

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

MARCELA ZÁQUIA FRAGA DE CASTRO

FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS
ANÁLISE SISTEMÁTICA PARA FINS REGULATÓRIOS

Belo Horizonte

2015

MARCELA ZÁQUIA FRAGA DE CASTRO

**FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS
ANÁLISE SISTEMÁTICA PARA FINS REGULATÓRIOS**

Dissertação como requisito parcial para obter o grau de mestre em Inovação Biofarmacêutica, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica – área de concentração: Biotecnologia e Formulações Farmacêuticas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard - UFMG

Belo Horizonte

2015

043 Castro, Marcela Záquia Fraga de.
Formulações lipossomais injetáveis análise sistemática para fins regulatórios
[manuscrito] / Marcela Záquia Fraga de Castro. - 2015.

156 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Frederic Jean Georges Frezard.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas.

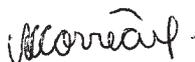
1. Lipossomos - Regulação - Teses. 2. Toxicidade - Teses. 3. Métodos
analíticos. 4. Caracterização. 5. Estabilidade. I. Frezard, Frederic Jean Georges. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III.
Título.

CDU:615

“FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS – ANÁLISE SISTEMÁTICA PARA FINS REGULATÓRIOS”.

MARCELA ZÁQUIA FRAGA DE CASTRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 30 de abril de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



PROFA. DRA. ANA PAULA CORREA DE OLIVEIRA BAHIA
CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA



PROFA. DRA. MARIA ARLETE SILVA PIRES
CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA



PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD
ICB/UFMG, ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 30 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela força e perseverança para realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ter me proporcionado um maior conhecimento técnico para a execução das minhas atividades na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

À Anvisa pela oportunidade de realizar essa pós-graduação e de ampliar horizontes em busca de aprimorar minha capacitação técnica.

Ao professor Frédéric Jean Georges Frézard, meu orientador, por ter embarcado comigo nesse desafio, me auxiliando, esclarecendo dúvidas, e por ter participado efetivamente na elaboração deste trabalho.

A Andreas Wagner, Gerard Jensen, Daan J. A. Crommelin e Frédéric Frézard por terem avaliado e contribuído na construção dos diagramas de Ishikawa.

A Wim Jiskoot, Michael.Kaszuba, Geisi Rojas Barreto e Frédéric Frézard pela análise crítica do texto referente aos principais métodos de análise de tamanho de partícula e carga elétrica superficial.

À Geisi Barreto pelo interesse e disponibilidade em colaborar com o projeto, e pelo envio de diversos materiais referentes às técnicas de medição de tamanho de partícula e carga elétrica superficial.

A Luiz Rogerio Silva e Nelson dos Santos Junior pelos esclarecimentos de dúvidas com relação a testes constantes na farmacopeia USP.

A Mark Schenerman, Ulf Nobbmann, Vincent Hackley e à equipe técnica da Avanti Polar Lipids, Inc. pelo esclarecimento de dúvidas.

A Gustavo Cadurim de Oliveira por indicar Andreas Wagner para participação neste trabalho.

A Volkmar Weissig, Debi Sarkar, Diana Bowman, Donatella Paolino, Jan A.A.M. Kamps, Lars Lindner, Pallab Pradhan, Peter van Hoogevest, Pieter Cullis, Robert Lionenberg, Michail Kastellorizios, Sean Sullivan, Sian Chong Hock e Pierre Simard pelo envio de artigos e material bibliográfico.

Às professoras Maria Arlete Silva Pires e Ana Paula Correa de Oliveira Bahia por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora.

Ao Afonso, aos meus familiares e amigos que acompanharam e vivenciaram essa jornada cheia de desafios, ansiedade, e tempo limitado para momentos de lazer, muito obrigada pelo apoio e compreensão.

RESUMO

A nanotecnologia tem se destacado na área farmacêutica como alternativa para entrega de fármacos no local alvo, e engloba diversas categorias de carreadores de fármacos como os sistemas lipídicos coloidais e os sistemas poliméricos. Dentre estes, os lipossomos se destacam por suas características biocompatíveis, biodegradáveis, baixa toxicidade e alta versatilidade. Já existem muitos medicamentos lipossomais comercializados, a maioria de uso injetável. Do ponto de vista regulatório foram publicados alguns documentos pela FDA e EMA mas ainda não foi realizada uma análise sistemática dos fatores que influenciam a eficácia, toxicidade e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis a fim de se identificar os itens relevantes do ponto de vista regulatório, principalmente no que se refere ao seu controle de qualidade e estabilidade. O objetivo deste trabalho foi realizar essa análise com uso de diagramas de causa e efeito (Ishikawa) a fim de proporcionar conhecimento para a atuação regulatória e embasar o desenvolvimento de regulamentações ou guias contendo requisitos específicos para produtos lipossomais injetáveis, principalmente no que se refere ao seu controle da qualidade e estabilidade. Foi possível identificar: a necessidade de revisão do conceito vigente de excipiente; os paradoxos inerentes aos medicamentos lipossomais injetáveis; os atributos de qualidade críticos para a eficácia, segurança e estabilidade dessa categoria de produtos, bem como alguns dos testes a serem considerados na sua caracterização, controle de qualidade e estabilidade. Também foram identificados alguns aspectos importantes dos principais métodos analíticos utilizados na determinação de tamanho de partícula e carga elétrica superficial dos lipossomos. Por fim foi possível fazer análises pontuais relacionadas às Boas Práticas de Fabricação de medicamentos lipossomais injetáveis. O processo de regulação envolve a tomada de decisões que requerem conhecimento. Este trabalho, em conjunto com a regulamentação vigente, é útil para a regulação dos produtos lipossomais injetáveis.

