

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia**

Ligia Elena de Souza

Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimização do processo de encapsulação do antimoniato de meglumina.

**Belo Horizonte
2013**

Ligia Elena de Souza

Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimização do processo de encapsulação do antimoniato de meglumina

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard

**Belo Horizonte
2013**

Resumo

Os lipossomas, por serem direcionados passivamente para o fígado, o baço e a medula óssea, que representam os principais sítios de infecção na leishmaniose visceral (LV), permitem aumentar a eficácia de fármacos anti-leishmania, como os antimoniais pentavalentes, no tratamento dessa doença. Estudos prévios levaram ao desenvolvimento de formulação do antimoniato de meglumina (AM) em lipossomas convencionais compostos por fosfatidilcolina (DSPC), colesterol (COL) e dicetilfosfato (DCP), com eficácia comprovada em cães naturalmente acometidos com LV. Além disso, um estudo mais recente mostrou que a formulação composta pela mistura de lipossomas convencionais e furtivos é mais eficaz na eliminação dos parasitos do baço e medula óssea, quando comparada aos lipossomas convencionais ou furtivos administrados isoladamente. Dando continuidade a este trabalho e visando explicar esse resultado, esta dissertação teve como objetivos: (i) selecionar uma composição lipídica para lipossomas furtivos com base nas suas propriedades farmacocinéticas; (ii) comparar as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição de lipossomas convencionais e furtivos quando administrados isoladamente e na forma de mistura, utilizando o AM como marcador; (iii) avaliar a capacidade de encapsulação do AM em lipossomas de diferentes composições utilizando método FDEL e processo escalonável. Os lipossomas furtivos selecionados foram aqueles formados por DSPC, COL, fosfatidilglicerol (DPPG) e lipídeo peguilado (DSPE-PEG). O estudo farmacocinético da mistura de lipossomas convencionais e furtivos evidenciou que os lipossomas convencionais na presença dos furtivos apresentam um aumento de sua afinidade pelo baço, porém não mostram alteração da sua afinidade pelo fígado, podendo explicar a elevada eficácia da mistura de lipossomas na redução da carga parasitária no baço. Por outro lado, os lipossomas furtivos apresentaram, na mistura, uma redução de sua captura pelo fígado e pelo baço, quando comparados à formulação isolada. Isto sugere uma maior captura desses lipossomas por outros órgãos ricos em macrófagos, como por exemplo, a medula óssea. Partindo da formulação composta por DSPC/COL/DCP, foi evidenciado que a troca do fosfolípido sintético DSPC pelo fosfolípido natural hidrogenado, HSPC, pode ser realizada sem que haja alterações significativas no tamanho e taxa de encapsulação do AM nas vesículas. No entanto, a troca do DCP por DPPG reduziu significativamente a taxa de encapsulação dos lipossomas. O método de produção dos lipossomas empregou apenas equipamentos e tecnologia já utilizados na indústria farmacêutica, de forma que a viabilidade da produção industrial da formulação proposta por este trabalho foi evidenciada.

Abstract

Liposomes, being passively targeted to the liver, spleen and bone marrow, which represent the main sites of infection in visceral leishmaniasis (VL), allow the increase of the effectiveness of anti-leishmania drugs, such as pentavalent antimonials, in the treatment of this disease. Previous studies led to development of a meglumine antimoniate (MA) formulation in conventional liposomes made from phosphatidylcholine (DSPC), cholesterol (CHOL) and dicetyl phosphate (DCP), which showed efficacy in the treatment of dogs naturally affected with VL. Furthermore, a more recent study showed that a formulation of MA composed by the mixture of conventional and stealth liposomes was more effective in the elimination of parasites from spleen and bone marrow, when compared to conventional or stealth liposomes administered separately. As a continuation of this work and in order to explain this result, this thesis aimed to: (i) select a lipid composition for stealth liposomes based in its pharmacokinetics properties; (ii) compare the pharmacokinetics and biodistribution of conventional and stealth liposomes when administered separately or in a mixed form, using MA as a marker; (iii) evaluate the encapsulation of MA in liposomes with different compositions using the FDEL method and a scalable process. Selected stealth liposomes were those formed by DSPC, CHOL, phosphatidylglycerol (DPPG) and pegylated lipid (DSPE-PEG). The pharmacokinetic study of mixed conventional and stealth liposomes showed that conventional liposomes in the presence of stealth ones exhibited an increase of their affinity to the spleen, with no change in their affinity to the liver, which may explain the higher efficacy of the mixed formulation in reducing the spleen parasite load. On the other hand, stealth liposomes showed in the mixture a reduction of their capture by the liver and spleen, when compared to the single formulation. This suggests a greater uptake of these liposomes by other macrophages-rich organs, as the bone marrow, for example. Starting from the DSPC/CHOL/DCP formulation, we found that the exchange of synthetic phospholipid DSPC by natural hydrogenated HSPC, can be carried out without any significant change in the vesicles size and encapsulation efficiency of AM. Nevertheless, the replacement of DCP by DPPG significantly reduced the liposome encapsulation efficiency. The method of producing the liposomes employed only equipment and technology already in use in the pharmaceutical industry. Thus, the feasibility of industrial production of the proposed formulation was established in the present work.

Sumário

1	Revisão da literatura	7
1.1	Leishmanioses	7
1.2	Quimioterapia das leishmanioses	9
1.3	Lipossomas	13
1.3.1	Estrutura e características gerais	13
1.3.2	Métodos de preparo de lipossomas	17
1.3.3	Diferentes tipos de lipossomas	18
1.4	Utilização de formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral	20
2	Objetivo geral	26
2.1	Objetivos específicos	26
3	Justificativa	27
4	Materiais e métodos	29
4.1	Materiais	29
4.2	Animais	29
4.3	Preparação e caracterização do antimoniato de meglumina	29
4.4	Preparação das formulações lipossomais de antimoniato de meglumina	30
4.4.1	Preparação de FATMLVs para os estudos farmacocinéticos	30
4.4.2	Otimização do processo de encapsulação de antimonial em lipossomas FDELS	31
4.4.3	Preparação dos tecidos para a digestão ácida	32
4.4.4	Digestão ácida das amostras	32
4.4.5	Determinação de antimônio por EAAFG	32
4.5	Validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para a determinação da concentração de antimônio em sangue de camundongos	33
4.5.1	Especificidade	33
4.5.2	Linearidade	34
4.5.3	Limite inferior de quantificação	35
4.5.4	Precisão	35
4.5.5	Exatidão	35
4.5.6	Recuperação	36
4.6	Caracterização das formulações	36
4.6.1	Diâmetro hidrodinâmico das vesículas e concentração de vesículas	36
4.6.2	Percentual de encapsulação	37
4.6.3	Capacidade de retenção do antimônio ao longo do tempo	38
4.6.4	Doseamento de lipídios	38

4.7	Estudos farmacocinéticos	40
4.7.1	Substituição do DCP: influência do fosfolípido carregado negativamente na farmacocinética dos lipossomas furtivos.....	40
4.7.2	Estudo farmacocinético de lipossomas convencionais e furtivos e da sua mistura.	41
4.8	Análises Estatísticas	42
5	Resultados e Discussão	43
5.1	Estudos farmacocinéticos de mistura de lipossomas convencionais e furtivos	43
5.1.1	Validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para a determinação da concentração de antimônio em sangue de camundongos.....	43
5.1.2	Substituição do DCP: influência do fosfolípido carregado negativamente na farmacocinética dos lipossomas furtivos.....	48
5.1.3	Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição de lipossomas convencionais e furtivos e da sua mistura	54
5.2	Avaliação da capacidade de encapsulação do antimoniato de meglumina em lipossomas de acordo com o método FDEL e processo escalonável	67
6	Conclusões	71
7	Bibliografia	72

Lista de Abreviaturas

AM – Antimoniato de meglumina
AUC – Área sob a curva
COL – Colesterol
DCP – Dicetilfosfato
DCP-PEG – Lipossomas compostos por DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG
DLS – Espalhamento dinâmico da luz
DPPA – Ácido dipalmitoil fosfatídico
DPPA-PEG – Lipossomas compostos por DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG
DPPG – Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DPPG-PEG – Lipossomas compostos por DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG
DRV – Vesículas formadas por desidratação e reidratação
DSPC – Diestearoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG – Diestearoilfosfatidiletanolamina metoxi-polietilenoglicol
EAAFG – Espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite
FATMLV – Vesículas multilamelares grandes congeladas e descongeladas
FDEL – Liofilização de lipossomas vazios
HSPC – Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
LCONV – Lipossomas convencionais
LCONV/Sb – Lipossomas convencionais marcados com antimoniato de meglumina
LCONV/Vz – Lipossomas convencionais vazios
LPEG – Lipossomas furtivos
LPEG/Sb – Lipossomas furtivos marcados com antimoniato de meglumina
LPEG/Vz – Lipossomas furtivos vazios
LUV – Vesículas unilamelares grandes
LV – Leishmaniose visceral
MLV – Vesículas multilamelares grandes
NTA – Análise individual de nanopartícula
PEG – Polietilenoglicol
REV – Vesículas formadas por evaporação de fase reversa
SUV – Vesículas unilamelares pequenas

1 Revisão da literatura

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias que ocorrem em 98 países no mundo com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em situação de risco. Estima-se que ocorram anualmente 2 milhões de novos casos, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas atualmente no mundo (1). No homem as leishmanioses manifestam-se nas formas cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral.

As características clínicas da leishmaniose cutânea variam conforme a região, refletindo as diferentes espécies de parasitos envolvidos. As lesões clássicas iniciam como uma pápula ou nódulo no local da inoculação do parasito, que cresce lentamente desenvolvendo uma úlcera de bordas elevadas de até 5 cm de diâmetro. As lesões curam gradual e espontaneamente ao longo de meses ou anos, deixando uma cicatriz profunda geralmente desfigurante (2). A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por máculas, pápulas, nódulos ou placas cutâneas amplamente disseminadas pelo corpo ou ainda por infiltração difusa da pele principalmente no rosto, estas lesões não evoluem para ulcerações. As mucosas das narinas e lábios podem ser atingidas. Não cura espontaneamente e as recidivas são comuns após o tratamento (2). A forma mucocutânea apresenta lesões nasais acompanhadas de nódulos e infiltração do septo, levando à obstrução das narinas e posterior perfuração do septo com colapso e alargamento do nariz. Outros tecidos podem ser envolvidos, dentre eles destacam-se faringe, boca, laringe, traqueia e lábio superior. Leva à mutilações severas com obstrução e destruição do nariz, faringe e laringe. Quase nunca evolui espontaneamente para cura (2). A leishmaniose visceral, ou calazar, é caracterizada por febre alta, mal-estar, tremor, calfrios, perda de peso, anorexia e dor no hipocôndrio esquerdo. Os principais sinais clínicos são esplenomegalia, acompanhada ou não de hepatomegalia, palidez das membranas mucosas e linfadenopatias, nos estagios mais avançados da doença são perceptíveis sinais de desnutrição como edemas, alterações nos cabelos e pele. Se não tratada a doença pode levar à morte em dois anos (2).

Nas Américas, a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, pertencente ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*, é o agente etiológico da leishmaniose

visceral. As leishmanioses cutâneas são causadas por espécies dos subgêneros *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e a leishmaniose mucocutânea pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis* (2).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema mononuclear fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as *Leishmanias spp.* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (3).

A classificação das leishmanioses quanto ao reservatório dos parasitos no ciclo compreende dois tipos: (i) as zoonóticas, nas quais os reservatórios são animais silvestres e domésticos, e (ii) as antroponóticas, cujo reservatório é o homem. A transmissão antroponótica está restrita a Bangladesh, Índia e Nepal. Na transmissão zoonótica os animais domésticos ou silvestres infectados não apresentam, necessariamente, os sinais de infecção. Normalmente há poucos amastigotas na pele e nas vísceras e pouca ou nenhuma resposta do hospedeiro. Nos cães, no entanto, principais reservatórios de *L. infantum*, os parasitos são abundantes nas vísceras e na derme, de onde são prontamente retirados pelo vetor. Eventualmente os cães podem morrer em decorrência da infecção. O hábito de manter cães e outros animais domésticos dentro de casa, provavelmente promove a infecção humana (2).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral no cão variam de acordo com a resposta imunológica contra a infecção. Os principais sintomas clínicos da doença incluem lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações, pelo opaco, onicogrifose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorrem a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (4). Cães com sinais clínicos da leishmaniose visceral podem ser tratados ou sacrificados. O tratamento é de baixa eficácia, pois embora na maioria dos cães tratados haja a aparente remissão da doença, a cura parasitológica não é alcançada e, aproximadamente um ano após o fim do tratamento, as recidivas ocorrem em cerca de 80% dos cães tratados. O mais relevante é que um número significativo de cães tratados, em torno de 30%, mesmo quando não apresenta quaisquer sinais ou sintomas clínicos, é capaz de recuperar a infectividade para flebotomíneos dentro de 3 a 5 meses após o último tratamento (5). Portanto, o tratamento pode levar a duas implicações epidemiológicas: o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e a recorrência do risco de transmissão. No entanto, o sacrifício de cães infectados geralmente não é aceito por razões éticas e sociais (6). No Brasil, a eutanásia de todos os animais com diagnóstico positivo é a medida de controle empregada (4), sendo o tratamento proibido com quaisquer produtos de uso humano ou produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (7).

1.2 Quimioterapia das leishmanioses

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis) e estibogluconato de sódio (Pentostam, GlaxoSmithKlein) são os medicamentos de primeira linha para o tratamento das leishmanioses em vários países desde a década de 1940 (8) com eficácia clínica variando entre 35 e 95% (9). Seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado. No entanto, os dois principais modelos de mecanismos de ação propostos até o momento são: (i) o Sb^{+5} se comporta como uma pró-droga e parte da dose administrada é reduzida, *in vivo*, à Sb^{+3} , espécie mais tóxica e ativa (10), há evidências de que os dois podem agir

como agentes redutores nesta conversão (11, 12); e (ii) o Sb^{+5} forma complexos estáveis com ribonucleotídeos (13), podendo inibir os transportadores ou interferir com a via de salvamento das purinas (14). Os estudos sobre a farmacocinética dos antimoniais pentavalentes mostram que esses compostos são rapidamente eliminados da circulação através dos rins, com tempo de meia-vida de aproximadamente 2 horas. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato de meglumina, distribuído exclusivamente pelo Ministério da Saúde que recomenda o tratamento da leishmaniose visceral com a dose de 20mg de Sb^{+5} kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, utilizando-se o limite máximo de 2 a 3 ampolas de Glucantime por dia. Em casos de recidiva o tratamento deve ser repetido por tempo mais prolongado, chegando ao máximo de 40 dias. Se, ainda assim, não houver resultado o caso pode ser rotulado como refratário ao antimonial pentavalente e, então, tratamentos alternativos com medicamentos de segunda linha, desoxicolato sódico de anfotericina B ou suas formulações coloidais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), deverão ser empregados. Os casos graves de leishmaniose visceral devem ser tratados em hospitais de referência e os leves ou intermediários assistidos em ambulatórios das unidades de saúde por profissionais capacitados (4). Os efeitos colaterais e reações adversas da quimioterapia com antimonial incluem anorexia, vômito, náusea, dor abdominal, mal estar, mialgia, atralgia, dor de cabeça, gosto metálico, letargia, aumento de enzimas pancreáticas e hepáticas, leucopenia, anemia, trombocitopenia, arritmias e alterações eletrocardiográficas como inversão da onda T e aumento do intervalo Q-T (2).

A anfotericina B é um antifúngico poliênico que apresenta eficácia clínica superior a 97% no tratamento da leishmaniose visceral. É a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática do parasito, interrompendo sua síntese (4). A dose recomendada é de 1mg/kg/dia, em infusão lenta, administrada em dias alternados. Durante a infusão pode ocorrer febre, cefaléia, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. Dentre os efeitos colaterais comuns estão a hipocalcemia nefrotoxicidade e reação anafilática na primeira dose (2, 9). Sua administração é

exclusivamente intra-hospitalar. A anfotericina B substituiu os antimoniais pentavalentes como o medicamento de primeira linha para o tratamento da leishmaniose visceral no estado de Bihar na Índia, onde a taxa falha no tratamento com os antimoniais chegou 65% ainda nos anos 2000 (15).

A anfotericina B lipossomal é considerada o melhor medicamento contra a leishmaniose visceral e é usada como primeira linha na Europa e Estados Unidos. Apresenta eficácia clínica superior a 90% e um regime de administração mais simples, de 4 a 10 doses de 5 a 20 mg/kg por 10 a 20 dias. Sua toxicidade é consideravelmente menor que a da anfotericina B, mas eventualmente leva à nefrotoxicidade e trombocitopenia. As reações à infusão incluem febre, convulsões e calafrios. Com o custo do tratamento em cerca de 3000 dólares o uso da anfotericina B lipossomal era considerada inviável em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Em 2007, após a intervenção da Organização Mundial de Saúde, o custo médio do tratamento para os setores de saúde pública dos países onde a leishmaniose visceral é endêmica passou a ser de 280 dólares (9, 16).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como um agente antitumoral é o primeiro medicamento oral eficaz no tratamento da leishmaniose visceral. É um análogo da fosfatidilcolina e interfere na sinalização celular e na síntese de lipídios da membrana do parasito (17). Apresenta eficácia clínica superior a 90% (17 - 19). A posologia recomenda é de 2 a 2,5 mg/kg/dia, até o máximo de 150 mg/dia, durante 28 dias. Os principais efeitos colaterais são anorexia, náusea, vômito e diarreia (observados em 20 a 55% dos pacientes), alergias cutâneas, aumento da transaminase hepática, insuficiência renal e teratogenicidade potencial. É utilizada na Índia e na Etiópia (2, 9). A resistência do parasito é facilmente induzida *in vitro*, além disso, o longo esquema posológico externo a unidades hospitalares contribui para a não aderência do paciente ao tratamento, levando ao desenvolvimento de resistência. Ainda, o uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose visceral canina na Europa também aumenta o desenvolvimento de cepas de *Leishmania infantum* resistentes (16).

Paromomicina, antigamente conhecida como aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo usado no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, é o único aminoglicosídeo com importância clínica no

tratamento das leishmanioses. O mecanismo de ação contra *Leishmania spp.* não foi elucidado, seu efeito leishmanicida pode estar associado à inibição do metabolismo do parasito e da respiração mitocondrial. Estudos *in vitro* têm mostrado que a paromomicina pode matar tanto as formas promastigotas quanto amastigotas, no entanto, a resistência do parasito foi rapidamente induzida *in vitro*. Apresenta eficácia clínica superior a 90%. A posologia indicada é 15 mg/kg/dia por 21 dias. Seus principais efeitos adversos incluem dor no local da injeção, oto, nefro e hepatotoxicidade, todos reversíveis (9, 20).

Em comparação com a leishmaniose visceral, há poucas opções de tratamento para a leishmaniose cutânea, cuja resposta ao tratamento com antimônio pentavalente é imprevisível. Vários medicamentos, tais como pentamidina, fluconazol, azitromicina e itraconazol têm sido utilizados como terapia sistêmica para as formas cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e pós-calazar. A falta de ensaios clínicos randomizados bem controlados para as várias formas de doença tegumentar é uma lacuna importante na formulação de diretrizes para o tratamento destas doenças. Várias formulações tópicas de paromomicina apresentam eficácia variável contra a leishmaniose cutânea, ensaios clínicos estão em andamento para identificar as mais efetivas e menos irritantes (21).

A terapia baseada na combinação dos medicamentos disponíveis atualmente vem sendo considerada por várias razões. Primeira, a combinação de medicamentos quimicamente diferentes pode reduzir a duração do tratamento ou a dose total dos medicamentos resultando em redução da toxicidade, aumento da adesão do paciente e menor sobrecarga dos sistemas públicos de saúde. Segundo, pode retardar a emergência de resistência e aumentar a vida útil dos respectivos medicamentos. Terceiro, pode aumentar a eficácia do tratamento em casos de co-infecção com o vírus HIV ou em pacientes imunossuprimidos. Há poucos dados pré-clínicos sobre a eficácia de terapias baseadas na combinação de medicamentos. Dentre eles cita-se a associação de antimonial pentavalente com paromomicina e da anfotericina B lipossomal, em dose única, seguida de miltefosina, por 7 a 14 dias. Ambos estudos foram conduzidos na Índia e apresentaram eficácia superior a 90%. Na África, os Médicos Sem Fronteiras usaram estibogluconato de sódio associado à paromomicina durante uma epidemia no Sudão na década de 1980, esta terapia reduziu a mortalidade e as complicações decorrentes do tratamento. Serão

necessários, ainda, vários anos até que haja dados clínicos suficientes para que a combinação de terapias seja efetivamente implementada (9, 21).

