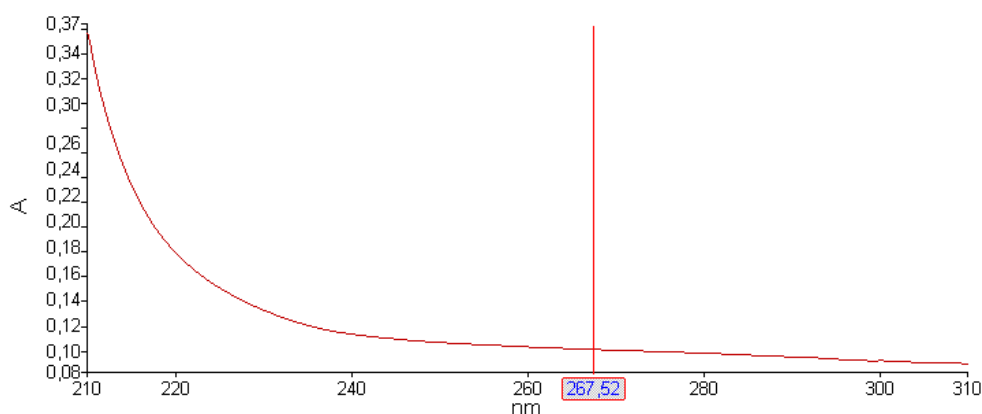
Fonte: Próprio autor.

A equação da reta apresentada na Figura 20 foi utilizada para quantificação de gencitabina na formulação lipossomal e após teste de liberação controlada. A absorbância dessas amostras foi medida no UV-vis e, a partir dos valores obtidos e com o auxílio da equação da reta, calculou-se a concentração de gencitabina.

5.5 Quantificação de gencitabina

A análise da quantidade de gencitabina apresentou resultados não conclusivos, uma vez que o espectro UV-vis não apresentou a banda no comprimento de onda de máxima absorção da gencitabina, conforme apresentado na figura 21.

Figura 21 - Quantificação gencitabina.



Fonte: Próprio autor.

Uma hipótese para explicação do resultado obtido consiste em erro ocorrido durante a secagem da amostra em capela. Acredita-se que a amostra tenha sido deixada na capela por tempo superior ao necessário, sem a devida proteção, de maneira que parte do pó liofilizado tenha se perdido, e não somente o clorofórmio. Dessa maneira, a leitura realizada no UV-vis não corresponde ao conteúdo completo presente na solução de lipossoma. Possivelmente houve perda dos componentes da formulação (gencitabina, DPPC, Tris).

5.6 Liberação controlada

A análise das 12 amostras de liberação controlada foi realizada em duas datas, devido a limitação de recursos. As análises de absorbância UV-vis das 6 amostras do primeiro dia apresentaram os resultados descritos na Tabela 8. As análises posteriores não apresentaram resultados conclusivos, uma vez que não foi observada banda para o comprimento de onda de absorção máxima da gencitabina. Esse resultado insatisfatório é atribuído a uma possível degradação das amostras, que foi observada aproximadamente 40 dias após liberação. Sendo assim, a análise em duplicata foi perdida.

Tabela 8 - Absorção amostras liberação controlada.

Temperatura	24 horas	48 horas	72 horas
37°C	0,0555	0,0543	0,0615
46°C	0,1090	0,1787	0,1927

Fonte: Próprio autor.

Com o auxílio da equação da reta apresentada na Figura 20 e fazendo-se os cálculos para desconsiderar as diluições realizadas durante o procedimento, conclui-se que as absorvâncias medidas para as amostras de liberação controlada correspondem às concentrações apresentadas na Tabela 9.