Palavras-chave: lipossomos, regulação, eficácia, toxicidade, estabilidade, caracterização, métodos analíticos.

ABSTRACT

Nanotechnology is growing in pharmaceutical field as an alternative for drug delivery to the target site, and includes various categories of drug carriers such as colloidal lipid systems and polymeric systems. Among these, liposomes stands out by their biocompatible and biodegradable characteristics, low toxicity and high versatility. There are many marketed liposomal drug products, most of them injectables. From a regulatory perspective, some documents were published by the FDA and EMA, but not yet carried out a systematic analysis of the factors influencing efficacy, toxicity and stability of injectable liposomal drug products in order to identify regulatory relevant items, mainly with regard to its quality control and stability. The aim of this study was to perform this evaluation using cause and effect diagrams (Ishikawa) to provide knowledge for regulatory action and to support the development of regulations or guidelines containing specific requirements for injectable liposomal drug products, especially with regard to their quality control and stability. It was possible to identify: the need for reviewing the current concept of excipient; the paradoxes inherent to injectable liposomal drug products; the critical quality attributes to the efficacy, safety and stability of this products, and some of the tests to be considered in its characterization, quality control and stability. It was also identified some important aspects of the main analytical methods used for particle size and electric surface charge determination. Finally it was possible to analyze some specific topics related to Good Manufacturing Practices of injectable liposomal drug products. The regulatory process involves making decisions that require knowledge. This work, together with the current legislation, it is useful for the regulation of injectable liposomal drug products.

Keywords: liposomes, regulation, efficacy, toxicity, stability, characterization, analytical methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Representação esquemática de um lipossomo.....	20
Figura 2 - Evolução dos lipossomos.....	23
Figura 3 – Composição típica dos lipossomos.....	24
Figura 4 - Fatores que impactam a eficácia de uma formulação lipossomal injetável.....	47
Figura 5 - Representação esquemática do fluxo sanguíneo mostrando a localização das nanopartículas em meio às células vermelhas e a marginação das micropartículas e leucócitos para a parede vascular.....	49
Figura 6 - Representação esquemática do revestimento polimérico na superfície lipossomal.....	50
Figura 7 – Representação esquemática do encapsulamento do fármaco em resposta a gradientes de pH transmembrana.....	57
Figura 8 - Diferentes estruturas formadas pelos lípides.....	60
Figura 9 - Possíveis vias de liberação do fármaco do lipossomo.....	62
Figura 10 - Fatores que impactam a toxicidade de uma formulação lipossomal injetável.....	66
Figura 11 - Fatores que impactam a estabilidade de uma formulação lipossomal injetável.....	71
Figura 12 - Microscopia eletrônica de criofatura de vesículas lipossomais contendo DPPC (dispersão aquosa).....	73
Figura 13 - Representação esquemática do processo de oxidação lipídica.....	81
Figura 14 – Reações químicas envolvidas no método iodométrico para quantificação de hidroperóxidos.....	82
Figura 15 - Representação esquemática da ação antioxidante.....	84
Figura 16 - Princípio geral de funcionamento do DLS e equação de Stokes-Einstein.....	97
Figura 17 - Representação esquemática de um instrumento de difração a laser, do espalhamento de luz provocado por partículas grandes e pequenas e da fórmula para o cálculo do span.....	99

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

Figura 18 - Representação esquemática da técnica de análise da trajetória das partículas..... 100

Figura 19 - Representação esquemática da dupla camada elétrica formada em torno de uma partícula em suspensão e do local onde é medido o potencial zeta..... 101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Composição dos Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na Anvisa, FDA e EMA e de alguns potencialmente comercializáveis em fase de testes clínicos.....	26
Quadro 2 - Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na ANVISA, FDA e EMA e alguns em fase de testes clínicos.....	33
Quadro 3- Atributos de qualidade extraídos dos diagramas de Ishikawa.....	91
Quadro 4 - Testes para caracterização e estabilidade de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA ou FDA.....	107
Quadro 5 - Parâmetros operacionais que devem ser controlados durante a produção de formulações lipossomais injetáveis.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CHOL	colesterol
CP	consulta pública
DLS	espalhamento de luz dinâmico
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DOPE	dioleilfosfatidiletanolamina
DPPA	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato
DPPC	1,2- dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero -3- fosfatidilcolina
DPPG	1,2- dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero -3- fosfatidilglicerol
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DSPC	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
DSPE-PEG	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[amino (polietilenoglicol)]
DSPG	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilglicerol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
EPG	fosfatidilglicerol de ovo
EUA	Estados Unidos da América
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GC	cromatografia gasosa
GPC	composto glicerofosfatado
GUV	vesícula unilamelar gigante
HC	Health Canada