Diante das limitações dos tratamentos existentes até o momento, a Organização Mundial de Saúde recomenda e apoia pesquisa que levem ao desenvolvimento de medicamentos contra a leishmaniose e considera prioridade além do desenvolvimento de novos medicamentos, o reaproveitamento de medicamentos existentes no mercado e o desenvolvimento de novas terapias que evitem a resistência do parasito. (21).

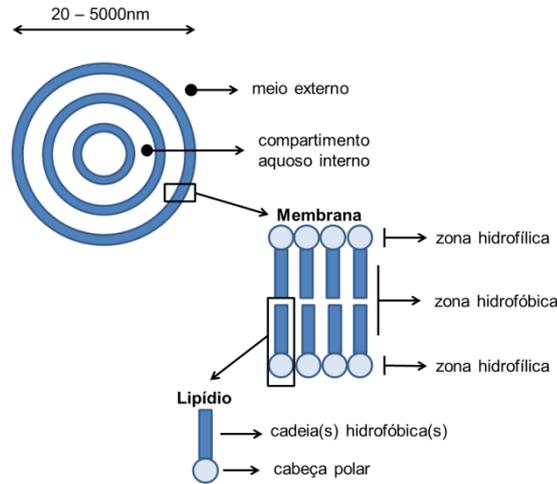
1.3 Lipossomas

1.3.1 Estrutura e características gerais

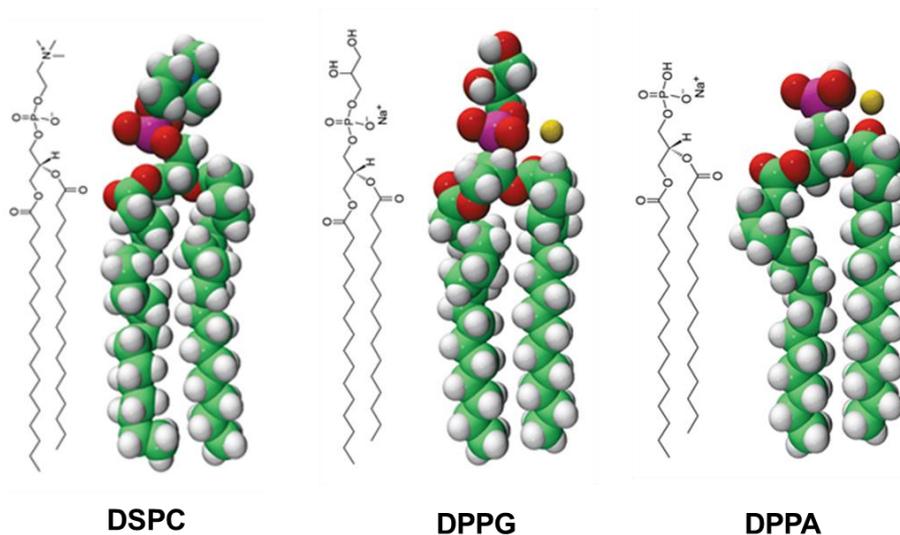
Lipossomas são vesículas artificiais esféricas microscópicas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos com diâmetro médio entre 20 nm a 5 µm. A característica típica dos lipídios que formam a bicamada é sua natureza anfifílica: uma cabeça polar ligada a uma ou duas cadeias carbônicas hidrofóbicas. Quando estes lipídios são expostos a um meio aquoso interações hidrofílicas entre as cabeças polares e a água e o efeito hidrofóbico entre a água e as cadeias carbônicas levam a formação espontânea de bicamadas fechadas, Figura 1. São, geralmente, preparados a partir de lipídios não iônicos ou zwitteriônicos tais como a fosfatidilcolina; sua carga superficial pode ser modificada pela incorporação de lipídios carregados positiva ou negativamente e a fluidez alterada através da adição de colesterol (22). Os lipossomas são sistemas versáteis cujas características como tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipuladas em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos, podendo, inclusive, encapsular fármacos hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Uma vantagem dos lipossomas em relação a outros sistemas carreadores de medicamentos é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando são formados de lipídios naturais (23).

Figura 1 – Estrutura dos lipossomas e dos fosfolipídios DSPC, DPPG e DPPA.

A



B



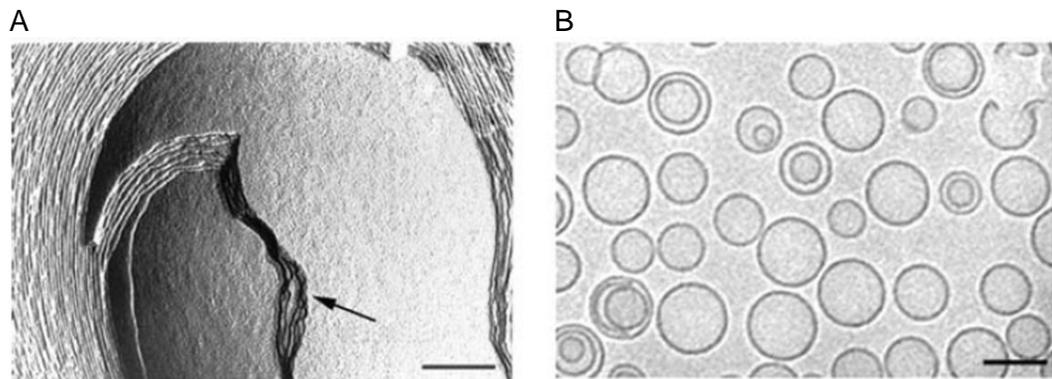
(A) Estrutura esquemática dos lipossomas. Adaptado de Frezard, 2005 (23). (B) Estrutura molecular dos fosfolipídios DSPC, DPPG e DPPA. (adaptado de Avanti Polar Lipids, Inc.).

A fluidez da membrana, quando formada de um único lipídio, depende da temperatura de transição de fase (T_C) daquele lipídio. Quando a temperatura do meio estudado é maior que a temperatura de transição de fase do lipídio a membrana passa da fase gel, onde as cadeias carbônicas estão em um estado ordenado, para a fase cristal-líquido, um estado desordenado no qual as moléculas têm maior liberdade de movimento. Logo, de acordo com a temperatura de transição de fase, membranas compostas por diferentes lipídios podem exibir níveis diferentes

de fluidez à mesma temperatura. A permeabilidade de uma determinada membrana é maior quando esta se encontra na fase cristal-líquido e menor na fase gel. A rigidez das membranas é modificada pela adição do colesterol à sua composição. O colesterol é capaz de aumentar a rigidez da membrana na fase cristal-líquido e, na fase gel, reduzir a rigidez e os defeitos estruturais. A adição de lipídios carregados positiva ou negativamente na composição dos lipossomas altera a carga superficial das membranas, o que pode influenciar na taxa de incorporação de substâncias, impedir a agregação ou fusão das vesículas e modular seu destino no organismo (23).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com seu tamanho e número de camadas. As vesículas grandes multilamelares (*multilamellar large vesicles* - MLV), são relativamente simples de serem obtidas, pois geralmente se formam espontaneamente quando a mistura de lipídios formadora da bicamada é hidratada em excesso de água. São grandes e tipicamente apresentam tamanho heterogêneo, variando de 0,5 a 10 μm , têm vários compartimentos internos, baixa taxa de encapsulação de fármacos hidrofílicos e pouca reprodutibilidade entre preparações, tendo, portanto, utilização limitada. Um sistema mais desejável, em função da sua elevada taxa de encapsulação de substâncias hidrossolúveis e de seu tamanho mais homogêneo, é aquele em que a vesícula apresenta apenas uma bicamada na qual, aproximadamente, 50% dos lipídios estejam presentes na monocamada exterior: esta é a definição típica de LUVs, vesículas grandes unilamelares (*large unilamellar vesicles*), cujo tamanho é maior que 100 nm. As LUVs podem ser obtidas através da extrusão, técnica que, utilizando gás nitrogênio, aplica pressões moderadas (entre 100 e 800 lb/in^2) para forçar as MLVs a passarem por filtros de policarbonato com poros de tamanho definidos (24), Figura 2. Há ainda as chamadas SUVs vesículas pequenas unilamelares (*small unilamellar vesicles*) com diâmetro menor que 100 nm, estas pequenas vesículas não só comportam volumes muito pequenos, o que limita a sua utilidade, como também estão sujeitas a restrições que podem torná-las fisicamente instáveis (25).

Figura 2 – Morfologia de lipossomas de tipo MLV e LUV visualizada por microscopia eletrônica.



(A) A íntima sobreposição de múltiplas bicamadas internas de MLVs compostas por fosfatidilcolina de ovo vista por microscopia eletrônica de varredura após criofratura (seta). (B) Vesículas compostas por fosfatidilcolina de ovo e colesterol predominantemente unilamelares obtidas após extrusão em membranas de poros de 100nm, visualizadas por microscopia crioelétrica. A barra representa 100 nm. Adaptado de *Lyposomes Technology*, vol 1, ed. 3, p. 60 (25).

Após administração endovenosa os lipossomas interagem com pelo menos dois grupos distintos de proteínas plasmáticas: lipoproteínas plasmáticas de alta densidade e opsoninas, que mediam a fagocitose dos lipossomas pelos macrófagos. A taxa de depuração dos lipossomas do sangue depende da capacidade das opsoninas de se ligarem à superfície dos lipossomas. Influenciam a depuração dos lipossomas: a rigidez da membrana, sendo as mais rígidas removidas mais lentamente; a carga superficial, vesículas neutras se mantêm na circulação sanguínea por mais tempo; e o tamanho das vesículas, as maiores são mais rapidamente depuradas. No entanto, independentemente do tempo de circulação dos lipossomas, a maior parte da dose injetada é captada pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário do fígado, baço e medula óssea. Dentro dos lipossomas, as vesículas são destruídas e seu conteúdo liberado localmente e, dependendo de sua natureza, pode permanecer dentro do lipossoma, ser lançado no citoplasma ou difundir para fora da célula (22, 26).

Lipossomas podem alterar a distribuição tecidual e taxa de depuração de uma droga fazendo com que a droga, quando encapsulada em vesículas estáveis, assumam os parâmetros farmacocinéticos do lipossoma. Tais parâmetros dependem de suas propriedades físico-químicas como tamanho, carga superficial, fluidez da membrana, estabilização estérica e via de administração. A dose de lipídio administrada também tem papel relevante no tempo de meia vida do lipossoma, lipossomas

convencionais são removidos da circulação sanguínea de maneira dose-dependente, indicando que o mecanismo de captação é saturável, não linear. O tempo de circulação aumenta em função do aumento da dose administrada. Este efeito é provavelmente devido à diminuição da capacidade fagocitária dos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear e à saturação das opsoninas plasmáticas. A estabilização estérica dos lipossomas com polietilenoglicol torna a sua cinética dose independente pelo menos em doses tão altas quanto 120 mg/kg de peso corporal para camundongos (27, 28).

1.3.2 Métodos de preparo de lipossomas

Os lipossomas podem ser obtidos a partir de diferentes métodos de preparo. Alguns dos quais são descritos a seguir.

No método de “evaporação em fase reversa” os lipídios são solubilizados em solvente orgânico e a esta solução acrescenta-se a fase aquosa, as fases são submetidas à agitação mecânica para a formação de uma emulsão água em óleo, o solvente orgânico é cuidadosamente removido em evaporador rotativo. As vesículas produzidas por este método são oligolamelares e chamadas de REV (*reverse phase evaporation vesicles*) (23, 25).

O método “hidratação do filme lipídico” consiste na obtenção de um fino filme lipídico após a solubilização dos lipídios em solvente orgânico seguida da evaporação do solvente em um evaporador rotativo. A este filme adiciona-se a fase aquosa contendo ou não o princípio ativo desejado, levando a formação de vesículas multilamelares, MLVs. As MLVs são grandes e heterogêneas e tem pouca capacidade de encapsulação. As vesículas obtidas pelo método de “hidratação do filme lipídico” submetidas a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento dão origem a vesículas chamadas de FATMLV (do inglês *frozen and thawed multilamellar large vesicles*). Os ciclos de congelamento e descongelamento levam a importante alteração na morfologia das vesículas. Inicialmente compostas de várias camadas apostas em um empacotamento que lembra uma cebola, após pelo menos 5 ciclos os espaços intralamelares ficam maiores e o número de lamelas diminui, permitindo que o volume encapsulado seja cerca de 10 vezes maior que o volume encapsulado pelas MLVs (23, 29).

O método “desidratação e reidratação” consiste em preparar MLVs utilizando apenas água, submetê-las à ultrasonicação para a obtenção de vesículas pequenas unilamelares, SUVs, acrescentar às SUVs a solução aquosa contendo a substância que se pretende encapsular e, em seguida, liofilizar a mistura. Após a liofilização o produto é reconstituído com água em temperatura superior a temperatura de transição de fase dos fosfolipídios utilizados. Este método gera vesículas chamadas de DRV (*dehydration-rehydration vesicles*) (23).

O método de “liofilização de lipossomas vazios” emprega a liofilização de vesículas pequenas unilamelares vazias obtidas a partir de MLVs e o pó liofilizado é reconstituído com a solução aquosa de interesse, em temperatura superior a temperatura de transição de fase dos fosfolipídios que compõem o lipossoma. As vesículas geradas por este método são chamadas FDEL (*freeze-dried empty liposomes*) (30).

1.3.3 Diferentes tipos de lipossomas

Os lipossomas são considerados promissores como sistemas transportadores de drogas desde a década de 1970, quando vários estudos mostraram seu grande potencial (27). Um dos maiores obstáculos para a sua utilização com este fim é a sua rápida remoção da circulação sanguínea pelas células do sistema mononuclear fagocitário (31). A inclusão de fosfolipídios ligados covalentemente a polímeros hidrofílicos flexíveis, tais como o polietilenoglicol – PEG, na composição dos lipossomas, proposta ao final da década de 1980, minimizou este problema. A presença do PEG reduz a captação dos lipossomas pelo sistema mononuclear fagocitário e aumenta a sua permanência na circulação sanguínea. O polímero ocupa o espaço adjacente à superfície do lipossoma criando um impedimento estérico e, conseqüentemente, prejudicando a interação de macromoléculas e células com o lipossoma (32). Estes lipossomas com a superfície modificada pela inclusão de PEG são chamados de “lipossomas furtivos” ou “lipossomas estabilizados estericamente” ou ainda “lipossomas peguilados”. Figura 3.

Para aumentar o direcionamento e o acúmulo do lipossoma em tecidos ou órgãos específicos, o uso de ligantes capazes de reconhecer e se ligar a determinadas células foi proposto ainda na década de 1980. As imunoglobulinas da classe IgG e seus fragmentos, por exemplo, podem ser ligadas covalentemente à superfície das

vesículas ou inseridas na bicamada lipídica sem alterar a integridade do lipossoma ou as propriedades do anticorpo. No entanto, apesar do avanço na eficácia do direcionamento, a maioria dos imunolipossomas acumula no fígado, como consequência do tempo insuficiente para a interação com a célula alvo. O passo seguinte no desenvolvimento deste tipo lipossomas foi a combinação das propriedades dos lipossomas furtivos e dos imunolipossomas, através da ligação de moléculas direcionadoras na porção distal do polímero (33). Uma enorme quantidade de ligantes vem sendo estudada, incluindo peptídios, anticorpos, proteínas, polissacarídios, glicolipídios, glicoproteínas e lecitinas (34).

Utilizando componentes sensíveis a alterações de pH, uma nova classe de lipossomas foi desenvolvida: os lipossomas pH-sensíveis, estas vesículas são estáveis em pH neutro (pH 7,4) e se desestabilizam em pH ácido, tais como os encontrados em tumores, endossomas e lisossomas. Foram concebidos para liberar seu conteúdo no citosol ou no interior do endossomo. Quatro classes de lipossomas pH-sensíveis foram descritas. A primeira combina lipídios polimórficos, fosfatidiletanolamina, por exemplo, com moléculas anfifílicas levemente ácidas que atuam como estabilizadoras em pH neutro. A segunda inclui lipossomas compostos de lipídios cuja hidrólise ácida resulta no aumento de componentes desestabilizantes da membrana e, portanto, no aumento da permeabilidade aos solutos encapsulados. A terceira utiliza peptídios sensíveis ao pH ou proteínas de fusão reconstituídas para desestabilizar as membranas em pH ácido. A última utiliza polímeros tituláveis que mudam de conformação em pH baixo desestabilizando a membrana lipossomal (32).

Outras abordagens promissoras para a aplicação de lipossomas como sistemas carreadores de fármacos podem ser citadas. Do ponto de vista clínico a capacidade dos lipossomas encapsularem proteínas e peptídios e introduzi-los no citoplasma ou lisossomos de células vivas pode ter grande relevância no tratamento de doenças hereditárias causadas por funcionamento anormal de enzimas ou no tratamento do câncer, assim como o uso de lipossomas policatiônicos como transportadores de genes ou de oligonucleotídios *antisense* ou, ainda, ligados a proteínas capazes de penetrar nas células. Outro exemplo são os virossomas que são lipossomas com a superfície modificada por proteínas fusogênicas provenientes de envelopes virais. Lipossomas contendo agentes de diagnósticos ligados covalentemente à membrana

ou incorporados em seus diferentes compartimentos vem sendo usados experimentalmente em cintilografia, ressonância magnética e tomografia computadorizada. Ainda, lipossomas contendo material magnético, além do medicamento, para direcioná-los ao local de ação pela aplicação de campo magnético (33). Figura 3.

Figura 3 – Diferentes tipos de lipossomas.

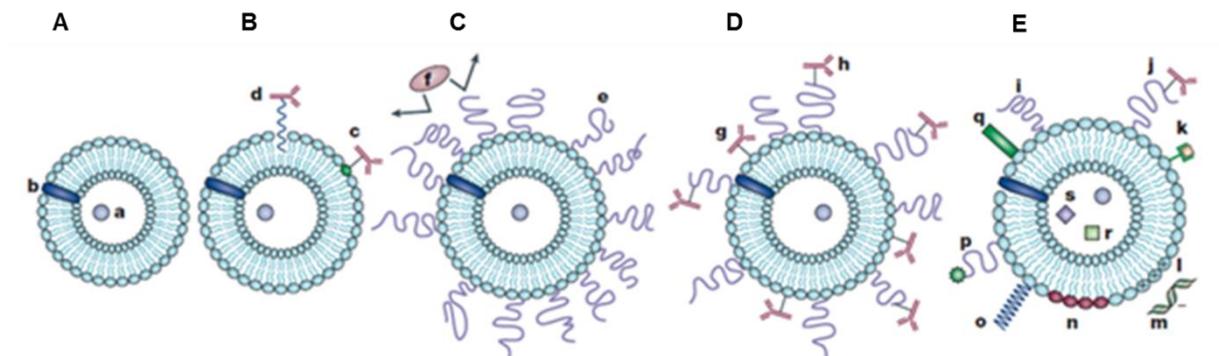


Fig. 3 – (A) Lipossomas convencionais com conteúdo hidrossolúvel (a) encapsulado em seu compartimento interno e substância lipossolúvel (b) incorporada à membrana. (B) Imunolipossomas com anticorpo ligado covalentemente ao fosfolipídio da membrana (c) ou ancorado na membrana após ligação com fração hidrofóbica (d). (C) Lipossomas de circulação prolongada associado a polímero, tal como PEG (e), que protege sua superfície contra interações com células e macromoléculas (f). (D) Imunolipossomas de circulação prolongada ligado simultaneamente a polímero e anticorpo que pode estar acoplados diretamente à superfície da membrana (g) ou, preferencialmente, à extremidade distal da cadeia polimérica (h). (E) Novas gerações de lipossomas, cuja superfície pode ser modificada separada ou simultaneamente de diferentes maneiras. Dentre elas pela incorporação de polímeros protetores (i) ou polímeros protetores associados a partículas direcionadoras (j); de agentes diagnósticos (k); de lipídios carregados positivamente (l) que permitem a complexação com DNA (m); de lipídios (n) ou polímeros (o) sensíveis a estímulos, como alteração de pH; de peptídeos penetrantes em células (p); de componentes virais (q). Os lipossomas podem ainda ser carregados com partículas magnéticas (r) e ou preparações coloidais de prata ou ouro (s) para microscopia eletrônica. Adaptado de Torchilin, 2005, p. 146 (33).