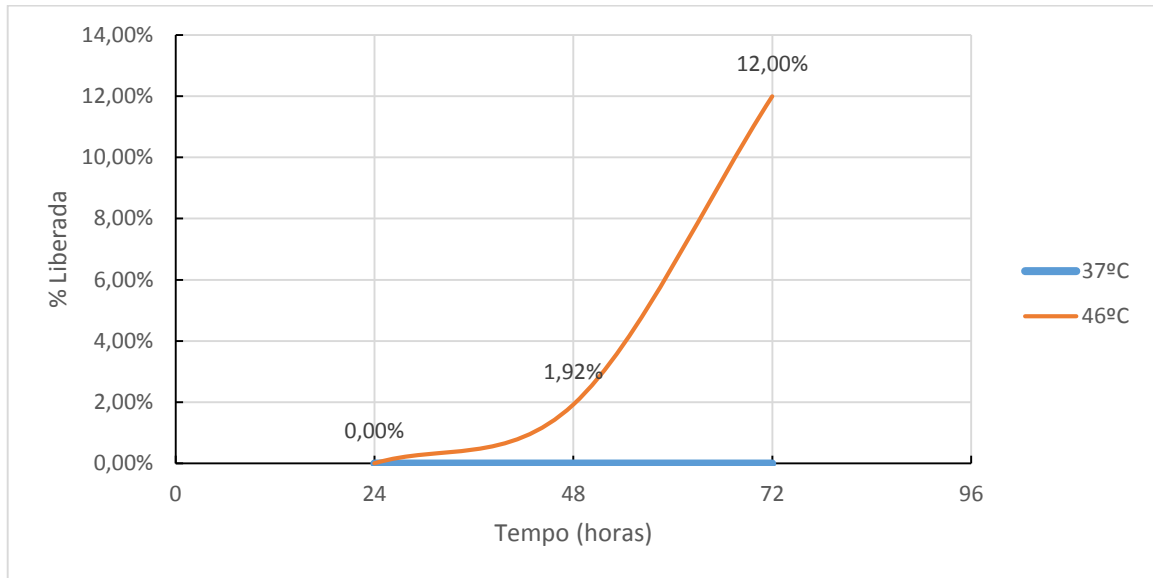
Tabela 9 - Concentração amostras liberação controlada.

Temperatura	24 horas	48 horas	72 horas
37°C	0	0	0
46°C	0	0,00048mg/ml	0,00300mg/ml

Fonte: Próprio autor.

Para todas as amostras de liberação à 37°C e amostras de 24 horas a 46°C, não foi percebida presença de gencitabina. Os resultados obtidos para as amostras de 37°C estão dentro do previsto, pois não é esperado que haja liberação abaixo de 42°C (temperatura de transição do fosfolípido). Acredita-se que não foi possível detectar gencitabina na amostra de 24 horas a 46°C por tratar-se de concentrações muito baixas, impossibilitando a leitura pelo limite de detecção do equipamento.

Considerando que a Solução Lip/Genc. apresentava concentração 0,05mg/ml e supondo o rendimento de encapsulamento esperado 50%, reportado por Ferreira (2013), poderia-se afirmar que a concentração inicial para o teste de liberação controlada era 0,025mg/ml. Considerando essa hipótese, teríamos a cinética de liberação apresentada na figura 22.

Figura 22 - Cinética de liberação controlada do fármaco.

Fonte: Próprio autor.

A curva apresentada na Figura 22 sugere que não há liberação de gencitabina a 37°C. À 46°C é possível verificar uma liberação controlada que atinge 12% após 72 horas. Para confirmar esses valores, no entanto, faz-se necessário refazer os testes de quantificação de gencitabina, os quais apresentaram resultados inconclusivos neste trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os lipossomas obtidos no presente trabalho apresentaram tamanho condizente com o requerido para sua aplicação em meio fisiológico (tamanho médio menor que 200nm). O acompanhamento da estabilidade dos lipossomas por meio das análises de DLS e potencial zeta evidenciaram instabilidade sete dias após a formulação. A característica termossensível do lipossoma formulado, conferida pelo fosfolípídeo DPPC, foi confirmada pela liberação controlada da gencitabina observada ao aplicar um estímulo térmico superior à temperatura de transição do fosfolípídeo (testes à 46°C). A quantificação de gencitabina encapsulada no lipossoma não apresentou resultados conclusivos, no entanto o encapsulamento do fármaco foi evidenciado através da análise de FTIR. Para validação desse tipo de dispositivo, é necessária a condução de testes *in vitro* e *in vivo* para verificar o comportamento de lipossomas e efetividade dos tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ACS (American Cancer Society). Disponível em: <<http://www.cancer.org/>> Acesso em 08 maio 2015.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.
- BRAGA, R.R. **Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para determinação de alantoína em lipossomas e formulações tópicas.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), setembro, 2010
- BROCHADO, P.M.D.S.C. **Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica.** Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola da Ciências e Tecnologias da saúde. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Lisboa 2013.
- CALVAGNO, M.G.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; COSCO, D.; IANNONE, M.; CASTELLI, F.; DOLDO, P.; FRESTA, M. **Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes.** Current Drug Delivery, 2007, 4, pp. 89-101.
- CHANG, H-I.; YEH, M-K. **Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy.** International Journal of Nanomedicine, 2012:7 49-60.
- COSCO, D.; PAOLINO, D.; CILURZO, F.; FRESTA, M. **Gemcitabine and tamoxifen-loaded liposomes as multidrug carriers for the treatment of breast cancer diseases.** International Journal of Pharmaceutics, 422 (2012) 229-237.
- DEBETS, M.F.; LEENDERS, W.P.J.; VERRIJP, K.; ZONJEE, M.; MEEUWISSEN, S.A.; OTTE-HOLLER, I.; VAN HEST, J.C.M. **Nanobody- functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting.** Macromolecular Bioscience Journal, No 13 (2013) 938-945.
- FERREIRA, R.V. **Qualificação doutorado.** Belo Horizonte, 2011.
- FERREIRA, R.V. **Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados.** Universidade Federal de Minas Gerais. Tese (Doutorado em Ciências-Química), Belo Horizonte, 2013.
- GEMZAR. **Bula do cloridrato de gencitabina.** D.C.B. 04420, LILLY, CDS 22MAR2013.
- GIUBERTI, C.S. **Estudo da estabilidade e produção piloto de lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina.** Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2007.

GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. Vários colaboradores. 3 ed. São Paulo: BBS Editora, 2008.

HELLER, J. in RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Elsevier Academic Press, 3 Ed., 2012.

KNEIDL, B.; PELLER, M.; WINTER, G.; LINDNER, L.H.; HOSSANN, M. **Thermosensitive liposomal drug delivery system: state of the art review**. International Journal of Nanomedicine, 2014;9, 4387-4398.

MACHADO, L.C; GNOATTO, S.A.; KLUPPEL, M.L.W. **Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão de literatura**. Estud. Biol. 2007 Abr/jun, 29(67): 215-224.

MALVERN. Zeta potential: the benefits of using zeta potential measurements to improve formulation stability and shelf life and reduce formulation time and cost.

NATIONAL Physical Laboratory. Chemistry. Capítulo 3.8.7: UV-visible spectroscopy.

PUBCHEM: open chemistry database. **Gemcitabine**. US National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information.

SHARMA, G.; ANABOUSI, S.; EHRHARDT, C.; KUMAR, M.N.V.R. **Liposomes as target drug delivery systems in the treatment of breast cancer**. Journal of Drug Targeting, June 2006, 14 (5): 301-310

SIGMA ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: gemcitabine hydrochloride**. Revisão: 19 abr 2014.

SIGMA ALDRICH. **Specification comparison: tris base**. 2015.

SNEADER, W. **Drug Discovery: a history**. School of Pharmacy, University of Strathclyde, Glasgow, UK. John Wiley & Sons, LTD, 2006

TAZINA, E.V.; KOSTIN, K.V.; OBOROTOVA, N.A. **Drug synthesis methods and manufacturing technology: specific features of drug encapsulation in liposomes (a review)**. Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 45, No. 8, Nov., 2011.

WANG, J-X.; WANG, Z-H.; CHEN, J-F.; YUN, J. **Direct encapsulation of water-soluble drug into silica microcapsules for sustained release applications**. Materials Research Bulletin, 2008.

ZHAO, L.; WEI, Y.; LI, W.; LIU, Y.; WANG, Y.; ZHONG, X.; YU, Y. **Solid dispersion and effervescent techniques used to prepare docetaxel liposomes for lung-targeted delivery system: in vitro and in vivo evaluation**. Journal of Drug Targeting, 2011, 19(3): 171-178.

ANEXO I

Fármacos encapsulados em lipossomas disponíveis no mercado.

Nome do Produto	Rota de Injeção	Droga	Tipo de partícula	Forma da droga/tempo de armazenamento	Composição lipídica	Indicação aprovada
Ambisome	Intravenoso	Anfotericina B	Lipossoma	Pó/36 meses	HSPC, DSPG, colesterol e anfotericina B (razão molar 2:0,8:1:0,4)	Infecções fúngicas severas
Abelcet	Intravenoso	Anfotericina B	Complexo lipídico	Suspensão/24 meses	DMPC E DMPG (razão molar 7:3)	Infecções fúngicas severas
Amphotec	Intravenoso	Anfotericina B	Complexo lipídico	Pó/24 meses	Sulfato de colesterol	Infecções fúngicas severas
DaunoXome	Intravenoso	Daunorrubicina	Lipossoma	Emulsão/12 meses	DSPC e colesterol (razão molar 2:1)	Tumores sanguíneos
Doxil	Intravenoso	Doxorrubicina	Lipossoma modificado com PEG	Suspensão/20 meses	HSPC, colesterol e PEG-2000-DSPE (razão molar 56:39:5)	Sarcoma Kaposi, câncer de ovário e mama
Lipo-dox	Intravenoso	Doxorrubicina	Lipossoma modificado com PEG	Suspensão/36 meses	DSPC, colesterol e PEG-2000-DSPE (razão molar 56:39:5)	Sarcoma Kaposi, câncer de ovário e mama
Myocet	Intravenoso	Doxorrubicina	Lipossoma	Pó/18 meses	EPC e colesterol (razão molar 55:45)	Terapia combinada com ciclofosfamida para câncer de mama metastático
Visudyne	Intravenoso	Verteporfina	Lipossoma	Pó/48 meses	EPG e DMPC (razão molar 3:5)	Degeneração molecular relacionada à idade, miopia patológica, histoplasmose ocular
Depocyt	Espinhal	Citarabina	Lipossoma	Suspensão/18 meses	Colesterol, trioleína, DOPC e DPPG (razão molar 11:1:7:1)	Meningite neoplásica e linfomatosa
DepoDur	Epidural	Sulfato de morfina	Lipossoma	Suspensão/24 meses	Colesterol, trioleína, DOPC e DPPG (razão molar 11:1:7:1)	Controle da dor
Epaxal	Intramuscular	Vírus da hepatite A inativado (RG-SB)	Lipossoma	Suspensão/36 meses	DOPC e DOPE	Hepatite A
Inflexal V	Intramuscular	Hemaglutinina inativada do vírus influenza A e B	Lipossoma	Suspensão/12 meses	DOPC e DOPE	Influenza