1.4 Utilização de formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral

Durante os últimos anos vários novos medicamentos ou tratamentos para doenças tropicais têm sido desenvolvidos ou realizados através de reposicionamento de drogas. Um senso de urgência para tratar essas doenças levou a abordagens pragmáticas com objetivos a curto e médio prazos, favorecendo a avaliação da terapia de combinação e a redefinição de drogas conhecidas. Esta estratégia reduz consideravelmente o tempo e o custo de ter um tratamento aprovado após confirmação da eficácia, uma vez que a maioria dos dados toxicológicos e os

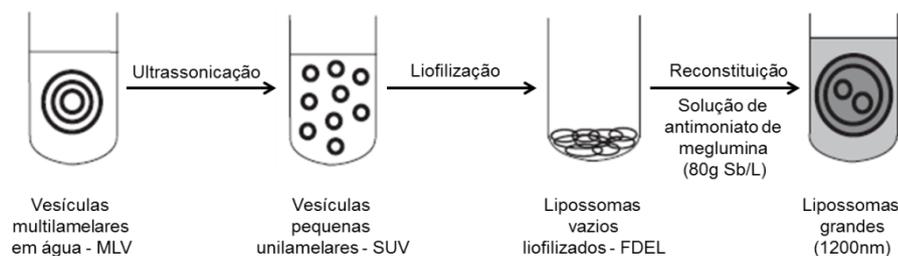
ensaios clínicos já estão disponíveis (14). Neste sentido, esforços vêm sendo dedicados para tornar a terapia à base de antimoniais pentavalentes menos tóxica e mais eficaz, inclusive por vias não invasivas. As estratégias mais promissoras envolvem o uso de sistemas carreadores de fármacos, principalmente lipossomas que, em consequência de sua rápida captação pelas células do sistema mononuclear fagocitário, direcionam o antimônio para o fígado e o baço, locais de infecção da leishmaniose visceral (35, 36). Portanto, a administração de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, na forma encapsulada em lipossomas, resulta no aumento de sua concentração nestes órgãos, assim como na redução da concentração em órgãos que apresentam capilares contínuos (22, 27), como, por exemplo, o coração (37). O primeiro relato de encapsulação de antimonial pentavalente em lipossomas data de 1977, quando um grupo de pesquisadores de Londres mostrou que lipossomas contendo estibogluconato de sódio foram cerca de 200 vezes mais efetivos que a droga livre contra *Leishmania donovani* em modelo murino de leishmaniose visceral, ambos administrados em uma única dose endovenosa (35).

A complexidade do desenvolvimento de formulações lipossomais, quando comparado com os medicamentos convencionais, reside não só em questões farmacológicas, mas também em problemas tecnológicos relacionados com a sua produção, um ponto crítico é a escolha do método de preparação da formulação. O grau de dificuldade aumenta consideravelmente quando o medicamento a ser encapsulado é hidrossolúvel, pois a obtenção de alta eficiência de encapsulação e a estabilidade em longo prazo passa a ser um grande desafio (36). A escolha da composição da formulação também é crítica, os lipossomas utilizados para a encapsulação de antimoniais pentavalentes são compostos de misturas de fosfatidilcolina (PC) natural ou sintética, colesterol (COL) e um lipídio carregado negativamente, normalmente o dicetilfosfato (DCP); a presença da carga negativa na superfície das vesículas está diretamente relacionada com a eficiência de encapsulação, lipossomas carregados negativamente encapsulam volumes maiores de antimoniais que lipossomas carregados positivamente (35). Fosfatidilcolinas com cadeias carbônicas longas e saturadas são frequentemente preferidas em função de sua baixa susceptibilidade à oxidação e por formarem membranas menos permeáveis aos solutos (36). No entanto, o DCP, apesar de conferir estabilidade e elevada taxa

de encapsulação às formulações lipossomais de antimoniais pentavalentes (38), apresenta toxicidade quando administrado em formulações preparadas a partir do método de evaporação em fase reversa (39).

A evolução histórica do grupo de pesquisa do Prof. Frédéric Frézard na busca por uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral canina pode ser assim resumida. Em 2000 o processo de liofilização de lipossomas vazios (*Freeze-dried Empty Liposomes – FDEL*) foi utilizado para encapsular antimoniato de meglumina, a formulação resultante apresentou alta atividade antileishmanial em hamsters infectados com *Leishmania (L.) infantum*. Este método é baseado na liofilização de lipossomas vazios carregados negativamente e na subsequente reidratação do pó liofilizado com solução aquosa de antimoniato de meglumina, Figura 4. O método FDEL apresenta duas vantagens tecnológicas quando comparado a outros métodos: ele não expõe o antimonial pentavalente ao processo de obtenção dos lipossomas, reduzindo, assim, riscos de alteração química do princípio ativo e os lipossomas podem ser armazenados como vesículas pré-formadas vazias e liofilizadas e a reidratação realizada no momento da administração (40).

Figura 4 – Método de preparação de lipossomas FDEL contendo antimoniato de meglumina.

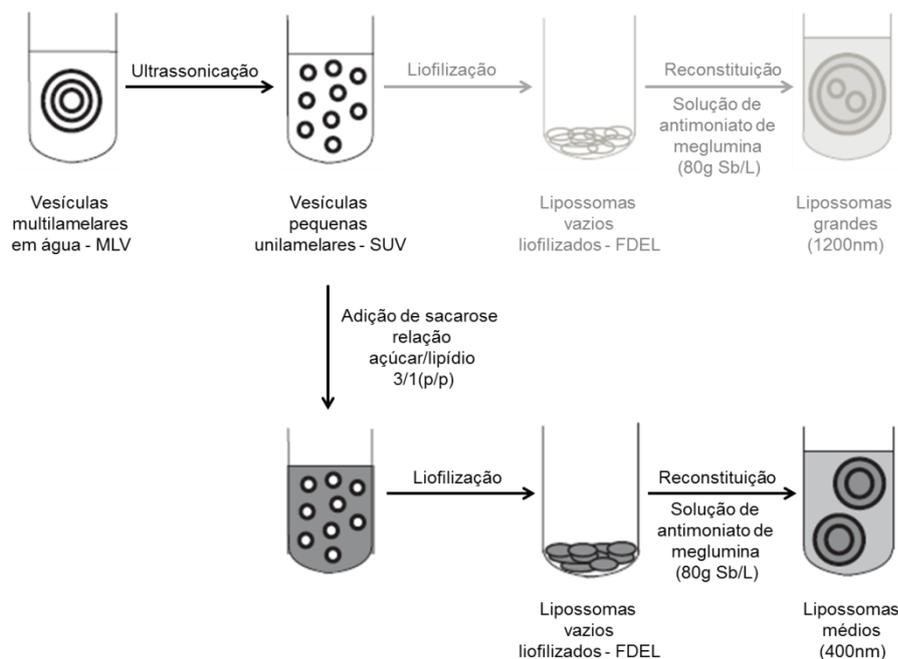


Adaptado de Frézard, 2010, p. 1347 (35).

Após a administração endovenosa de uma única dose desta formulação em cães saudáveis, foram observadas concentrações elevadas de antimônio no fígado e baço dos animais por um longo período de tempo, mas não na medula óssea, sugerindo que este último seja o órgão crítico para o tratamento com esta formulação (41). No entanto, o tratamento de cães naturalmente infectados utilizando doses múltiplas da mesma formulação, quatro doses sendo uma a cada quatro dias, foi eficaz no aumento dos níveis de antimônio na medula óssea de cães com leishmaniose visceral sem, contudo, eliminar completamente o parasita dos tecidos dos animais

(42). Foi levantada a hipótese de que o grande tamanho dos lipossomas, diâmetro médio maior do que 1 μm , poderia ser responsável pelo baixo direcionamento do antimônio à medula óssea. Assim, o processo de preparo dos tais lipossomas foi modificado pela introdução de açúcar crioprotetor antes da etapa de liofilização. Figura 5. O crioprotetor evita a fusão das membranas desidratadas e o consequente vazamento da substância encapsulada no momento da reidratação, além de gerar suspensão de lipossomas de tamanho reduzido e mais homogêneo.

Figura 5 – Método de preparação de lipossomas FDEL contendo antimoniato de meglumina modificado pela adição de sacarose como açúcar crioprotetor para obtenção de vesículas de tamanho médio homogêneo.



Adaptado de Frezard, 2010, p. 1347 (35).

Duas formulações de tamanhos diferentes, 400 e 1200 nm, foram administradas em cães naturalmente infectados, nas mesmas doses de lipídio e de antimônio, e foram comparadas por sua capacidade de direcionar o antimônio para a medula óssea. Os lipossomas menores, com diâmetro médio de 400 nm, promoveram, neste tecido, níveis de antimônio três a quatro vezes maiores do que aqueles alcançados com os lipossomas maiores, de diâmetro médio de 1200 nm. Estes dados sugerem fortemente que a redução do tamanho dos lipossomas promoveu um maior direcionamento da droga para a medula óssea de cães (43). Em estudo posterior a eficácia terapêutica e a toxicidade da formulação do antimoniato de meglumina em

lipossomas de tamanho reduzido, FDEL 400 nm, foi avaliada em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum*. A avaliação dos marcadores das funções renal, hepática e hematopoiética antes e logo após o tratamento não mostrou alterações significativas. Avaliações parasitológicas da medula óssea quatro dias após o tratamento mostrou uma redução significativa da carga parasitária no grupo tratado, quando comparado aos grupos controle. Avaliações imunocitoquímicas da carga parasitária na pele, nos linfonodos, no fígado, no baço e na medula óssea, cinco meses depois do tratamento, mostraram uma redução significativa nos linfonodos, no fígado e no baço dos animais do grupo tratado, quando comparados aos animais do grupo controle. Quando flebotomíneos da espécie *Lutzomyia (L.) longipalpis* foram alimentadas nos animais dos diferentes grupos cinco meses após o tratamento, uma taxa de infecção significativamente menor foi encontrada no grupo tratado, quando comparados aos grupos controle. Cinco meses após o tratamento, culturas de medula óssea dos animais do grupo tratado ainda apresentaram a presença do parasito. Além disso, a carga parasitária na pele dos animais do grupo tratado não foi significativamente reduzida com relação àquela do grupo controle (44). O baixo direcionamento dos lipossomas para os sítios de infecção na pele pode ser visto como uma limitação deste tratamento, já que esses sítios são considerados os mais relevantes para a transmissão do parasito ao vetor. Apesar da supressão do parasito no baço e fígado, o bloqueio da infectividade não foi alcançado. Em estudo mais recente avaliou-se a eficácia do tratamento combinado desta formulação lipossomal com o medicamento alopurinol em cães naturalmente infectados, pela primeira vez foi mostrada a cura parasitológica em cinquenta por cento dos animais tratados (45).

Os resultados descritos acima sugerem que o aprimoramento da formulação de lipossomas através da redução do tamanho das vesículas e da adição de polímeros de etilenoglicol à superfície da vesícula, visando o prolongamento do seu tempo de circulação sanguínea, poderia favorecer o direcionamento da droga aos alvos menos acessíveis, aumentando ainda mais a taxa de cura dos animais. De fato, a redução do diâmetro dos lipossomas de 400 nm para 175 nm e a sua aplicação em cães naturalmente infectados resultou no aumento do tempo de meia-vida de eliminação e na redução da absorção hepática do antimônio (46). Estudo farmacocinético de lipossomas furtivos contendo antimoniato de meglumina em cães naturalmente

infectados permitiu mostrar um tempo de circulação prolongado do antimônio bem como o seu direcionamento para a medula óssea (47). Estudos de eficácia em modelo murino realizados com formulações lipossomais compostas de mistura de lipossomas convencionais e furtivos em proporção equimolar de lipídio e antimônio apresentaram evidências de que estas formulações são superiores às formulações convencionais ou furtivas administradas separadamente. Mais especificamente, a mistura de lipossomas foi significativamente mais eficaz na redução da carga parasitária no baço e na medula óssea de camundongos infectados com *Leishmania (L). Infantum* quando comparadas às formulações de lipossomas convencionais ou furtivos. Neste estudo, porém, o comportamento farmacocinético da mistura de lipossomas foi parcialmente avaliado, não havendo dados do direcionamento do antimônio para o fígado e o baço (47). Dessa forma, estudos adicionais se fazem necessários para elucidar as propriedades farmacocinéticas de cada tipo de lipossoma quando administrados na forma de mistura.

2 Objetivo geral

Caracterizar uma mistura de lipossomas convencionais e furtivos quanto às suas propriedades farmacocinéticas em camundongos e a capacidade de encapsulação de antimoniato de meglumina usando processo escalonável.

2.1 Objetivos específicos

Validar o método analítico para a determinação de antimônio em sangue digerido de camundongos usando a técnica de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite.

Selecionar uma composição lipídica para lipossomas furtivos com base nas suas propriedades farmacocinéticas.

Comparar as propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição de lipossomas convencionais e furtivos quando administrados isoladamente e na forma de mistura.

Avaliar a capacidade de encapsulação do antimoniato de meglumina em lipossomas de diferentes composições utilizando método FDEL e processo escalonável.

3 Justificativa

Há mais de uma década o grupo de pesquisadores do LabNano vem trabalhando no desenvolvimento de formulações lipossomais do antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral. No ano de 2000 o método de preparo dessas formulações através de liofilização de lipossomas vazios (*Freeze-Dried Empty Liposomes* - FDEL) foi utilizado pelo grupo agregando como vantagens tecnológicas a estabilidade físico-química da formulação e a não exposição do princípio ativo ao processo de liofilização (40). Três anos mais tarde a eficiência da preparação lipossomal para direcionar o antimônio para o fígado e baço, quando comparada à droga livre, foi comprovada em cães saudáveis. Nesse estudo, no entanto, o direcionamento do metal para a medula óssea, importante local de concentração de parasitos, não foi evidenciado (41). Em 2005 foi avaliada a eficácia da nova formulação em cães naturalmente infectados, mas não houve completa eliminação do parasito na medula óssea (42). A redução do tamanho dos lipossomas de 1200nm para 400nm, proposta em 2006, levou a um maior direcionamento do antimônio à medula óssea, resultando em concentração cerca de três vezes maior em cães saudáveis (43). Em 2008 quando a eficácia da formulação acima foi avaliada em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* também apresentou bons resultados. No entanto, os animais não foram curados (44). Em 2011 uma nova redução do tamanho dos lipossomas resultou em alterações farmacocinéticas, sem, porém, modificar de forma importante a concentração de antimônio na medula óssea (46). Estudos com lipossomas de superfície modificada com polímero de etilenoglicol para a veiculação de antimoniato foram iniciados. Dados ainda não publicados mostram que esses lipossomas aumentam o tempo de circulação do antimônio no sangue e o seu direcionamento para a medula óssea em cães naturalmente infectados. Evidências de que a mistura de lipossomas convencionais e furtivos teria maior eficácia na redução da carga parasitária do baço e medula óssea de camundongos infectados com *Leishmania infantum*, quando comparadas às formulações compostas apenas de lipossomas convencionais ou de lipossomas furtivos (47), apontam para a necessidade de estudos farmacocinéticos aprofundados destas formulações para explicar estes resultados, uma vez que neste estudo o comportamento farmacocinético da mistura de lipossomas não foi elucidado, não havendo dados do direcionamento do antimônio para o fígado e baço dos animais. Neste aspecto, torna-se importante investigar a possível interferência

de um tipo de lipossoma na biodistribuição do outro tipo. Outra questão pendente refere-se à viabilização das formulações à base de lipossomas como produto farmacêutico. Isto envolve a substituição do fosfolípido DCP por fosfolípidos com maior biocompatibilidade além de mudanças no processo de preparo dos lipossomas de forma a torná-lo escalonável.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Os fosfolípidios utilizados, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diestearoil fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol (DSPE-PEG-2000), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), ácido dipalmitoilfosfático (DPPA), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), foram adquiridos da Lipoid GmbH (Alemanha). O colesterol (COL), o dicetilfosfato, a N-metil-D-glucamina e o pentacloreto de antimônio (SbCl_5 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC (Estados Unidos da América). O nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) e o nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) foram comprados da Perkin Elmer Inc. (Estados Unidos da América). As membranas de policarbonato foram adquiridas da GE Whatman, (Estados Unidos da América). Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico.

4.2 Animais

Para a validação do método analítico de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite e para os estudos farmacocinéticos foram utilizados camundongos SWISS provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG – CEBIO. Os animais tinham idade entre 6 e 8 semanas e peso entre 25 e 30g. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG – CETEA-UFMG, conforme protocolo 115/2010.

4.3 Preparação e caracterização do antimoniato de meglumina

O antimoniato de meglumina foi sintetizado a partir de quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e de óxido de antimônio pentavalente, seguindo os seguintes passos: (i) hidrólise do SbCl_5 ; (ii) isolamento do pentóxido de antimônio hidratado; (iii) reação do pentóxido de antimônio hidratado com a N-metil-D-glucamina em água em pH neutro, mantido pela adição de hidróxido de potássio (KOH); (iv) isolamento do complexo de antimônio após a precipitação com acetona. Conforme descrito previamente (48). O composto obtido foi caracterizado pelo seu teor de antimônio por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (EAAFG), como descrito no item 4.4.5, e continha 29% de antimônio (Sb) por massa.

4.4 Preparação das formulações lipossomais de antimoniato de meglumina

4.4.1 Preparação de FATMLVs para os estudos farmacocinéticos

Lipossomas convencionais contendo antimoniato de meglumina compostos por DSPC/COL/DPPG, razão molar 5:4:1, e lipossomas furtivos compostos por DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG-2000, DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG-2000 e DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG-2000, razão molar 4,7:4:1:0,47 foram preparados de acordo com o procedimento de congelamento e descongelamento de vesículas multilamelares (FATMLV) seguido de extrusão, conforme descrito previamente (29, 24). Uma solução de clorofórmio com os lipídios foi preparada em balão de fundo redondo contendo esferas de vidro de 3 mm. As soluções foram mantidas sob vácuo e aquecimento por 90 minutos em evaporador rotativo para a completa evaporação do solvente orgânico. Ao filme lipídico formado foi acrescentada solução de antimoniato de meglumina a 40 mg de Sb/mL em um volume suficiente para produzir suspensão lipossomas com concentração final de lipídios igual a 55 g/L, então, o balão retornou ao evaporador rotativo por 60 minutos sem vácuo. A temperatura do banho foi ajustada conforme a temperatura de transição de fase dos fosfolipídios, sendo: 68 °C para as formulações contendo DCP, 60 °C para as formulações contendo DPPG ou ainda 55 °C para as formulações contendo DPPA. A suspensão de MLVs resultante foi submetida a 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho aquecido às temperaturas especificadas para cada formulação (29), em seguida foi extrusada (Lipex Biomembranes, Canada) em membrana de policarbonato de 200 nm por 5 vezes, sob temperatura (24). Após os ciclos de extrusão a preparação foi diluída 10 vezes (1:10) em tampão fosfato (0,15 mol/L NaCl, 0,01 mol/L fosfato, pH 7,2) e centrifugada a 19000 xg por 90 minutos. O pélete de lipossomas foi reconstituído para o volume inicial, diluído novamente e centrifugado uma segunda vez para eliminar o antimoniato de meglumina não encapsulado. O percentual de encapsulação dos lipossomas resultantes foi determinado por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite após digestão da amostra em ácido nítrico, conforme descrito no item 4.4.4. Seguindo o mesmo procedimento foram preparados lipossomas vazios compostos de DSPC/COL/DPPG, razão molar 5:4:1 e DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG-2000, razão molar 4,7:4:1:0,47. A hidratação do filme lipídico destas formulações foi realizada utilizando-se tampão PBS ao invés de antimoniato de meglumina.

4.4.2 Otimização do processo de encapsulação de antimoniais em lipossomas FDELS

Lipossomas convencionais formados por DSPC/COL/DCP, HSPC/COL/DCP e HSPC/COL/DPPG na razão molar 5:4:1, e lipossomas furtivos formados por DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG-2000, HSPC/COL/DCP/DSPE-PEG-2000 e DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG-2000 na razão molar 4,7:4:1:0,47 foram preparados de acordo com o procedimento de reidratação de vesículas vazias liofilizadas (FDEL) (30, 40). Primeiramente uma solução de clorofórmio com os lipídios foi preparada em balão de fundo redondo contendo esferas de vidro de 3 mm. As soluções foram mantidas sob vácuo e aquecimento por 90 minutos em evaporador rotativo para a completa evaporação do solvente orgânico. Ao filme lipídico formado foi acrescentada água deionizada em um volume suficiente para produzir suspensão lipossomal com concentração final de lipídios igual a 55 g/L, então, o balão retornou ao evaporador rotativo por 60 minutos sem vácuo. A temperatura do banho foi ajustada conforme a temperatura de transição de fase dos fosfolipídios, sendo 68 °C para a formulação contendo DCP ou 60 °C para as formulações contendo DPPG. A suspensão de MLVs resultante foi submetida a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho aquecido e em seguida extrusada (Lipex Biomembranes, Canada) em membrana de policarbonato de 200 nm por 5 vezes, sob temperatura controlada conforme descrito acima. A suspensão obtida após a extrusão foi diluída 3 vezes (1:3) em solução de sacarose a 165 g/L, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 24 horas, utilizando liofilizador Liotop 101 (Liobrás, Brasil). A reidratação das vesículas liofilizadas se deu pela adição de solução de antimoniato de meglumina a 40 mg de Sb/mL, em volume suficiente para obter concentração final de lipídios igual a 55 g/L, e manutenção da suspensão em banho-maria por 45 minutos com agitação de 1 minuto a cada 10 minutos de banho. A preparação foi, então, diluída 10 vezes (1:10) em tampão fosfato (0,15 mol/L NaCl, 0,01 mol/L fosfato, pH 7,2) e centrifugada a 19000 xg por 90 minutos. O pélete de lipossomas foi reconstituído para o volume inicial, diluído novamente e centrifugado uma segunda vez para eliminar o antimoniato de meglumina não encapsulado.

4.4.3 Preparação dos tecidos para a digestão ácida

Os baços e fígados provenientes dos estudos farmacocinéticos foram submetidos à análises de quantificação de antimônio por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite. Após serem retirados dos animais foram pesados e a eles foi acrescentado tampão fosfato em um volume correspondente a duas vezes o peso de cada órgão. Os órgãos foram macerados com o auxílio de maceradores de vidro compostos por tubo e pistilo e o produto resultante pipetado para proceder à digestão, conforme descrito no item 4.4.4. As amostras de sangue não necessitaram de qualquer preparação antes de serem digeridas.

4.4.4 Digestão ácida das amostras

A determinação da quantidade de antimônio em cada uma das amostras foi realizada após sua digestão em ácido nítrico concentrado, conforme descrito abaixo. Alíquotas de cada amostra foram pipetada e transferidas para tubos de ensaio próprios para digestão, a estas alíquotas foram acrescentados 2 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 , 65%, v/v). Tais tubos foram acondicionados em um bloco digestor (modelo MA 4004, Marconi, Brasil) e mantidos à 70 °C por 2 horas. Foram, então, retirados do bloco digestor e deixados à temperatura ambiente. Após resfriarem adicionou-se 400 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%, v/v) em cada tubo e retornou-se com eles para o bloco digestor deixando-os por mais 2 horas à 70 °C. Após serem retiradas do bloco digestor e resfriadas à temperatura ambiente as amostras foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos e o volume completado com ácido nítrico a 0,2%, v/v. Utilizou-se balões volumétricos de 10 mL para as amostras de lipossomas, sangue e fígado e de 5 mL para baço. Foram utilizadas alíquotas de 20 μL para lipossomas, 200 μL para sangue, 500 μL para fígado homogeneizado e 150 μL para baço homogeneizado (47).

4.4.5 Determinação de antimônio por EAAFG

A concentração de antimônio foi determinada em um espectrômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (HGA 600) e amostrador automático (AS 60), (modelo Analyst AA600, Perkin Elmer Inc., Estados Unidos da América), utilizando lâmpada de EDL para antimônio, que operou a 350 mA, tendo o argônio como gás de purga. O programa de temperatura utilizado esta descrito na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1 – Programa de temperatura utilizado para a determinação de antimônio por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite.

	Passo	Temperatura (°C)	Tempo de aquecimento (s)	Manutenção do aquecimento (s)	Fluxo interno de gás (mL/min)
1	Secagem	110	1	30	250
2	Secagem	130	15	30	250
3	Pirólise	1.300	10	30	250
4	Volatilização do analito	2.100	0	5	0
5	Limpeza	2.450	1	3	250

Demais condições de operação empregadas foram: comprimento de onda 217,6nm; solução de modificador contendo 120µL de nitrato de paládio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) e 72µL de nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) em 1mL de ácido nítrico a 0,2%, v/v. A determinação de antimônio em fígado e baço de camundongos foi previamente validada (49) e o limite de quantificação é de 0,93 µg Sb/g tecido para o fígado e o baço.

4.5 Validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para a determinação da concentração de antimônio em sangue de camundongos

Neste trabalho foram considerados os critérios para validação de métodos bioanalíticos utilizados na determinação quantitativa de fármacos e ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma e urina. O método bioanalítico validado foi a espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite para determinação de antimônio em sangue digerido de camundongos. Os parâmetros de validação utilizados foram: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e recuperação (50, 51).

4.5.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra, ainda que a matriz interfira no desempenho da medição aumentando ou reduzindo o sinal de detecção do analito. A determinação da especificidade é realizada através da comparação de duas curvas analíticas, com e sem matriz. Caso as curvas sejam coincidentes pode-se concluir que não há interferência da matriz sobre a determinação da substância

de interesse. Logo, o método é seletivo para o analito em questão (52). Havendo diferença na inclinação das curvas deve-se determinar se há diferença entre as variâncias e as médias das amostras, através do teste F e do teste t, respectivamente. A hipótese nula do teste F é: duas amostras possuem variâncias diferentes; já a do teste t é: duas amostras provenientes de duas populações que possuem a mesma média.

Para a determinação da especificidade foram construídas duas curvas analíticas cujas concentrações de antimônio variaram dentro do intervalo de 0µg/L a 200µg/L, correspondente à faixa de trabalho do equipamento utilizado. A primeira delas foi preparada pela adição de volumes crescentes de solução padrão de antimônio, 0,5 g/L, a uma solução de HNO₃, 0,2% v/v, gerando concentrações finais iguais a 0, 10, 40, 60, 100, 120, 180 e 200 µg/L. A segunda foi preparada pela adição de volumes crescentes de solução padrão de antimônio, 25mg/L, a 200 µL de sangue de camundongo antes de iniciar o processo de digestão descrito no item 4.4.4. Após a digestão as concentrações finais de antimônio obtidas para cada ponto da curva analítica foi 0, 10, 40, 60, 100, 120, 180 e 200 µg/L. Foram preparadas e analisadas 10 réplicas de cada ponto de cada uma das curvas. O teor de antimônio foi determinado em um espectrômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (HGA 600) e amostrador automático (AS 60), utilizando lâmpada de EDL para antimônio, modelo Analyst AA600, Perkin Elmer Inc., USA.

4.5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de trabalho. Pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A determinação da regressão linear, dos resíduos e do coeficiente de correlação linear foi utilizada para indicar a linearidade da curva obtida (51). Uma curva é considerada linear quando o coeficiente de correlação linear for maior que 0,98 (50). A determinação da linearidade utilizou a curva obtida para a análise da especificidade do método analítico, item 4.5.1.

4.5.3 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação é definido como a menor concentração do analito capaz de ser determinada com precisão e exatidão (50). Foi determinado através dos parâmetros da curva analítica utilizando a Equação 1, baseada na média das concentrações do branco do padrão na matriz, determinada através da leitura de 10 réplicas do branco do padrão na matriz.

Equação 1:

$$LIQ = \bar{X} + 10DP$$

Onde:

LIQ = limite inferior de quantificação.

\bar{X} = média dos valores dos brancos da amostra.

DP = desvio padrão.

4.5.4 Precisão

Representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea em idênticas condições de ensaio (50). A precisão foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação, conforme a Equação 2. Foram realizadas 10 medidas para cinco concentrações diferentes, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 100 µg/L e 160 µg/L correspondentes aos níveis baixo, médio, alto de concentração. Os valores máximos aceitáveis não devem ser superiores a 20% do valor da concentração teórica (50).

Equação 2:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo.

CMD = concentração média determinada.

4.5.5 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão do método foi determinada através dos parâmetros da curva analítica utilizando a Equação 3, baseada na média das concentrações obtidas para

cada ponto da curva, determinada através da leitura de 10 réplicas, conforme descrito no item 4.5.1. São considerados aceitáveis valores entre 85% e 115% da concentração teórica (50).

Equação 3:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CMD}}{\text{CT}} \times 100$$

Onde:

CMD = concentração média experimental.

CT = concentração teórica.

4.5.6 Recuperação

A recuperação é definida como a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. (50). É calculada segundo a Equação 4. Para as amostras analisadas são considerados aceitáveis valores entre 80 a 120% (53).

Equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{CMD} - \text{CT}}{\text{CT}} \times 100$$

Onde:

CMD = concentração média experimental.

CT = concentração teórica.

4.6 Caracterização das formulações

4.6.1 Diâmetro hidrodinâmico das vesículas e concentração de vesículas

A distribuição de tamanho médio dos lipossomas (diâmetro hidrodinâmico médio) e o índice de polidispersão foram determinados de pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), também conhecida por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando-se um analisador de partícula Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). A técnica DLS mede a intensidade da flutuação da luz espalhada por partículas em suspensão em uma amostra devido ao movimento browniano e o correlaciona com o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, através da aplicação da equação de Stokes-Einstein. Equação 5 (54).

Equação 5:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Onde:

D = constante de difusão.

k_B = constante de Boltzmann.

T = temperatura.

η = viscosidade.

r = raio da partícula.

As análises foram realizadas diluindo-se 10 μ L da suspensão de lipossomas em 2 mL de tampão fosfato utilizando equipamento com detector em um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. O diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas preparadas pelo método FATMLV e utilizadas no estudo farmacocinético foi medido também através da técnica *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), assim como a concentração das vesículas nestas formulações. A técnica NTA combina microscopia de espalhamento de luz com uma câmera de carga acoplada (CCD), que permite a visualização e a gravação de um filme com das nanopartículas em solução. O software NTA é capaz de identificar e rastrear nanopartículas individuais que se deslocam sob o movimento browniano e relacionar o movimento a um tamanho de partícula, através da equação de Stokes-Einstein (55). As amostras foram diluídas 4000 vezes em tampão fosfato (PBS: 0,15mol/L NaCl, 0,01mol/L fosfato, pH 7,2) e analisadas em triplicata a 25 °C por 60 segundos utilizando-se o equipamento NanoSight LM 14C (NanoSight, Reino Unido).

4.6.2 Percentual de encapsulação

Amostras de lipossomas foram coletadas antes e depois da centrifugação, digeridas em ácido nítrico concentrado, conforme descrito no item 4.4.4. A dosagem de Sb foi realizada por EAAFG como descrito no item 4.4.5. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 6, abaixo:

Equação 6:

$$PE = \frac{[Sb]DC}{[Sb]AC} \times 100$$

Onde:

PE = percentual de encapsulação.

[Sb] DC = concentração de Sb na formulação depois da centrifugação e lavagem.

[Sb] AC = concentração de Sb na formulação antes da centrifugação.

4.6.3 Capacidade de retenção do antimônio ao longo do tempo

Amostras dos lipossomas contendo antimoniato de meglumina preparados a partir do método FATMLV, compostos de DSPC/COL/DPPG (LCONV/Sb) e DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG (LPEG/Sb), foram incubadas em tampão fosfato a 4 °C e 37 °C, sob leve agitação utilizando agitador magnético por até 72 horas. Alíquotas destas amostras foram retiradas, centrifugadas e digeridas após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas e sua concentração de Sb foi determinada por EAAFG como descrito no item 4.4.5. A cinética de liberação do Sb dos lipossomas foi determinada após comparação dos valores obtidos nos tempos ensaiados com a concentração de antimônio no tempo zero (43, 46).

4.6.4 Doseamento de lipídios

A determinação colorimétrica de fosfolipídios contidos nas formulações preparadas a partir do método FATMLV foi realizada através do método de Stewart (56). Tal método baseia-se na formação de complexos entre o ferrotiocianato de amônio, composto inorgânico vermelho insolúvel em clorofórmio, e o grupo fosfato dos fosfolipídios, insolúveis em água. Quando uma solução de clorofórmio contendo fosfolipídios é vigorosamente misturada à solução aquosa de ferrotiocianato de amônio à temperatura ambiente forma-se um complexo colorido (λ_{max} 488 nm) livremente solúvel na fase orgânica. A densidade óptica (DO) da fase orgânica é, então, medida em espectrofotômetro podendo-se determinar massa de fosfolipídios na ordem de 0,01 a 0,1 mg. Este método apresenta a vantagem de não sofrer interferências de ácidos graxos livres ou de fosfatos inorgânicos. No entanto, não é aplicável a amostras de fosfatidilglicerol. Para amostras que contenham fosfatidilcolina associada ao fosfatidilglicerol em proporções conhecidas pode-se

usar o método de Stewart para dosar o primeiro e inferir a concentração total de fosfolípides.

A solução de ferrotiocianato de amônio foi preparada pela dissolução de 27,03 g de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 30,4 g tiocianato de amônio (NH_4SCN) em água deionizada na quantidade suficiente para obtenção de 1 litro. Preparou-se solução de fosfolípidos em clorofórmio na mesma concentração e razão molar dos lipossomas convencionais e furtivos, sendo: lipossomas convencionais (DSPC/CHOL/DPPG) razão molar 5:4:1, 55 g/L e lipossomas furtivos (DSCP/CHOL/DPPG/DSPE-PEG) razão molar 4,7:4:1:0,47, 55 g/L. A solução inicial foi diluída para se obter concentração igual a 0,1 mg/mL de DSPC, com a qual foi construída a curva de calibração conforme descrito a seguir. Em tubos para centrifugação, foram pipetados em duplicata volumes entre 0,1 e 1,0 mL da solução a 0,1 mg/mL de DSPC aos quais foram adicionados 2 mL de solução de ferrotiocianato e, então, o volume final de clorofórmio foi corrigido para 2 mL. O sistema bifásico foi vigorosamente agitado por 1 minuto e em seguida centrifugado à 100 xg por 5 minutos. A fase superior foi descartada com o auxílio de pipeta Pasteur e a densidade ótica da fase orgânica lida em espectrofotômetro Genesys 10UV (Thermo Fisher, Estados Unidos da América) utilizando comprimento de onda de 485 nm e cubeta de caminho óptico de 1 cm. Com a média das densidades óticas obtidas construiu-se uma curva de calibração para os lipossomas convencionais e outra para os lipossomas furtivos.

A partir das amostras de lipossomas convencionais e furtivos foram preparadas soluções contendo 0,1 mg/mL de DSPC em clorofórmio. Destas soluções 0,6 mL foram pipetados em duplicata aos quais foram acrescentados 2,0 mL de ferrotiocianato de amônio e o volume final de clorofórmio acertado para 2,0 mL, as misturas foram agitadas vigorosamente por 1 minuto e em seguida centrifugadas por 5 minutos a 100 xg, conforme descrito acima para a curva de calibração. A leitura resultante foi utilizada para a determinação da concentração do fosfolípido a partir da curva de calibração construída anteriormente.

4.7 Estudos farmacocinéticos

Os estudos farmacocinéticos foram conduzidos em duas etapas. Na primeira, foi avaliada a influência da substituição do lipídio DCP por DPPG e DPPA sobre a farmacocinética dos lipossomas em camundongos saudáveis. Na segunda, foi avaliado o comportamento farmacocinético de misturas de lipossomas convencionais e furtivos também em camundongos saudáveis. As formulações foram administradas por via endovenosa através da veia caudal.

4.7.1 Substituição do DCP: influência do fosfolipídio carregado negativamente na farmacocinética dos lipossomas furtivos.

Sessenta e três camundongos, pesando em média 28 gramas, foram aleatoriamente divididos em três grupos de 21 animais, cada um dos grupos recebeu uma das formulações de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas compostos de:

- 1) DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG, denominada DCP-PEG;
- 2) DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG, denominada DPPA-PEG;
- 3) DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG, denominada DPPG-PEG.

Cada um destes grupos foi novamente dividido em três subgrupos de sete animais que foram sacrificados, por deslocamento cervical, nos intervalos de tempo de 1 minuto, 1 hora e 24 horas após a administração das formulações. Todos os animais foram anestesiados com mistura de xilasina 2% e quetamina 10% na proporção de 1,5 mL de xilasina para 2 mL de quetamina, na dose de 10 µL/10 g de peso corporal, sendo que aqueles pertencentes aos subgrupos de 1 minuto foram anestesiados 15 minutos antes da administração das formulações e os demais 15 minutos antes do sacrifício. A dose teórica de lipídios foi de 117,9 mg/kg de peso corporal, contida em 60 µL de suspensão. O sangue dos animais anestesiados foi coletado através da secção da artéria braquial e, com o auxílio de pipeta heparinizada, transferido para tubos estéreis. Baço e fígado foram retirados e também transferidos para tubos estéreis. Sangue, fígado e baço retirados foram preparados para quantificação de antimônio por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite conforme descrito nos itens 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.

4.7.2 Estudo farmacocinético de lipossomas convencionais e furtivos e da sua mistura.

Para a segunda etapa da farmacocinética foram preparadas as seguintes formulações:

- 1) Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais compostos por DSPC/COL/DPPG, denominada LCONV/Sb;
- 2) Lipossomas convencionais vazios compostos de DSPC/COL/DPPG, denominada LCONV/Vz;
- 3) Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas furtivos compostos por DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG, denominada LPEG/Sb;
- 4) Lipossomas furtivos vazios compostos de DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG, denominada LPEG/Vz.

Os camundongos utilizados foram divididos em 4 grupos diferentes com 36 animais em cada grupo. Cada um dos grupos recebeu um das seguintes formulações:

- 1) LCONV/Sb;
- 2) LCONV/Sb+LPEG/Vz;
- 3) LPEG/Sb;
- 4) LCONV/Vz+LPEG/Sb.

As formulações compostas por misturas de lipossomas, formulações 2 e 4, foram preparadas a partir das formulações convencionais e furtivas na proporção de 1:1 (v/v). Para a administração as formulações foram diluídas em tampão e a dose de lipídio administrada foi de 78,6 mg/kg de peso corporal, contida em 60 µL.

Cada um dos 4 grupos iniciais foi novamente dividido em nove subgrupos de quatro animais, que foram sacrificados, por deslocamento cervical, nos intervalos de tempo de 1, 15 e 30 minutos, 1, 3, 6 12, 24 e 48 horas após a administração das formulações. Todos os animais foram anestesiados com mistura de xilasina 2% e quetamina 10% na proporção de 1,5 mL de xilasina para 2 mL de quetamina, na dose de 10 µL/10 g de peso corporal, sendo aqueles pertencentes aos subgrupos de 1 minuto foram anestesiados 15 minutos antes da administração das formulações e os demais 15 minutos antes do sacrifício. O sangue dos animais anestesiados foi coletado através da secção da artéria braquial e, com o auxílio de pipeta

heparinizada, transferido para tubos estéreis. Baço e fígado foram retirados e também transferidos para tubos estéreis. Sangue, fígado e baço retirados foram preparados para quantificação de antimônio por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite conforme descrito nos itens 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.

4.8 Análises Estatísticas

Para a comparação dos resultados da caracterização dos lipossomas foram utilizados os testes *t*, *One-way ANOVA* ou *Two-way ANOVA* (dados com distribuição normal). Para dados que não apresentaram distribuição normal foram utilizados os testes *Kruskal-Wallis*. O nível de significância foi de $P < 0,05$. Para a validação do método analítico os resultados foram analisados utilizando-se os testes *t* e *F*. Os resultados dos estudos farmacocinéticos foram analisados utilizando-se o teste *Two-way ANOVA* e teste de Bonferroni como pós-teste para comparação entre as curvas e o teste *t* (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico) para comparação das médias entre os diferentes grupos. O nível de significância foi de $P < 0,05$. O programa de análise estatística utilizado foi GraphPad Prism® 5.