Fonte: Adaptado de CHANG e YEH, 2012.

ANEXO II

Fármacos encapsulados em lipossomas em testes clínicos.

Nome do Produto	Rota de Injeção	Droga	Composição lipídica	Indicação aprovada	Fase teste
LEP-ETU (pó/12 meses)	Intravenoso	Paclitaxel	DOPC, colesterol e cardiolipina (razão molar 90:5:5)	Câncer de ovário, mama, pulmão	I/II
LEM-ETU	Intravenoso	Mitoxantrona	DOPC, colesterol e cardiolipina (razão molar 90:5:5)	Câncer de ovário, fígado, estômago, mama e leucemia	I
EndoTAG-I (pó/24 meses)	Intravenoso	Paclitaxel	DOTAP, DOPC E paclitaxel (razão molar 50:47:3)	Propriedades anti-angiogênicas, câncer de mama e pâncreas	II
Arikace	Liberação aerossol portátil	Amicacina	DPPC e colesterol	Infecção pulmonar	III
Marqibo	Intravenoso	Vincristina	Colesterol e esfingomielina (razão molar 45:55)	Melanoma uveal maligno metastático	III
ThermoDox	Intravenoso	Doxorubicina	DPPC, MSPC e PEG-2000-DSPE (razão molar 90:10:4)	Carcinoma hepatocelular irressecável	III
Atragen	Intravenoso	Tretinoína	DMPC e óleo de soja	Leucemia promielocítica aguda, câncer de próstata	II
T4N5 liposome lotion	Tópico	Bacteriófago T4 endonuclease 5	Desconhecido	Xeroderma pigmentoso	III
Liposomal Grb-2	Intravenoso	Oligodeoxinuc leotídeo Grb2	Desconhecido	Leucemia mielóide aguda, leucemia mielógena crônica, leucemia linfoblástica aguda	I
Nyotran	Intravenoso	Nistatina	DMPC, DMPG e colesterol	Infecção fúngica sistêmica	I/II
LE-SN38	Intravenoso	SN-38, metabólito ativo de irinotecano	DOPC, colesterol e cardiolipina	Câncer colorretal metastático	I/II
Aroplatin	Intrapleural	Análogo de cisplatina (L-NDDP)	DMPC e DMPG	Carcinoma colorretal metastático	II
Liprostin	Intavenoso	Prostaglandina E1	Desconhecido	Doença vascular periférica	II/III
Stimuvax	Subcutâneo	BLP25 lipopeptídeo (MUC1-petídeo alvo)	Monofosforil-lipídeo A, colesterol, DMPG e DPPC	Vacina para encefalite desenvolvida por mieloma	III
SPI-007	Intravenoso	Cisplatina	SHPC, colesterol e DSPE-PEG	Câncer de pulmão, cabeça e pescoço	I/II
Lipoplatin (suspensão/36 meses)	Intravenoso	Cisplatina	SPC, DPPG, colesterol e Mpeg-2000-DSPE	Câncer de pâncreas, cabeça e pescoço, estômago, mama, pulmão e mesotelioma	III
S-CKD602	Intravenoso	Análogos da camptotecina	DPSC e DSPE-PEG (razão molar 95:5)	Carcinoma progressivo ou recorrente do cervix uterino	I/II
OSI-2011	Intravenoso	Lurtotecano	HSPC e colesterol (razão molar 2:1)	Câncer ovariano, da cabeça e pescoço	II
INX-0125	Intravenoso	Vinorelbina	Colesterol e esfingomielina (razão molar 45:55)	Tumor sólido avançado	I
INX-0076	Intravenoso	Topotecano	Colesterol e esfingomielina (razão molar 45:55)	Tumor sólido avançado	I
Liposome-annamycin (pó)	Intravenoso	Anamicina	DSPC, DSPG e Tween	Leucemia linfocítica aguda	I/II

Fonte: Adaptado de CHANG e YEH, 2012.