5 Resultados e Discussão

5.1 Estudos farmacocinéticos de mistura de lipossomas convencionais e furtivos

Diante da influência da dose de lipídios administrada sobre a biodistribuição dos lipossomas, nos estudos farmacocinéticos descritos neste trabalho os animais receberam doses iguais de lipídios e estas foram inferiores àquela descrita como sendo necessária para a saturação do fígado de camundongos (27). Para acompanhar a farmacocinética e a distribuição dos lipossomas *in vivo* a escolha do marcador é crucial. Um marcador ideal deve ter uma taxa mínima de vazamento ou dissociação dos lipossomas, resistir à degradação e ao metabolismo, ser rapidamente depurado do organismo após sua liberação dos lipossomas e ser facilmente dosado em amostras de sangue e tecido (28). O antimônio, na forma de antimoniato de meglumina, cumpre todos os requisitos necessários para ser utilizado como o marcador dos lipossomas nos estudos farmacocinéticos propostos nesta dissertação e apresenta a vantagem de ser sintetizado e caracterizado rotineiramente pelo *Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos Leishmanicidas, ICEX-UFMG*.

Após a validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para a determinação de antimônio em sangue digerido de camundongos, os estudos farmacocinéticos foram conduzidos em duas etapas. A primeira avaliou a interferência da troca do lipídio carregado negativamente (DCP) na farmacocinética de lipossomas furtivos em camundongos sadios. A vantagem agregada à utilização de DPPA ou DPPG no lugar de DCP está no fato destes fosfolipídios serem biocompatíveis e encontrados comercialmente em grau farmacêutico. A segunda comparou as propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição dos lipossomas convencionais e dos lipossomas furtivos quando administrados isoladamente e na forma de mistura.

5.1.1 Validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para a determinação da concentração de antimônio em sangue de camundongos

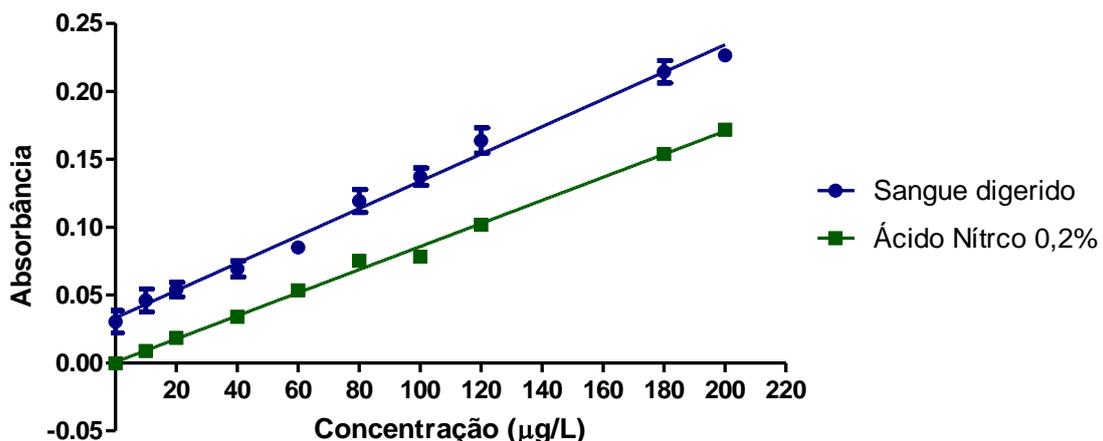
A validação de um método analítico pode ser definida como a confirmação por ensaios e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para

o uso deste método são atendidos (51). Seu objetivo é mostrar que tal método é apropriado para a finalidade pretendida e assegurar a confiabilidade dos resultados. A utilização de um determinado método analítico deve ser precedida da sua validação. Seguindo as normas de validação publicadas pela Anvisa (50) e INMETRO (51) os parâmetros analisados foram especificidade, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

5.1.1.1 Especificidade

As curvas analíticas obtidas para antimônio diluído em ácido nítrico e sangue digerido (matriz) apresentaram inclinações iguais a $0,001006 \pm 0,000034$ e $0,000850 \pm 0,000006$, respectivamente. Sendo, portanto, diferentes entre si ($P < 0,0001$, teste F). A variância entre as amostras não foi estatisticamente significativa ($P = 0,6580$, teste F) mostrando que a matriz não altera a precisão do método na faixa de concentração avaliada. No entanto os dois grupos possuem as médias das concentrações diferentes, indicando que a presença da matriz tem efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio ($P = 0,5867$, teste t), conforme evidenciado pela inclinação. Há interferência da matriz, no entanto a precisão se mantém garantindo a especificidade do método. A Figura 6 apresenta as curvas analíticas obtidas para cada um dos grupos.

Figura 6 - Curva da absorbância em função da concentração de antimônio.

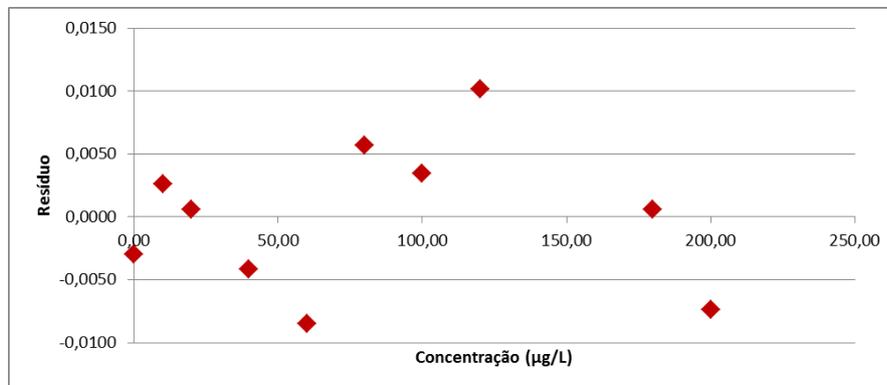


Curva da absorbância em função da concentração de antimônio obtida para dois grupos, sendo um com sangue digerido (matriz biológica) e outro em ácido nítrico (HNO_3 0,2%, sem a presença da matriz). As curvas apresentam inclinações diferentes, ($P < 0,0001$, teste F), médias diferentes ($P = 0,5867$, teste t) e variâncias semelhantes ($P = 0,6580$, teste F). São apresentadas as médias \pm desvio padrão ($n = 10$).

5.1.1.2 Linearidade

A linearidade da curva analítica da concentração de antimônio em sangue digerido de camundongo foi comprovada através do cálculo do coeficiente de correlação linear, r , que apresentou valor igual a 0,9964 ($>0,98$) e confirmada através do gráfico de resíduos, Figura 7, no qual a dispersão aleatória dos pontos indica linearidade (51, 57). O resíduo é a diferença entre o valor da absorbância obtida pelo equipamento e a absorbância calculada a partir da equação de regressão, que seria o valor teórico, dada a linearidade da curva de calibração.

Figura 7 – Gráfico de resíduos para a determinação da linearidade.



O resíduo é a diferença entre o valor da absorbância obtida pelo equipamento e a absorbância calculada a partir da equação de regressão. A dispersão aleatória dos pontos em relação ao eixo x indica linearidade da curva.

5.1.1.3 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação calculado foi de 3,0µg/L de acordo com a Equação 1. O valor calculado correspondente a 151,5 µg de Sb/L de sangue, considerando as diluições empregadas durante a digestão da amostra.

Equação 1:

$$LIQ = \bar{X} + 10DP$$

Onde:

LIQ = limite inferior de quantificação.

\bar{X} = média dos valores dos brancos da amostra, Tabela 2.

DP = desvio padrão, Tabela 2.

5.1.1.4 Precisão

O método mostrou-se preciso para concentrações iguais ou maiores que 20µg de Sb/L. Valor obtido a partir do desvio padrão relativo, calculado pela Equação 2.

Equação 2:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo.

CMD = concentração média determinada

5.1.1.5 Exatidão

A exatidão do método foi calculada pela Equação 3 e o método analítico mostrou-se exato na faixa de concentração avaliada, apresentado desvios de, no máximo, 14% em relação à concentração teórica. Sendo 15% a variação máxima aceita (50), conforme apresentado na Tabela 2.

Equação 3:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CMD}}{\text{CT}} \times 100$$

Onde:

CMD = concentração média experimental.

CT = concentração teórica.

5.1.1.6 Recuperação

O percentual de recuperação apresentado pelo método, calculado a partir da Equação 4 foi de, pelo menos, 87% em relação à concentração teórica, dentro do preconizado que é de 80 a 120% (52). Conforme apresentado na Tabela 2.

Equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{CMD} - \text{CT}}{\text{CT}} \times 100$$

Onde:

CMD = concentração média experimental.

CT = concentração teórica.

Tabela 2 – Validação da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite como método analítico para determinação de antimônio em sangue de camundongo.

Concentração teórica (µg/L)	Concentração média determinada (µg/L)	Desvio Padrão	Limite inferior de quantificação (µg/L)	Desvio Padrão Relativo	Precisão (%)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
0	-0,70	0,33	3,30	-	-	-	-
10	8,97	2,02		0,23	22,50	89,71	-10,29
20	22,51	0,69		0,03	3,10	112,55	12,55
40	41,54	0,65		-0,02	-1,60	103,85	3,85
100	93,57	0,73		0,01	0,80	93,57	-6,43
160	138,39	1,26		0,01	0,90	86,49	-13,51

Parâmetros: limite inferior de quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

O processo de validação foi aplicado para a espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite para a determinação da concentração de antimônio em sangue digerido de camundongos. Com os experimentos realizados foi determinado que o método é específico para o antimônio desde que a curva de calibração seja preparada utilizando a matriz biológica, sangue digerido de camundongo. A curva de calibração é linear entre as concentrações de 20 e 180 µg de Sb/L. O método foi considerado preciso para concentrações acima de 20 µg de Sb/L e exato entre 10 µg de Sb/L e 200 µg de Sb/L. A recuperação observada foi satisfatória, estando entre 87% e 112% quando o a faixa preconizada na literatura vai de 80% a 120% (51). Por definição, o limite inferior de quantificação é a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis (50). O limite inferior de quantificação obtido foi 3,0 µg de Sb/L, equivalente a 151,5µg de Sb/L de sangue. No entanto, o método é exato em concentrações acima de 10 µg de Sb/L e preciso em concentrações acima de 20 µg de Sb/L. Desta forma, deve-se considerar o limite inferior de quantificação como sendo de 20 µg de Sb/L, correspondente a 1mg de Sb/L de sangue. Portanto, o método foi validado e a faixa de trabalho está situada entre as concentrações de 20 µg de Sb/L a 180 µg de Sb/L.

5.1.2 Substituição do DCP: influência do fosfolípido carregado negativamente na farmacocinética dos lipossomas furtivos

Visando substituir o lipídio DCP na formulação do antimoniato de meglumina, investigou-se neste primeiro momento a influencia desta substituição na farmacocinética do antimônio em camundongos, sendo a preocupação não interferir nas propriedades de circulação prolongada dos lipossomas furtivos. Foram comparadas formulações lipossomais furtivas contendo antimoniato de meglumina compostas por:

- 1) DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG (DCP-PEG);
- 2) DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG (DPPA-PEG);
- 3) DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG (DPPG-PEG).

A tabela 3 apresenta os diâmetros hidrodinâmicos médios, índices de polidispersão e taxa de encapsulação obtidos por espalhamento dinâmico da luz – DLS e espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite - EAAFG. Os diferentes tipos de lipossomas utilizados apresentaram diâmetros médios próximos a 200 nm e índices de polidispersão inferiores a 0,1 caracterizando uma população de vesículas de tamanho homogêneo, ou seja, monodispersa. A taxa de encapsulação foi menor para as formulações contendo DPPA e DPPG (11%) que para a formulação contendo DCP (14%).

Tabela 3 – Características das formulações de lipossomas furtivos contendo antimoniato de meglumina quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e taxa de encapsulação.

Formulação	Diâmetro Médio * (nm)	Índice de Polidispersão *	Taxa de Encapsulação (%Sb)	n
DSPC/CHOL/DCP/DSPE-PEG (DCP-PEG)	158	0,050	14	1
DSPC/CHOL/DPPA/DSPE-PEG (DPPA-PEG)	140	0,077	11	1
DSPC/CHOL/DPPG/DSPE-PEG (DPPG-PEG)	166	0,065	11	1

*Determinados pela técnica de DLS.

A dose de lipídio administrada foi de 92,6 mg/kg de peso corporal para os três grupos, DCP-PEG, DPPA-PEG e DPPG-PEG. Em função da taxa de encapsulação, a dose de Sb administrada foi diferente entre os grupos DCP-PEG (8,3 mg/mL) DPPA-PEG (5,6 mg/mL) e DPPG-PEG (7,6 mg/mL), como mostrado na Tabela 4.

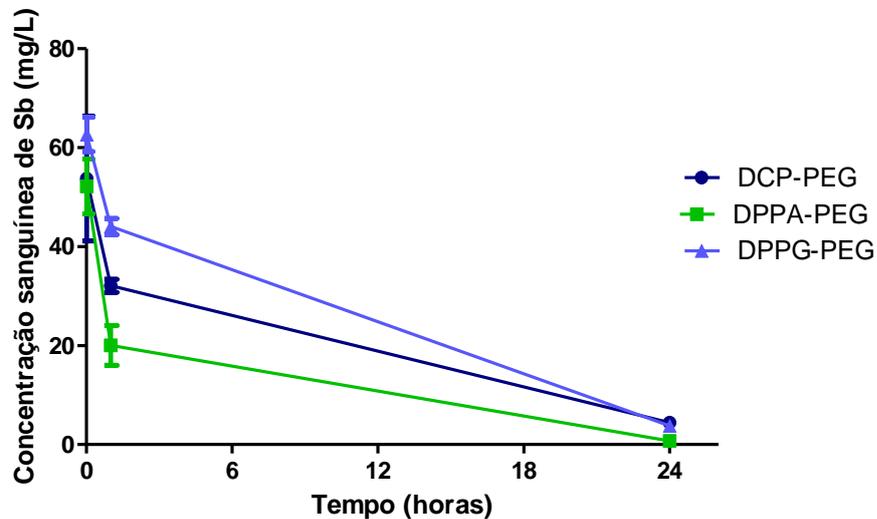
Tabela 4 – Concentração, massa e dose de Sb e relação entre Sb e lipídio das formulações lipossomais utilizadas na segunda etapa do estudo farmacocinético.

Formulação	Concentração de Sb (mg/mL)	Massa de Sb administrada (mg)	Dose de antimônio administrada (mg de antimônio/kg de peso corporal)	Relação entre concentrações	
				Sb/Lipídio	Lipídio/Sb
DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG (DCP-PEG)	3,9	0,23	8,3	0,09	11,22
DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG (DPPA-PEG)	2,6	0,16	5,6	0,06	16,49
DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG (DPPG-PEG)	3,5	0,21	7,6	0,08	12,21

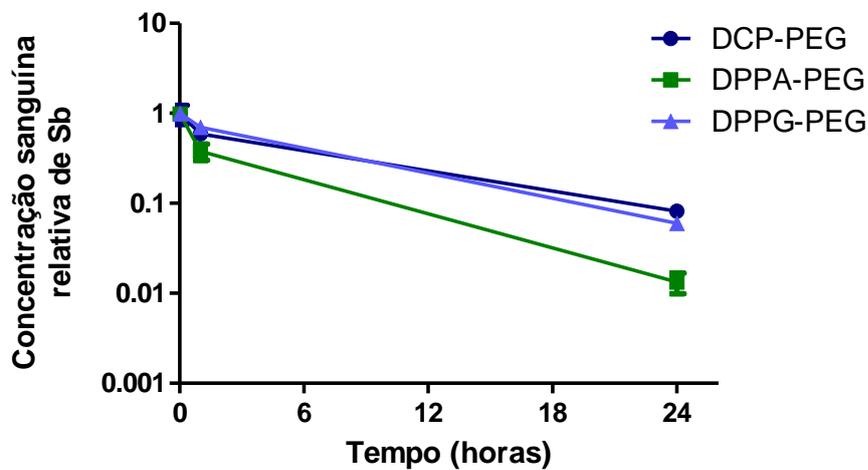
A Figura 8A mostra a farmacocinética do antimônio no sangue após a administração das três diferentes formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina, DCP-PEG, DPPA-PEG e DPPG-PEG. No estudo farmacocinético, camundongos SWISS receberam por via endovenosa uma das três formulações e o sangue foi coletado nos tempos determinados, 1 minuto, 1 e 24 horas para a dosagem de antimônio por EAAFG. Para tornar os resultados comparáveis, as concentrações de Sb obtidas foram normalizadas em função da concentração máxima determinada para cada formulação utilizando o programa R-STRIP[®] 4.3, uma vez que a concentração de Sb foi diferente para cada formulação em consequência das diferentes taxas de encapsulação, Figura 8B. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os perfis farmacocinéticos das formulações DPPA-PEG e DPPG-PEG ($P=0,0246$, two way ANOVA). No tempo de 60 minutos, a concentração sanguínea de antimônio da formulação DPPG-PEG foi significativamente mais elevada que a da formulação DPPA-PEG ($P=0,0033$, teste t) e que a da formulação DCP-PEG ($P=0,0135$, teste t). No tempo 24 horas, a concentração de antimônio da formulação DPPG-PEG foi significativamente maior que a da formulação DPPA-PEG ($P=0,0010$, teste t).

Figura 8 - Farmacocinética do antimônio no sangue de camundongos SWISS.

A



B



Farmacocinética do antimônio no sangue de camundongos SWISS após administração endovenosa de diferentes formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina (A). Representação das concentrações relativas de antimônio em escala semilogarítmica após normalização função da concentração máxima, determinada pelo programa RSTRIP® 4.3 (B). Cada grupo recebeu uma das seguintes formulações DCP-PEG, DPPA-PEG ou DPPG-PEG. O sangue foi coletado e o antimônio determinado por EAAFG. Há diferença estatisticamente significativa entre os perfis farmacocinéticos das formulações DPPA-PEG e DPPG-PEG ($P=0,0246$, two way ANOVA). São apresentadas as médias \pm erro padrão, ($n=5 - 7$).

A Tabela 5 apresenta os valores de área sob a curva e tempo médio de residência, de acordo com o programa R-STRIP[®] 4.3. O tempo médio de residência para a formulação DPPG-PEG foi 1,5 vezes maior que aquele observado para a formulação DCP-PEG e 2,7 vezes maior que o observado para a formulação DPPA-PEG. A formulação DCP-PEG apresentou tempo médio de residência 1,9 vezes maior que a formulação DPPA-PEG. A área sob a curva da formulação DPPG-PEG foi 1,7 vezes maior que a da formulação DCP-PEG e 3,2 vezes maior que a da formulação DPPA-PEG. Os dados foram analisados utilizando o programa R-STRIP[®] 4.3, que seleciona o modelo de eliminação de acordo com os critérios de Akaike (58), e este indicou que o modelo que melhor se ajustou a este experimento foi o mono exponencial.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos de antimônio no sangue de camundongos SWISS após injeção intravenosa de diferentes formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina.

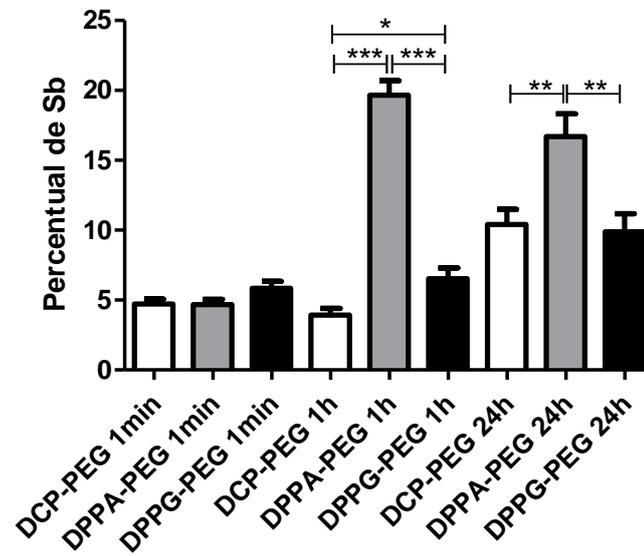
Formulações	AUC_{0-∞} (g min/L)	MRT_{0-∞} (min)
DCP-PEG	6,2	114,4
DPPA-PEG	3,3	61,7
DPPG-PEG	10,6	167,9

Os camundongos receberam dose única por via endovenosa de lipossomas contendo antimoniato de meglumina. Parâmetros farmacocinéticos de acordo com modelo monoexponencial: AUC_{0-∞}, área sob a “curva concentração sanguínea x tempo” projetada para o infinito; MRT_{0-∞}, tempo médio de residência projetado para o infinito.

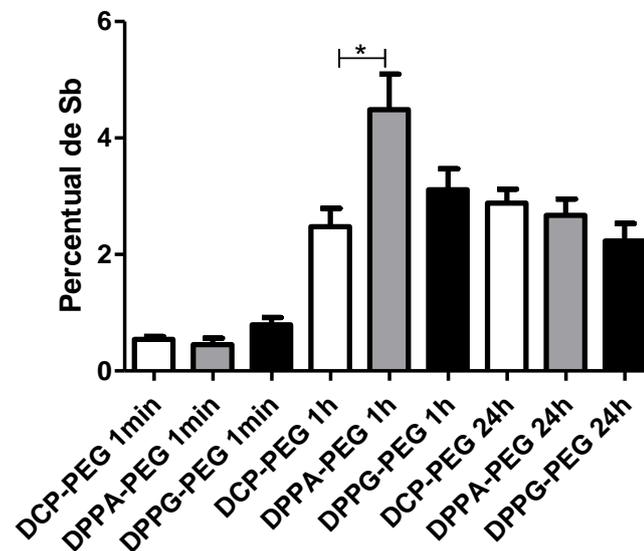
A proporção do antimônio direcionado para o fígado e baço foi determinada pela relação percentual entre a massa de antimônio administrada e a massa de antimônio determinada no órgão por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite. A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para o fígado e baço.

Figura 9 - Percentual de antimônio encontrado no fígado e baço de camundongos SWISS.

A



B



Percentual de antimônio encontrado no fígado (A) e baço (B) de camundongos SWISS após administração endovenosa das formulações lipossomais DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG (DCP-PEG), DSPC/COL/DPPA/DSPE-PEG (DPPA-PEG) ou DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG (DPPG-PEG) contendo antimoniato de meglumina. Relação percentual entre a massa determinada e a massa administrada. Dose de lipídio administrada foi de 92,6 mg/kg de massa corporal para todas as formulações. Dose de antimônio administrada foi de 8,3 mg/kg de massa corporal para DCP-PEG, de 5,6 mg/kg de massa corporal para DPPA-PEG e de 7,6 mg/kg de massa corporal para DPPG-PEG (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, teste t).. São apresentadas as médias +/- erro padrão. (n=7).

A partir dos resultados obtidos para o fígado, em 1 e 24 horas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as quantidades de antimônio recuperadas no órgão a partir das três formulações, (One-way ANOVA $P < 0,0001$ e $P = 0,0035$, respectivamente). Sendo a recuperação de antimônio observada para a formulação DPPA-PEG, em 1 hora, significativamente maior que aquelas das formulações DCP-PEG e DPPG-PEG (teste t, $P < 0,001$). Neste mesmo tempo, a recuperação de antimônio a partir da formulação de DCP foi maior que a da formulação DPPG-PEG (teste t, $P < 0,05$). Em 24 horas, a recuperação de antimônio observada para a formulação DPPA-PEG permaneceu significativamente maior que aquelas observadas para DCP-PEG e DPPG-PEG (teste t, $P < 0,001$).

A partir dos resultados obtidos para o baço, no tempo de 1 hora, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de antimônio recuperadas a partir das três formulações (One-way ANOVA $P < 0,0160$). Em 1 hora, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as formulações DCP e DPPA-PEG, sendo maior aquela promovida por DPPA-PEG (teste t, $P < 0,05$).

A avaliação da afinidade dos lipossomas por um determinado órgão pode ser determinada pela relação entre a área sob a curva gerada para o sangue e a área sob a curva gerada para o órgão (32). A Tabela 6, abaixo, apresenta os valores obtidos para o coeficiente de partição de antimônio no fígado e no baço a partir dos valores de gerados pelo programa GraphPad Prism[®] 5. Os valores abaixo estão de acordo com aqueles referentes ao direcionamento percentual do antimônio para os órgãos apresentados acima.

Tabela 6 – Afinidade da formulação pelo baço e fígado calculada a partir da relação entre as áreas sob a curva do sangue e dos órgãos.

Formulação	AUC ^a sangue (mg min/L)	AUC ^a baço (µg min/g)	AUC ^a fígado (µg min/g)	Coeficiente de partição ^b baço	Coeficiente de partição ^b fígado
DCP-PEG	27.734	86.964	17.792	3,1	0,6
DPPA-PEG	16.449	94.970	34.432	5,8	2,1
DPPG-PEG	36.151	75.462	18.686	2,1	0,5

^a Geradas pelo programa GraphPad Prism[®] 5. ^b Coeficiente de partição = AUC órgão/AUC sangue.

Observa-se que a formulação DCP-PEG é 5 vezes mais afim ao baço que ao fígado, DPPG-PEG tem afinidade 4 vezes maior pelo baço que pelo fígado, enquanto DPPA-PEG que é apenas 2,7 vezes mais afim ao baço.

Os resultados obtidos mostram que a formulação contendo DPPA apresenta tempo médio de residência na circulação menor que as demais, o que pode ser explicado pela maior taxa de captação pelo fígado e pelo baço promovido por esta formulação. A relação entre a carga superficial dos lipossomas e o tempo de circulação sanguínea é mais complexa e abrangente que a relação usual de que cargas negativas aumentam a captação dos lipossomas por células fagocitárias. Cada formulação deve ser analisada separadamente em função de seu tamanho, fluidez da membrana e densidade da carga superficial. Para lipossomas de composição semelhante, como os estudados aqui, onde o tamanho e a razão molar, inclusive do lipídio carregado negativamente, são iguais para as três formulações, o fato de o DPPA apresentar duas cargas negativas (32), ao contrário do DCP e do DPPG com única carga negativa, poderia explicar a maior captação tecidual e o menor tempo médio de residência dos lipossomas de DPPA. A elevada temperatura de transição de fase do DPPA (67 °C) pode ainda contribuir para a formação de membranas mais rígidas e de vesículas mais estáveis que aquelas contendo DPPG, o que poderia resultar na maior captação de Sb pelo fígado. Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes no direcionamento do antimônio para o baço entre as formulações contendo DCP ou DPPG. Os resultados obtidos neste estudo farmacocinético permitiram, portanto, concluir que o lipídio DPPG é mais apropriado para substituir o DCP na formulação original.

5.1.3 Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição de lipossomas convencionais e furtivos e da sua mistura

Nesta segunda etapa, foram investigados os perfis farmacocinéticos de lipossomas furtivos e convencionais no sangue, baço e fígado de camundongos, quando administrados isoladamente e na forma de mistura em proporção equimolar de lipídios. Como estratégia adotada para acompanhar o destino individual de cada tipo de lipossomas, o antimoniato de meglumina foi usado como marcador dos lipossomas e, para isto, foi encapsulado seja nos lipossomas furtivos ou nos lipossomas convencionais. Desta forma, os estudos farmacocinéticos foram realizados com as seguintes formulações:

- 1) DSPC/COL/DPPG com antimoníato de meglumina (LCONV/Sb);
- 2) DSPC/COL/DPPG com antimoníato de meglumina, associado com DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG sem antimoníato de meglumina (LCONV/Sb+LPEG/Vz);
- 3) DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG com antimoníato de meglumina (LPEG/Sb);
- 4) DSPC/COL/DPPG sem antimoníato de meglumina, associado com DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG com antimoníato de meglumina (LCONV/Vz+LPEG/Sb).

5.1.3.1 Caracterização das formulações de lipossomas convencionais e furtivos

Antes de iniciar os estudos farmacocinéticos, as diferentes formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho e taxa de encapsulação do antimonial e foi verificada a elevada taxa de retenção do marcador encapsulado. A Tabela 7 apresenta os diâmetros hidrodinâmicos médios, índices de polidispersão, concentração das vesículas nas formulações e taxa de encapsulação.

Tabela 7 – Características das formulações de lipossomas convencionais e furtivos vazios ou contendo antimoníato de meglumina, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e taxa de encapsulação do antimonial.

Formulação	DLS			NTA			EAAF	
	Diâmetro Médio +/-DP (nm)	Índice de Polidispersão	n	Diâmetro Hidrodinâmico Médio +/- DP (nm)	Concentração das vesículas +/- DP (número de vesículas x 10 ⁸ /mL)	n	Taxa de Encapsulação +/- DP (%Sb)	n
LCONV/Sb	156 +/-8	0,0703 +/- 0,0251	3	190 +/- 48	3,70 +/- 0,61	3	15 +/- 1	3
LCONV/Vz	177 +/- 12	0,0560 +/- 0,0317	3	207 +/-40	3,25 +/- 0,81	3	-	-
LPEG/Sb	166 +/- 9	0,0356 +/- 0,0266	5	196 +/-46	3,1 +/- 0,62	5	10 +/- 1	4
LPEG/Vz	156 +/- 14	0,0703 +/- 0,0184	3	191 +/- 41	2,54 +/- 0,81	3	-	-

DLS: espalhamento dinâmico a luz; NTA: análise por rastreamento de nanopartícula; EAAF: espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite; DP: desvio padrão.

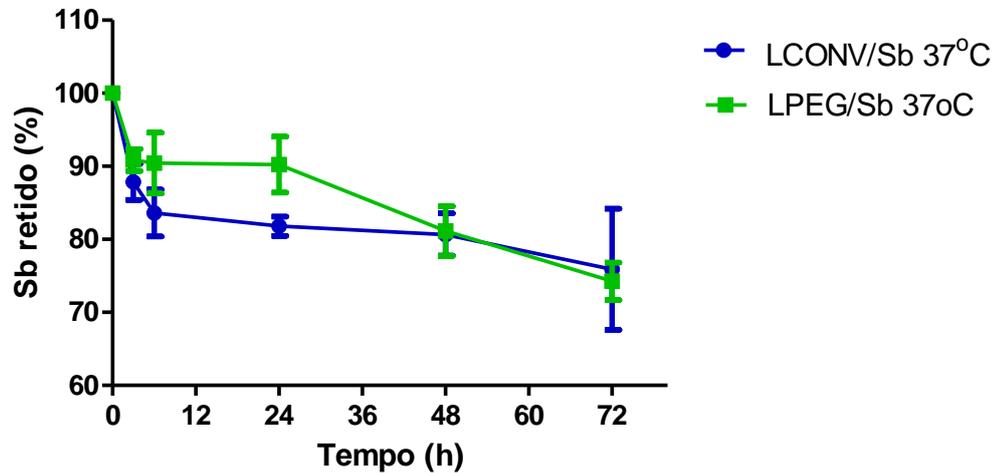
Não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros médios das diferentes formulações analisadas, assim como não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos pelas técnicas de DLS e NTA. A concentração de vesículas encontrada nas duas formulações foi igual. As dispersões apresentaram índices de polidispersão inferiores a 0,1, caracterizando as populações de vesículas

como monodispersa. A taxa de encapsulação foi de 15% para a formulação convencional e 11% para a formulação furtiva.

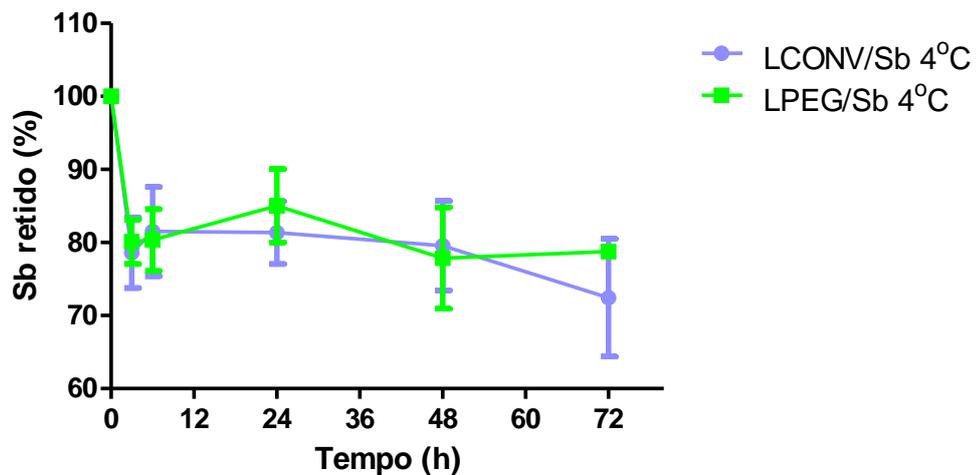
Os lipossomas convencionais (LCONV/Sb) e furtivos (LPEG/Sb) utilizados neste estudo foram submetidos a um teste de liberação para avaliar sua capacidade de retenção do antimônio ao longo do tempo. Como mostrado na Figura 10 a taxa de retenção do antimoniato de meglumina pelos lipossomas após 3 horas de incubação a 37 °C foi de 88% +/- 4, e 91% +/- 3 para os lipossomas convencionais e furtivos, respectivamente. Após 24 horas de incubação a retenção se manteve estável, apresentando valores de 82% +/- 2 para LCONV/Sb e 90% +/- 6 para LPEG/Sb. Ao final de 48 horas de incubação o percentual de retenção das duas formulações era de 81%. Alíquotas dos mesmos lipossomas foram incubados a 4 °C, também sob leve agitação mecânica e apresentaram cinéticas de liberação semelhantes àqueles incubados à 37 °C. Não houve diferença significativa entre a capacidade de retenção de Sb das formulações convencionais e furtivas quando incubadas a 4 °C ou a 37 °C.

Figura 10 – Cinética de liberação do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas FATMLV convencionais e furtivos.

A



B



Cinética de liberação do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas FATMLV convencionais (A) e furtivos (B) preparados a partir de DSPC/COL/DPPG e DSPC/COL/DPPG/DESP-PEG, incubados em PBS a 4 °C e 37 °C sob leve agitação mecânica. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos. São apresentadas as médias +/- erro padrão (n=3).

As taxas de encapsulação e de retenção do antimoniato de meglumina nos lipossomas furtivos e convencionais são compatíveis com o uso deste antimônio como marcador dessas vesículas, uma vez que apresentaram liberação significativa, porém pequenas, apenas nas primeiras três horas de incubação, o que foi equivalente nos lipossomas convencionais e furtivos.

O doseamento dos fosfolipídios contidos nos lipossomas (56) demonstrou que a concentração total de lipídios em todas as formulações correspondeu a aproximadamente 70% da concentração teórica. Esta diferença pode ser explicada pela perda em uma ou mais etapas do preparo dos lipossomas, por exemplo, pesagem, hidratação do filme e/ou extrusão. Portanto, a dose de lipídio administrada foi inferior àquela necessária para a saturação das células do fígado, que é de 120mg de lipídio/kg de peso (27).

5.1.3.2 Estudos farmacocinéticos dos lipossomas convencionais e furtivos na forma de mistura

As formulações LCONV/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz, LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb foram administradas em camundongos SWISS por via endovenosa em dose única correspondendo a 52,6 mg de lipídio/kg de peso corporal. A Tabela 8 mostra a dose de antimônio administrada para cada formulação, bem como as respectivas relações antimônio/lipídios.

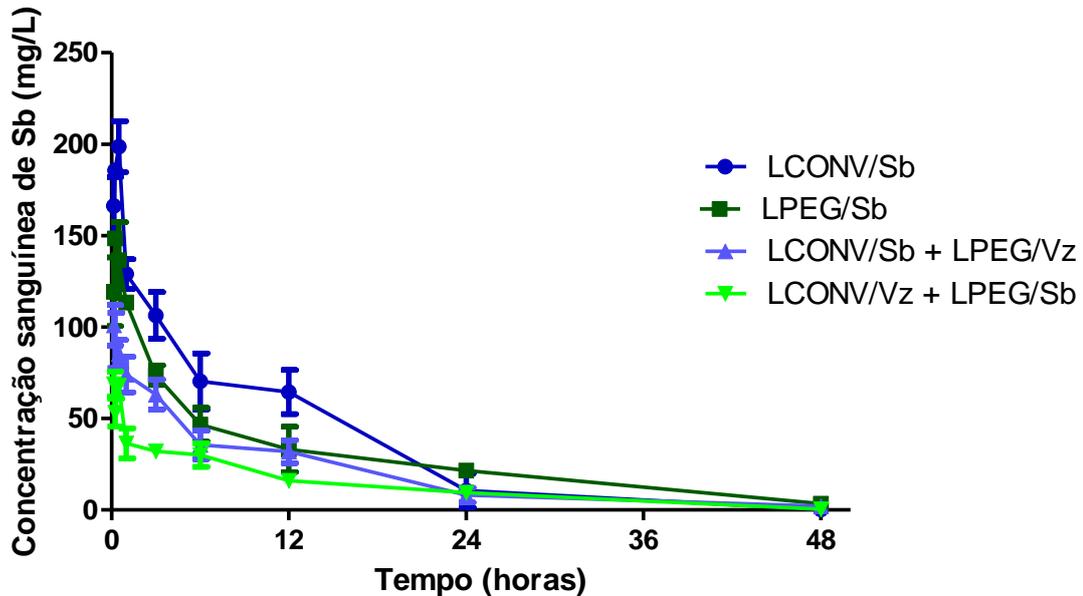
Tabela 8 – Concentração, massa e dose de Sb e relação entre Sb e lipídio das formulações lipossomais utilizadas na terceira etapa do estudo farmacocinético.

Formulação	Concentração de Sb (mg/mL)	Massa de Sb administrada (mg)	Dose de antimônio administrada (mg de antimônio/kg de peso corporal)	Relação entre concentrações	
				Sb/Lipídio	Lipídio/Sb
DSPC/CHOL/DPPG (LCONV/Sb)	6,2	0,25	8,9	0,17	5,91
DSPC/CHOL/DPPG/DSPE-PEG (LPEG/Sb)	4,5	0,18	6,5	0,12	8,15
LCONV/Sb+LPEG/Vz	3,1	0,12	4,5	0,08	11,82
LCONV/Vz+LPEG/Sb	2,3	0,09	3,2	0,06	16,30

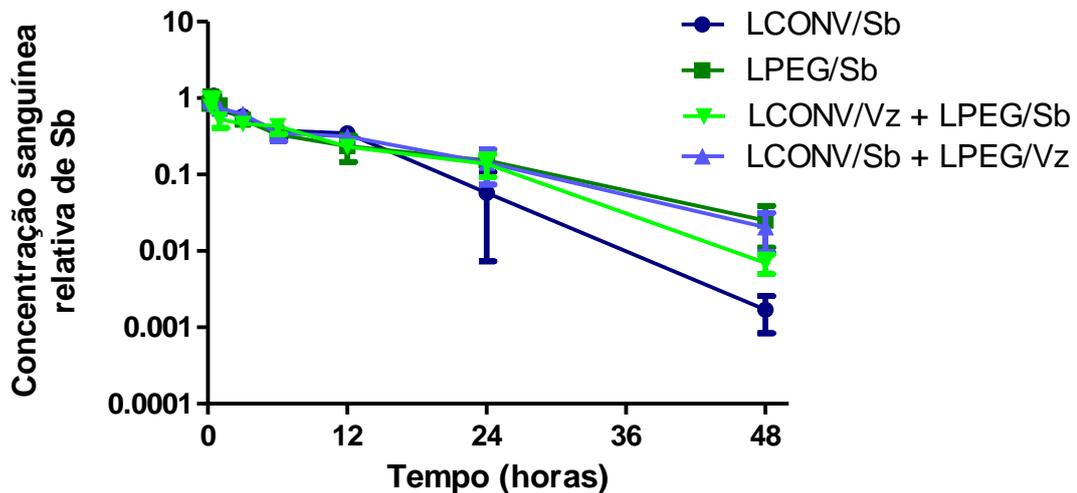
A Figura 11A, abaixo, mostra a farmacocinética do antimônio no sangue após a administração intravenosa das diferentes formulações. A Figura 11B apresenta a representação semilogarítmica das concentrações de Sb normalizadas em função da concentração máxima, que foi determinada para cada formulação pelo programa de análise farmacocinética R-STRIP® 4.3.

Figura 11 - Farmacocinética do antimônio no sangue de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas contendo antimoniato de meglumina administradas por via endovenosa.

A



B



Farmacocinética do antimônio no sangue de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas contendo antimoniato de meglumina administradas por via endovenosa. (A) Representação de concentrações de antimônio em escala linear. (B) Representação das concentrações relativas de antimônio em escala semilogarítmica após normalização em função da concentração máxima, determinada pelo programa RSTRIP® 4.3. Cada grupo recebeu uma das seguintes formulações LCONV/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz, LPEG/Sb ou LCONV/Vz+LPEG/Sb. O sangue foi coletado e o antimônio determinado por EAAFG. São apresentadas as médias +/- erro padrão, (n=4).

A Tabela 9 apresenta os parâmetros farmacocinéticos determinados para as diferentes formulações. Esses parâmetros foram obtidos utilizando o programa de análise farmacocinética R-STRIP® 4.3, que permitiu selecionar o modelo de eliminação de acordo com os critérios de Akaike (58), e indicou o melhor ajuste dos dados experimentais com o modelo bi exponencial.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos do antimônio no sangue de camundongos SWISS após injeção endovenosa de diferentes formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina.

Formulações	C_{max} (mg/L)	$t_{1/2}$ (1) (min ⁻¹)	$T_{1/2}$ (2) (min ⁻¹)	$AUC_{0-\infty}$ (g min/L)	$MRT_{0-\infty}$ (min)	Depuração (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)
LCONV/Sb	187,6	582,3	78,1	104,4	782,6	0,0853	0,0474
LPEG/Sb	140,8	1126,4	135,0	90,3	1326,4	0,0715	0,0458
LCONV/Sb + LPEG/Vz	101,5	493,6	33,8	53,4	694,8	0,0833	0,0438
LCONV/Vz + LPEG/Sb	69,3	670,4	33,6	38,6	931,5	0,0838	0,0466

C_{max} , concentração máxima; $T_{1/2}$ tempo de meia vida; $AUC_{0-\infty}$, área sob a “curva concentração sanguínea x tempo” projetada para o infinito; $MRT_{0-\infty}$, tempo médio de residência projetado para o infinito; V_{ss} , volume de distribuição no estado estacionário.

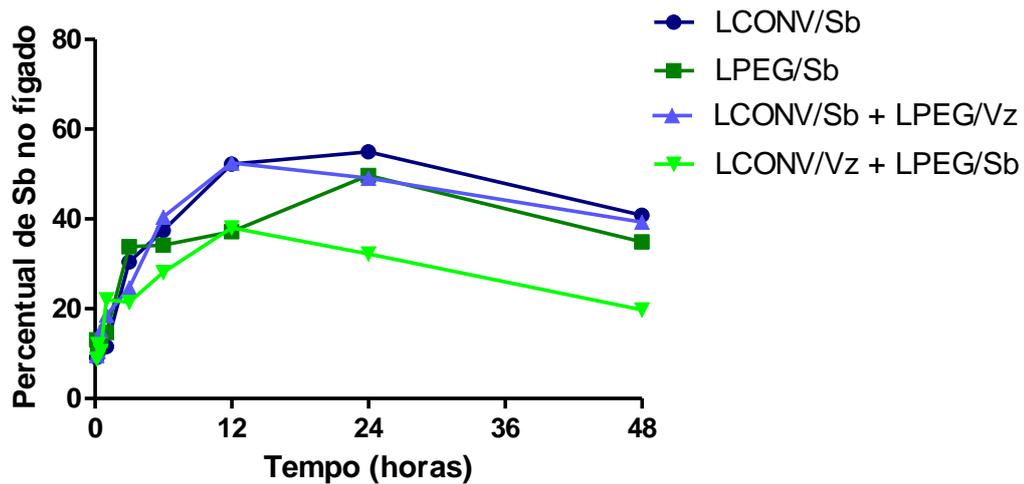
Os resultados apresentados na tabela acima indicam que tempo médio de residência da formulação LPEG/Sb foi 1,7 vezes maior que o da formulação LCONV/Sb, o que era esperado em função do efeito do PEG no tempo de circulação dos lipossomas (29, 27). Na mistura de lipossomas, o maior tempo de residência foi também observado para o LPEG/Sb (na mistura LCONV/Vz+LPEG/Sb) quando comparado ao LCONV/Sb (na mistura LCONV/Sb+LPEG/Vz). A relação entre os tempos de residência média das formulações LCONV/Sb e LCONV/Sb+LPEG/Vz, assim como das formulações LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb foi superior a 1 (1,13 e 1,42, respectivamente) o que sugere que tanto o LPEG quanto o LCONV sofrem uma redução do seu tempo de circulação.

Os valores da área sob a curva (AUC), determinados para as diferentes formulações foram condizentes com as doses diferentes de antimônio administradas para cada formulação e com os valores de concentração máxima (C_{max}).

O direcionamento do antimônio para o fígado e baço a partir das diferentes formulações foi avaliado pela relação percentual entre a massa de antimônio recuperada no órgão e a massa de antimônio administrada. A Figura 12 apresenta os resultados obtidos para o fígado, onde foram observadas diferenças

estatisticamente significativas entre as formulações LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb (Two-way ANOVA, $P=0,0026$) e entre LCONV/Sb+LPEG/Vz e LCONV/Vz+LPEG/Sb (Two-way ANOVA, $P<0,001$).

Figura 12 – Percentual de antimônio recuperado no fígado de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas.

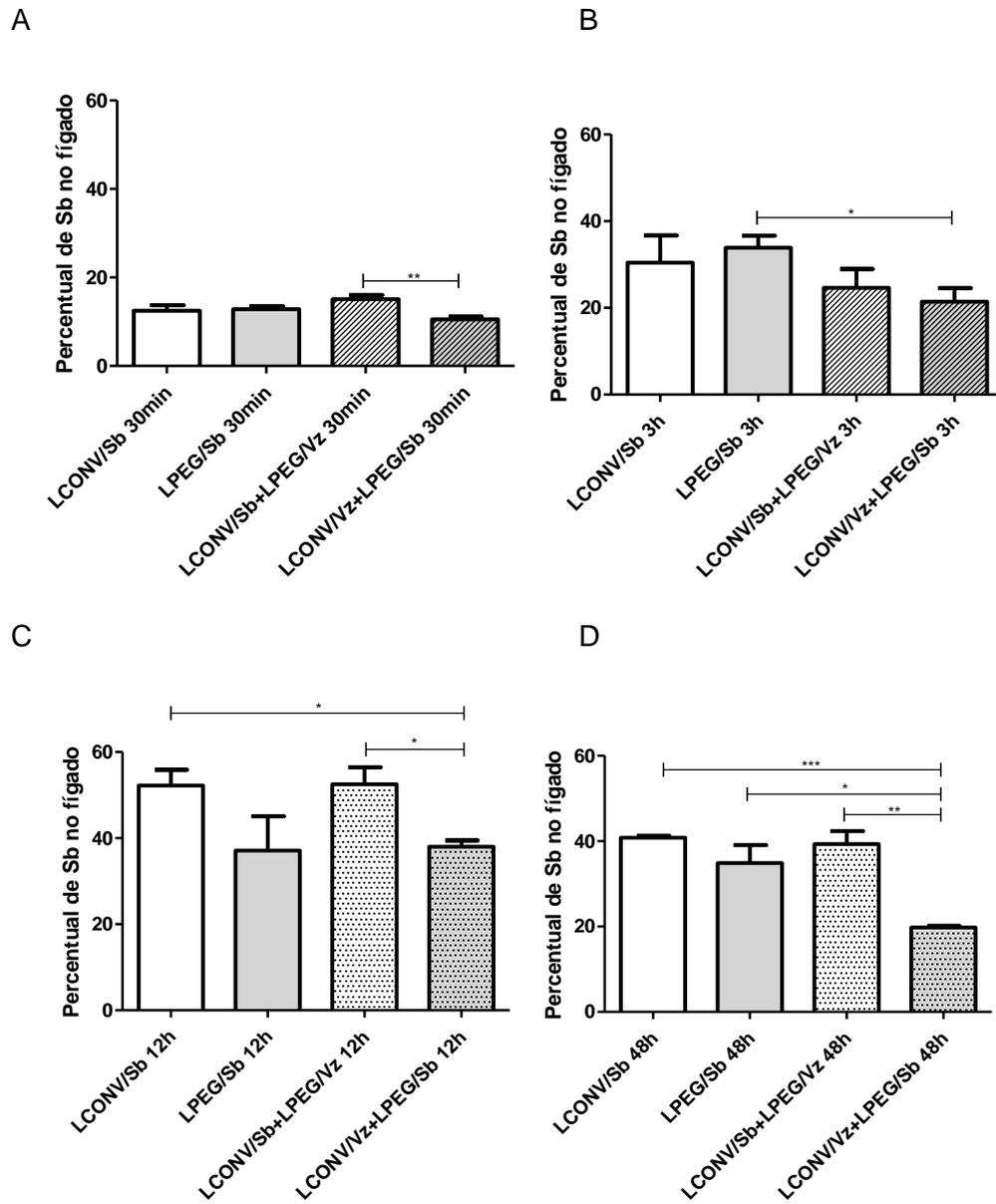


Percentual de antimônio recuperado no fígado após administração endovenosa das formulações lipossomais LCONV/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz, LPEG/Sb ou LCONV/Vz+LPEG/Sb. Há diferenças estatisticamente significativas entre as formulações LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb (Two-way ANOVA, $P=0,0026$), entre LCONV/Sb+LPEG/Vz e LCONV/Vz+LPEG/Sb (Two-way ANOVA, $P<0,001$) e entre LCONV/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb (Two-way ANOVA, $P=0,0002$). São apresentadas as médias, ($n=4$).

Na comparação entre os lipossomas LCONV e LPEG administrados isoladamente, não foi observada diferença significativa, apesar de haver uma tendência para uma menor taxa de captação a partir de LPEG nos tempos de 12 e 48 horas, que pode explicar o maior tempo médio de residência dos lipossomas furtivos comparados aos convencionais.

Observa-se que LPEG foi mais eficaz do direcionamento de antimônio para o fígado quando administrado na forma isolada do que na forma de mistura nos tempos de 3 e 48 horas (Figura 13 B e D). Os dados obtidos indicam também que, na mistura de lipossomas, LCONV direciona uma maior proporção de antimônio para o fígado que LPEG nos tempos de 30 minutos, 12 e 48 horas (Figura 13 A, C e D).

Figura 13 - Direcionamento percentual de antimônio para o fígado de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas.



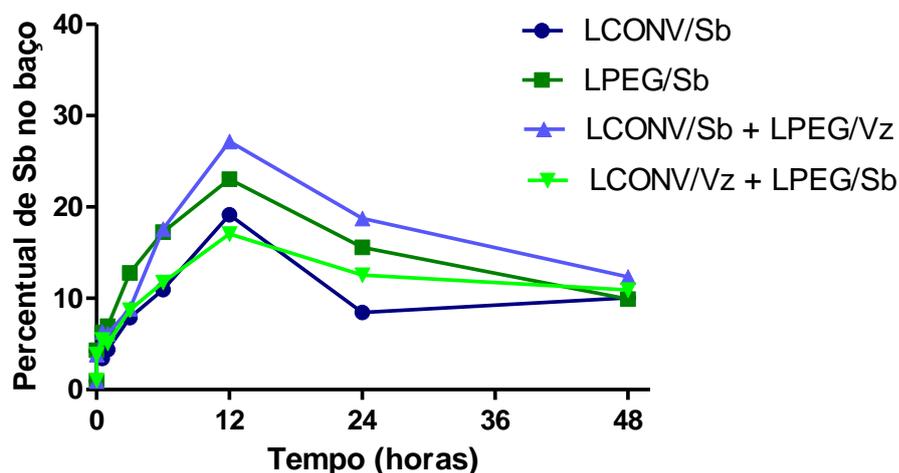
Direcionamento percentual de antimônio para o fígado de camundongos SWISS em diferentes intervalos de tempo a partir de diferentes formulações de lipossomas. Percentual de antimônio recuperado no fígado após administração endovenosa das formulações LCONV/Sb, LPEG/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz e LCONV/Vz+LPEG/Sb, nos tempos 30 minutos (A), 3 horas (B), 12 horas (C) e 48 horas (D). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e $P < 0,001$, teste t). Os dados são expressos como média +/- erro padrão.

Entre os diferentes tipos de lipossomas e formas de apresentação (isolada ou mistura), como tendência geral, podemos ressaltar que os lipossomas convencionais na forma isolada (LCONV/Sb) são aqueles que apresentaram o direcionamento mais

efetivo para o fígado, enquanto os lipossomas furtivos na mistura (LCONV/Vz+LPEG/Sb) mostraram a menor taxa de direcionamento.

A Figura 14 apresenta a porcentagem da dose de antimônio recuperada no baço dos animais. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as formulações LCONV/Sb e LPEG/Sb ($P=0,0150$), entre LCONV/Sb e LCONV/Sb+LPEG/Vz ($P=0,0214$), entre LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb ($P=0,0258$) e entre LCONV/Sb+LPEG/Vz e LCONV/Vz+LPEG/Sb ($P= 0,0146$) (Two-way ANOVA).

Figura 14 – Percentual de antimônio recuperado no baço de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas.



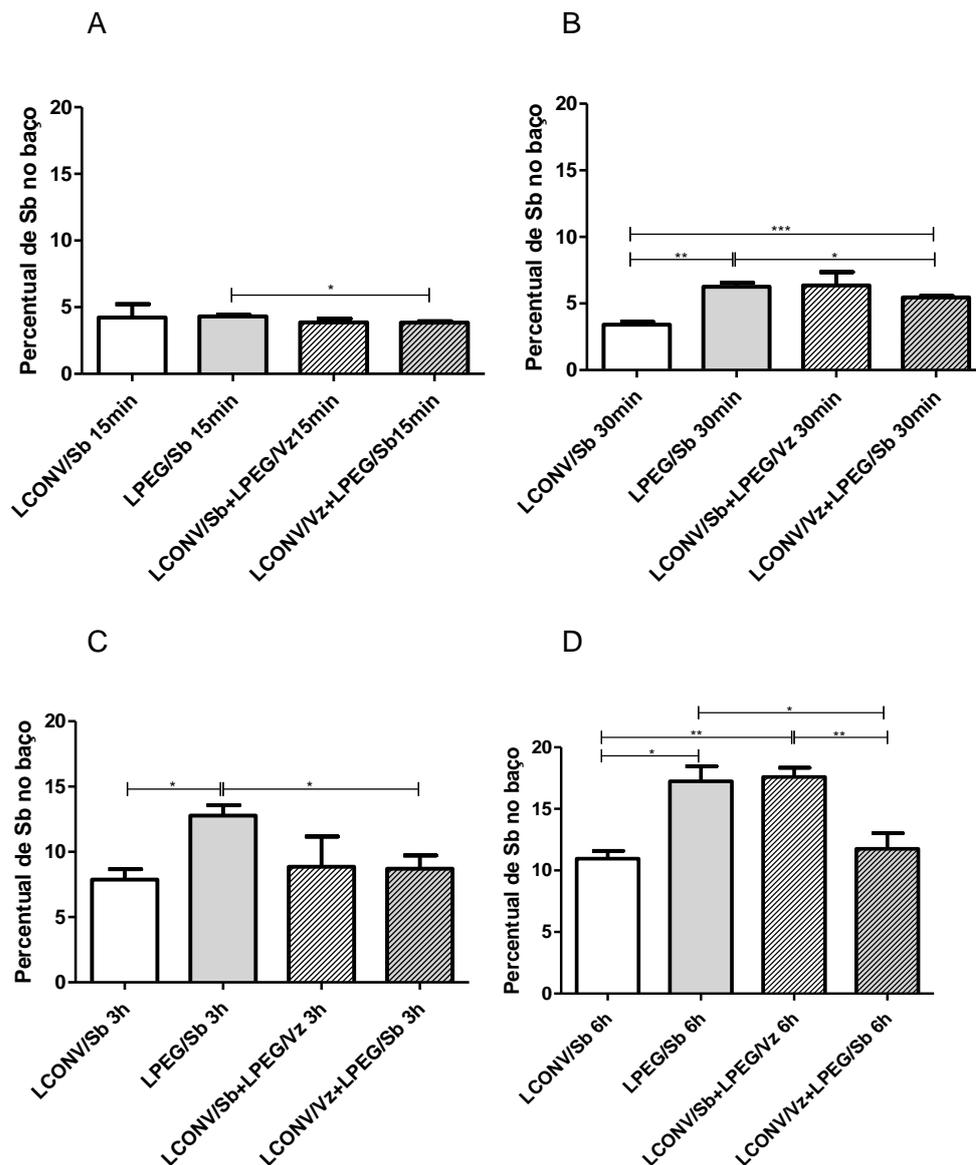
Direcionamento percentual de antimônio recuperado no baço de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas. Percentual de antimônio para o fígado após administração endovenosa das formulações lipossomais LCONV/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz, LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb. Há diferenças estatisticamente significativas entre as formulações LCONV/Sb e LPEG/Sb ($P=0,0150$, Two-way ANOVA), entre LCONV/Sb e LCONV/Sb+LPEG/Vz ($P=0,0214$, Two-way ANOVA), entre LPEG/Sb e LCONV/Vz+LPEG/Sb ($P=0,0258$, Two-way ANOVA) e entre LCONV/Sb+LPEG/Vz e LCONV/Vz+LPEG/Sb ($P= 0,0146$, Two-way ANOVA). São apresentadas as médias, ($n=4$).

Os lipossomas furtivos na forma isolada (LPEG/Sb) apresentaram direcionamento significativamente maior de antimônio para o baço que os convencionais (LCONV/Sb) aos 30 minutos, 3 e 6 horas (Figura 15 B, C e D).

Conforme observado no fígado, LPEG promove uma maior proporção de antimônio para o baço quando administrado na forma isolada do que na forma de mistura, nos tempos de 15 minutos, 3 e 6 horas (Figura 15 A, C e D). Ao contrário, LCONV

promoveu uma menor proporção de antimônio no baço na forma isolada do que na forma de mistura, no tempo de 6 horas (Figura 15 D). Os resultados indicam também que, na mistura de lipossomas, LCONV proporciona uma maior proporção de antimônio para o baço do que LPEG, no tempo de 6 horas.

Figura 15 – Direcionamento percentual de antimônio para o baço de camundongos SWISS a partir de diferentes formulações de lipossomas.



Direcionamento percentual de antimônio para o baço de camundongos SWISS em diferentes intervalos de tempo após administração de diferentes formulações de lipossomas. Percentual de antimônio recuperado no baço após administração endovenosa das formulações LCONV/Sb, LPEG/Sb, LCONV/Sb+LPEG/Vz ou LCONV/Vz+LPEG/Sb, nos tempos 15 minutos (A), 30 minutos (B), 3 horas (C) e 6 horas (D). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e $P < 0,001$, teste t). Os dados são expressos como média +/- erro padrão.

Como tendência geral, podemos ressaltar que, entre os diferentes tipos de lipossomas e formas de apresentação, LPEG isoladamente e LCONV na mistura, foram as formulações que mostraram o maior direcionamento para o baço, enquanto LCONV isoladamente promoveu o menor direcionamento.

A avaliação da afinidade dos lipossomas pelo órgão foi também determinada pela relação entre a área sob a curva gerada para o sangue e a área sob a curva gerada para o órgão (32). A Tabela 10, abaixo, apresenta os valores obtidos para o coeficiente de partição do antimônio no fígado e no baço das diferentes formulações de lipossomas. Os valores abaixo estão de acordo com aqueles referentes ao direcionamento percentual do antimônio para os órgãos apresentados acima.

Tabela 10 – Afinidade de diferentes formulações de lipossomas contendo antimônio pelo baço e fígado de camundongos SWISS após administração endovenosa.

Formulação	AUC ^a sangue (mg min/L)	AUC ^a baço (µg min/g)	AUC ^a fígado (µg min/g)	Coefficiente de partição ^b baço	Coefficiente de partição ^b fígado
LCONV/Sb	99.452	634.567	226.212	6,4	2,3
LPEG/Sb	81.962	695.674	186.511	8,5	2,3
LCONV/Sb + LPEG/Vz	56.093	516.348	130.464	9,2	2,3
LCONV/Vz + LPEG/Sb	37.780	266.339	59.939	7,0	1,6

^a Geradas pelo programa GraphPad Prism[®] 5. ^b Coeficiente de partição = AUC órgão/AUC sangue

Como primeira observação, todas as formulações promoveram uma maior partição do fármaco para o baço que para o fígado (fator variando entre 2,8 e 4,4 vezes). Os dados obtidos confirmam duas tendências já identificadas no estudo de proporção de antimônio encontrada para os órgãos. A administração de LPEG na forma de mistura de lipossomas reduziu sua afinidade tanto para o fígado quanto para o baço. A administração de LCONV na forma de mistura aumentou seu direcionamento para o baço.

O presente estudo permitiu esclarecer o impacto da apresentação de lipossomas convencionais e furtivos, na forma de mistura, no perfil farmacocinético e na distribuição de cada tipo de lipossomas, utilizando o antimônio encapsulado como marcador. Os resultados indicam que os lipossomas convencionais apresentam, na mistura, um aumento de sua afinidade pelo baço, porém não mostram alteração da sua afinidade pelo fígado, podendo explicar ainda a elevada eficácia da mistura de

lipossomas na redução da carga parasitária no baço em modelo murino de leishmaniose visceral (47).

Por outro lado, os lipossomas furtivos apresentaram, na mistura, uma redução de sua captura pelo fígado e pelo baço. Isto sugere um aumento da captura desses lipossomas por outros órgãos ricos em macrófagos, como por exemplo, a medula óssea, de acordo com a redução do tempo de residência média para esses lipossomas, na mistura. Esse modelo permitiria explicar a elevada eficácia da mistura de lipossomas convencionais e furtivos na redução da carga parasitária na medula óssea em modelo murino de leishmaniose visceral (47).

Uma importante contribuição desta dissertação é a demonstração da interferência de um tipo de lipossomas na farmacocinética e distribuição do outro tipo de lipossomas. A redução da captura dos lipossomas furtivos, na forma de mistura, pelo fígado e baço, poderia ser explicada pela reconhecida afinidade dos lipossomas convencionais por este órgão (31 e 27), os lipossomas convencionais estariam competindo com os furtivos inibindo sua captura.

Como explicação possível para a maior captação dos lipossomas convencionais pelo baço, os lipossomas furtivos poderiam competir com menor eficiência que os convencionais para a ligação de lipossomas convencionais no baço.

O modelo atualmente mais aceito, que permite explicar a competição entre os diferentes tipos de lipossomas, refere-se ao número limitado de opsoninas no plasma sanguínea, que promovem a captura dos lipossomas pelas células fagocitárias (26), e à maior afinidade dessas opsoninas por lipossomas convencionais que por vesículas peguilados (26). Além disso, foi proposto que a ligação de proteínas plasmáticas conhecidas como desopsininas poderia resultar na redução da captação dos lipossomas peguilados (60).

5.2 Avaliação da capacidade de encapsulação do antimoniato de meglumina em lipossomas de acordo com o método FDEL e processo escalonável

Os avanços obtidos em relação ao desenvolvimento de uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina capaz de direcionar o antimônio aos principais focos de infecção por *Leishmania spp.* fígado, baço, medula óssea e pele, foram consideráveis. Resumidamente, passaram pela utilização do processo de liofilização de lipossomas vazios (*Freeze-dried Empty Liposomes* – FDEL) que apresenta a vantagem tecnológica de não expor o princípio ativo à liofilização, reduzindo riscos de alteração química, além de a formulação resultante poder ser armazenada e a reidratada imediatamente antes da utilização (40). Em seguida, a inclusão de crioprotetores antes da etapa de liofilização reduziu o tamanho final das vesículas de 1200 nm para 400 nm aumentando em até 4 vezes o direcionamento do antimônio para a medula óssea de cães naturalmente infectados (43). A utilização de lipossomas furtivos de 200nm promoveu o aumento no tempo de meia vida do antimônio na circulação sanguínea, aumento do seu direcionamento para medula óssea e pele de cães naturalmente infectados. Ainda, a utilização de mistura de lipossomas convencionais e furtivos apresentou maior eficácia no tratamento de LV em modelo murino (47). No entanto, os processos de produção de lipossomas utilizados em todos esses estudos não permitem a sua produção em larga escala. Nos últimos estudos foram utilizadas a ultrassonicação para a obtenção de vesículas pequenas a partir de vesículas multilamelares e, após a liofilização, foi necessário incluir uma etapa de calibração do tamanho das vesículas (47).

As alterações no processo de produção propostas neste estudo incluem a utilização de extrusão, método empregado em escala industrial, no lugar da ultrassonicação, e a retirada da etapa de calibração após a reconstituição do pó liofilizado. Foram propostas, ainda, as substituições do DSPC por HSPC e do DCP por DPPG, com objetivo de reduzir o custo da formulação e melhorar a biocompatibilidade. Assim, além da formulação original composta por DSPC/COL/DCP foram preparadas e caracterizadas formulações convencionais compostas por, HSPC/COL/DCP e HSPC/COL/DPPG e formulações furtivas compostas por DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG, HSPC/COL/DCP/DSPE-PEG e DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG.

A Tabela 11 apresenta os diâmetros hidrodinâmicos médios, índices de polidispersão e potenciais Zeta obtidos antes do processo de liofilização e diâmetros hidrodinâmicos médios, índices de polidispersão taxa de encapsulação, obtidos após o processo de liofilização, determinados por DLS e EAAFG.

Tabela 11 – Caracterização de formulações de antimoniato de meglumina com lipossomas de diferentes composições lipídicas, preparados pelo método FDEL.

Formulação	DLS - Antes da liofilização			DLS - Depois da liofilização		EAAFG	
	Diâmetro Médio +/-DP (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta	Diâmetro Médio +/-DP (nm)	Índice de Polidispersão	Taxa de Encapsulação (%Sb)	n
DSPC/COL/DCP	172 +/- 6	0,108 +/- 0,034	-77,6 +/- 10,4	198 +/- 10	0,213 +/- 0,017	15,3 +/- 1,6	3
HSPC/COL/DCP	178 +/- 10	0,078 +/- 0,028	-62,4 +/- 10,2	272 +/- 54	0,262 +/- 0,080	18,8 +/- 5,9	10
DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG	168 +/- 7	0,105 +/- 0,023	-71,7 +/- 1,6	317 +/- 90	0,386 +/- 0,097	15,7 +/- 3,4	3
HSPC/COL/DCP/DSPE-PEG	176 +/- 5	0,073 +/- 0,037	-72,1 +/- 14,8	307 +/- 118	0,286 +/- 0,108	12,9 +/- 5,1	8
DSPC/COL/DPPG	189 +/- 3	0,060 +/- 0,027	-72,4 +/- 2,7	130 +/- 13	0,072 +/- 0,040	7,5 +/- 1,8	4
HSPC/COL/DPPG	200 +/- 6	0,057 +/- 0,009	-62,2 +/- 9,0	138 +/- 5	0,080 +/- 0,010	5,1 +/- 0,9	3
DSPC/COL/DPPG/DSPE-PEG	174 +/- 9	0,072 +/- 0,016	-68,2 +/- 2,5	150 +/- 3	0,160 +/- 0,028	7,9 +/- 1,0	4

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros médios das formulações analisadas antes da liofilização, e os índices de polidispersão encontrados nesta etapa foram inferiores a 0,2, caracterizando população monodispersa. Todas as formulações apresentaram potencial Zeta negativo, sem diferença estatisticamente significativa entre elas.

Após o processo de liofilização as formulações contendo o fosfolípido DCP apresentaram aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico médio e seus índices de polidispersão ficaram maiores que 0,2, a formulação DSPC/COL/DCP/DSPE-PEG apresentou índice de polidispersão de 0,386, indicando distribuição polidispersa de tamanho. As formulações contendo o fosfolípido DPPG apresentaram redução significativa do tamanho das vesículas após a etapa de liofilização e seus índices de polidispersão se mantiveram inferiores a 0,2.

As diferenças nas taxas de encapsulação não foram significativas, quando o fosfolípido DSPC foi trocado por HSPC, nas formulações convencionais e furtivas contendo DCP.

Vale ressaltar que a taxa de encapsulação observada para a formulação original (DSPC/COL/DCP) foi menor que aquela relatada em estudos anteriores do grupo do Prof. Frederic Frezard. Schetitini e col. em 2006 (43) obtiveram vesículas de 410nm de diâmetro e taxa de encapsulação de aproximadamente 40% utilizando a ultrassonicação como etapa de calibração antes da liofilização. A ultrassonicação leva à vesículas unilamelares pequenas (SUVs) que são fisicamente instáveis (25), esta instabilidade poderia favorecer a fusão e o conseqüente aumento de tamanho durante o processo de reconstituição após a liofilização. Ainda, as pequenas vesículas formadas por ultrassonicação aumentam a superfície de contato com o fármaco, podendo favorecer sua encapsulação. O método de preparo proposto neste trabalho substitui a ultrassonicação pela extrusão, que gera vesículas grandes unilamelares (LUVs) e, também, vesículas oligolamelares, Figura 2, nas quais a presença de mais de uma lamela reduz o volume interno da vesícula e, conseqüentemente, a taxa de encapsulação. Outra possível explicação para a menor encapsulação seria a etapa de centrifugação, necessária para separar o antimônio não encapsulado, que usou força centrífuga mais elevada neste que naquele trabalho, devido ao menor tamanho das vesículas. O maior tempo de centrifugação associado à diferença de osmolaridade entre o compartimento interno das vesículas (623 mmol/kg) e o externo (290 mmol/kg) poderia contribuir para o vazamento do conteúdo dos lipossomas.

Nas formulações onde, além do DSPC, o DCP foi substituído por DPPG, houve redução estatisticamente significativa da taxa de encapsulação. O mesmo foi observado nas formulações em que apenas o DCP foi substituído por DPPG. A superfície da vesícula é determinante na taxa de encapsulação dos antimoniais (35) e, possivelmente, o estado de ionização do fármaco também influencia a encapsulação. O antimoniato de meglumina apresenta-se na forma zwitteriônica entre pH 4,5 e 7,5 (61) e a formulação de DCP apresenta pH entre 3,0 e 4,0. Neste intervalo de pH, parte do antimoniato de meglumina está ionizado, com uma carga positiva proveniente do grupo amina, o que pode favorecer a interação do fármaco com a membrana carregada negativamente e a sua encapsulação. Já nas formulações compostas de DPPG, que apresentam pH 7,3, a interação do antimonial, na forma zwitteriônica, com a membrana vesicular poderia ser desfavorecida, reduzindo a taxa de encapsulação destes lipossomas. De fato, a

neutralização da formulação HSPC/COL/DCP, pH 7,4, reduziu significativamente a taxa de encapsulação do antimonial, passando de 18,8% +/- 6 para 5,9 +/- 2, sugerindo que o estado de ionização do fármaco tem importância na eficiência da encapsulação.

Portanto, nas formulações contendo DCP, a troca do DSPC por HSPC não é crítica, mas a utilização do DPPG no lugar de DCP reduz significativamente a capacidade de encapsulação do antimoniato de meglumina nos lipossomas.

Como alternativas para aumentar a taxa de encapsulação das formulações compostas por DPPG, sugere-se a manipulação do seu pH, mantendo-o abaixo do pH 4,5, favorecendo a interação do fármaco protonado com a cabeça polar carregada negativamente do DPPG. Ainda, extrusar as formulações em membranas de poro de 50 nm, gerando vesículas unilamelares pequenas e instáveis, o que poderia favorecer a agregação no momento da reconstituição após a liofilização, reproduzindo a condição encontrada no método que emprega a ultrassonicação. O aumento da osmolaridade do tampão fostato, usado na etapa de centrifugação, poderia reduzir a pressão osmótica e minimizar o possível vazamento ocorrido nesta etapa.

6 Conclusões

Essa dissertação de mestrado permitiu os seguintes avanços:

1- O método de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite foi validado para a determinação de antimônio em sangue digerido de camundongos, mostrando precisão, exatidão e linearidade na faixa de concentração de 20 a 180 µg/L.

2- Mostramos que lipossomas peguizados contendo DPPG apresentam características de circulação prolongada semelhantes àqueles de lipossomas contendo DCP, mas superiores àqueles de lipossomas de DPPA.

3- Evidenciamos que uma mistura de lipossomas convencionais e furtivos, quando administrada por via endovenosa em camundongos, apresentam perfil farmacocinético diferente daquele observado para formulações lipossomais convencionais ou furtivas administradas separadamente pela mesma via. Conclui-se ainda que a presença de um tipo de lipossomas, convencional ou furtivo, interfere no comportamento farmacocinético do outro tipo. A administração dos lipossomas furtivos na presença dos convencionais (LCONV/Vz+LPEG/Sb) reduziu sua afinidade tanto para o fígado quanto para o baço. A administração dos lipossomas convencionais na forma de mistura (LCONV/Sb+LPEG/Vz) aumentou seu direcionamento para o baço.

4- Mostramos ainda que a troca do fosfolipídio sintético DSPC pelo natural HSPC, tornando a formulação mais biocompatível e de custo mais baixo é viável. No entanto, a troca de DCP por DPPG levou à perda considerável na capacidade de encapsulação da formulação do antimoniato de meglumina. Além disso, o método de preparo utilizado garante as características, utilizando apenas equipamentos e técnicas empregadas em escala industrial, demonstrando, portanto que a produção desta formulação em larga escala é possível.

7 Bibliografia

1. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE **Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update**. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiologica_l_and_drug_access_update.pdf>. Acesso em: 01 set. 2013
2. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. WHO technical report series no. 949, 2010, 186 p.
3. GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. **American cutaneous leishmaniasis**. Rev. Soc. Bras. Med. Tróp., v. 36(1) p.71-80, 2003.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de controle e vigilância da Leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2006, 120p.
5. ALVAR, J. et.al. **Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy**. Ann. Trop. Med. Parasitol. v. 88, p. 371–78, 1994.
6. MORENO, J.; ALVAR, J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model**. Trends in Parasitol., v.18, p. 399 – 405, 2002.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria interministerial nº 1426, de 11 de julho de 2008, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jul. 2008, Seção 1, p. 37.
8. DEN BOER, M. D. et. al. **Leishmaniasis impact and treatment access**. Clin. Microbiol. Infect., V. 17, p. 1471–77, 2011.
9. VAN GRIENSVEN, J. et. al. **Combination therapy for visceral leishmaniasis**. Lancet. Infect. Dis., v. 10 p. 184–94, 2010.
10. SHAKED-MISHAN, P. et. al. **Novel intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani****. J. Biol. Chem., v. 276, p. 3971–76, 2001.
11. FREZARD, F. et. al. **Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate**. Antimicrob. Agents Chemother., v. 45, p. 913–16, 2001.
12. YAN, S. et.al. **Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione**. J. Biol. Inorg. Chem., v. 8, p. 689–97, 2003.
13. DEMICHELI, C. et. al. **Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution**. Biochim. Biophys. Acta, v. 1570 p. 192–98, 2002.

14. FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; IBEIRO, R. R. **Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs.** *Molecules*, v. 14, p. 2317-36, 2009.
15. SUNDAR, S. **Failure of pentavalente antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 31 p.1104–07, 2000.
16. CHAPPUIS, F. **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?** *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, p. 873-82, 2007.
17. JHA, T. K. et. al. **Miltefosine, an oral agent, for the treatment of indian visceral leishmaniasis.** *N. Engl. J. Med.*, v. 341, p. 1795 – 1800, 1999.
18. SUNDAR, S. **Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis.** *N. Engl. J. Med.*, v. 347, p. 1739 – 46, 2002.
19. BHATTACHARYA, S. K. et. al. **Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis.** *J. Infect. Dis.*, v. 196, p. 591-98, 2007.
20. DAVIDSON, R.N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K., **Paromomycin.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103, p. 653-60, 2008.
21. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** WHO Technical report series no. 975, 2012, 100 p.
22. FREZARD, F. **Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, p. 181-89, 1999.
23. FRÉZARD, F. et. al. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio.** *Quím. Nova*, v. 28, p. 511 – 18, 2005.
24. NAYAR, R.; HOPE. M. J.; CULLIS, P. R. **Generation of unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 986, p. 200-06, 1989.
25. GREGORIADIS, G. **Liposome technology - Liposome Preparation and Related Techniques.** 2007, Ed. Informa Healthcare USA, Inc., 3^a ed., v. 1, 324 p.
26. MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. **Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties.** *Prog. Lipid Res.*, v. 42, p. 463–78, 2003.
27. WOODLE, M. C.; LASIC, D. D. **Sterically stabilized liposome.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1113, p. 171-99, 1992.

28. ALLEN, T. M.; HANSEN, C. B.; MENEZES, D. E. L. **Pharmacokinetics of long-circulating liposomes.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 16, p. 267-84, 1995.
29. MAYER, L. D. et. al. **Solute distribution and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 817, p. 193-96, 1985.
30. YACHI, K. et. al. **Biopharmaceutical evaluation of the liposomes prepared by rehydration of freeze-dried empty liposomes (FDEL) with an aqueous solution of a drug.** *Biopharm. Drug Disp.*, v. 17, p. 589-605, 1996.
31. ALLEN, T.M. et. al. **Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives in vivo.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1066, p. 29-36, 1991.
32. DRUMMOND, D. C. **Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors.** *Pharmacol. Rev.*, v. 51, p. 691-743, 1999.
33. TORCHILIN, V. P. **Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.** *Nature Rev.*, v. 4, p. 145-60, 2005.
34. KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S. **Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages.** *J. Drug Deliv.*, v. 2011, p. 1-11, 2010.
35. BLACK, C.D.V.; WATSON, G.J. **The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy in experimental leishmaniasis.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 71, p. 550-52, 1977.
36. FREZARD, F.; DEMICHELI C. **New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs.** *Expert. Opin. Drug Deliv.*, v. 7, p. 1343-58, 2010.
37. COLLINS, M.; BAILLIE, A. J.; CARTER, K. C. **Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stages of infection: II. Changes in tissue drug distribution.** *Int. J. Pharm.*, v. 83, p. 251-56, 1992.
38. ALVING, C.R. **Liposomes as Drug Carriers in Leishmaniasis and Malaria.** *Parasitol. Today*, v. 2, p. 101-07, 1986.
39. WASSEF et. al. **Toxic effects of antileishmanial reverse-phase evaporation liposomes containing decetyl phosphate in monkeys.** *Drug Deliv.*, v. 2, p. 181-89, 1995.
40. FRÉZARD F. et. al. **Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 841-46, 2000.

41. SCHETTINI, D. A. et. al. **Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs.** Braz. J. Med. Biol. Res., v. 36, p. 269-72, 2003.
42. SCHETTINI, D. A. et. al. **Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate.** Braz. J. Med. Biol. Res., v. 38, p. 1879-83, 2005.
43. SCHETTINI, D. A. et. al. **Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size.** Int .J. Pharm., v. 315, p. 140-7, 2006.
44. RIBEIRO, R.R. et. al. **Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 52, p. 2564-72, 2008.
45. SILVA, S.M. et. al. **Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 56 p. 2858-67, 2012.
46. AZEVEDO, E.G. et. al. **Prolonged Blood Circulation Time of Antimony in Dogs with Visceral Leishmaniasis from Liposomes with 175-nm Diameter.** J. Nanomedic. Biotherapeu. Discover., v. 1 p. 1-5, 2011.
47. AZEVEDO, E.G. **Lipossomas de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral.** 203 112 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
48. DEMICHELI, C. et. al. **Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate.** Applied Organomet Chem., v. 17, p. 226–31, 2003.
49. RIBEIRO, F. R. et al. **Amphiphilic Antimony(V) Complexes for Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 57, p. 4229-36, 2013.
50. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 02 de junho de 2003.
51. INMETRO Coordenação Geral de Acreditação, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008. rev. 03, 2010, 20 p.

52. MOREAU R. L. M. & SIQUEIRA M. E. P. B. **Ciências farmacêuticas toxicologia analítica**, 2008, Ed. Guanabara Koogan, p. 20.
53. GREEN J. M. **A practical guide to analytical method validation**. Anal. Chem. News Feat., v. 68, p. 305, 1996.
54. MALVERN INSTRUMENTS **Zetasizer Nano Series user manual**. United Kingdom, 2004, 288 p.
55. NANOSIGHT **Applications of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in Nanoparticle Research**. 2009. Disponível em: <http://www.nanosight.com/appnotes/M110B%20Application%20Review%20NTA%20April%202009.pdf>> Acesso em: 15/6/2013.
56. STEWART, J. C. M. **Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate**. Anal. Biochem., v. 104, p. 10-14, 1980.
57. TRIOLA, M. F., **Introdução à estatística**. 2008, Ed. LTC, 696 p.
58. YAMAOKA, K.; NAKAGAVA, T.; UNO, T. **Application of Akaike's information criterion in the evaluation of linear pharmacokinetics equations**. J. Pharmacokinet. Biopharm., v. 6, p. 165-75, 1998.
59. YAN, X. et al. Liposome Oponization. J. Liposome Res., v. 15, p. 109-39, 2005.
60. DEMICHELI, C. et al. **Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate**. BioMetals, v. 12, p. 63-66, 1999.