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfônico
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HSPC	fosfatidilcolina de soja hidrogenada
HDL	lipoproteína de alta densidade
LCL	lipossomos de circulação prolongada
LPL	lisofosfolípide
LUVs	vesículas unilamelares grandes
MLVs	vesículas multilamelares
µm	micrômetro
mV	milivolts
MVLs	vesículas multivesiculares
MPEG-DPPE	metoxipolietilenoglicol -1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamina
MPEG-DSPE	metoxipolietilenoglicol - 1,2-distearoil-fosfatidiletanolamina
MSPC	1-miristoil-2-stearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
MVVs	vesículas multivesiculares
N/A	não se aplica
nm	nanômetro
OLVs	vesículas oligolamelares
PC	fosfatidilcolina
PDT	terapia fotodinâmica
PE	fosfatidiletanolamina
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RES	sistema reticuloendotelial
RNA	ácido ribonucleico
SPC	fosfatidilcolina de soja
SUVs	vesículas unilamelares pequenas
TBA	ácido tiobarbitúrico
TGA	Therapeutic Goods Administration
T _m	temperatura de transição de fase
UV	ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	A nanotecnologia na área farmacêutica.....	17
1.2	Um foco nos medicamentos lipossomais injetáveis.....	19
1.3	Lipossomos.....	20
1.3.1	Características.....	20
1.3.2	Classificação.....	21
1.3.3	Lipossomos como carreadores de fármacos.....	21
1.3.4	Composição.....	23
1.3.5	Produção.....	28
1.3.6	Controle de Qualidade e Atributos de Qualidade.....	29
1.3.7	Desafios tecnológicos.....	30
1.3.8	Mercado farmacêutico.....	31
1.3.9	Aspectos regulatórios	36
1.3.9.1	A regulação de medicamentos no Brasil.....	36
1.3.9.2	Regulação de medicamentos lipossomais.....	37
1.3.10	Desafios regulatórios.....	40
2	OBJETIVO.....	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3	ABRANGÊNCIA.....	42
4	METODOLOGIA.....	42
5	FATORES QUE AFETAM A EFICÁCIA DE MEDICAMENTOS	
	LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS.....	43
5.1	Estabilidade plasmática.....	46
5.2	Tempo de circulação.....	47
5.3	Eficiência de direcionamento do carreador.....	50
5.4	Perfil de liberação do fármaco.....	53
5.5	Permeabilidade da bicamada.....	54
5.6	Lamellaridade.....	55
5.7	Ambiente intralipossomal.....	55
5.8	Comportamento da bicamada (sensibilidade a estímulo).....	58
5.8.1	Termosensíveis.....	58

5.8.2	Sensíveis ao pH.....	58
5.8.3	Sensíveis a ultrassom.....	59
5.8.4	Sensíveis a luz.....	61
5.8.5	Sensíveis à ação de enzimas.....	61
5.9	Interação com a superfície celular.....	62
5.10	Quantidade de fármaco encapsulado.....	64
6	FATORES QUE AFETAM A TOXICIDADE DE MEDICAMENTOS LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS.....	64
6.1	Embolismo.....	65
6.2	Reações dérmicas/mucosites.....	65
6.3	Hipersensibilidade.....	67
6.4	Acúmulo de fármaco e outros efeitos indesejados em órgãos não alvo.....	68
6.5	Alta concentração da droga livre no plasma.....	69
6.6	Alterações celulares (hemólise, agregação celular, etc).....	69
7	FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS.....	70
7.1	Agregação/floculação.....	72
7.1.1	Por que ocorre.....	72
7.1.2	Consequências.....	73
7.1.3	Como detectar.....	74
7.1.4	Como evitar.....	74
7.2	Coalescência/Fusão.....	76
7.2.1	Porque ocorre.....	76
7.2.2	Consequências.....	77
7.2.3	Como detectar.....	77
7.2.4	Como evitar.....	77
7.3	Degradação.....	78
7.3.1	Hidrólise lipídica.....	78
7.3.1.1	Porque ocorre.....	78
7.3.1.2	Consequências.....	79
7.3.1.3	Como detectar.....	79
7.3.1.4	Como evitar.....	80
7.3.2	Oxidação.....	80
7.3.2.1	Porque ocorre.....	80

7.3.2.2	Consequências.....	81
7.3.2.3	Como detectar.....	81
7.3.2.4	Como evitar.....	84
7.4	Liberação precoce do fármaco.....	85
7.4.1	Alta taxa de difusão do fármaco.....	85
7.4.1.1	Porque ocorre.....	85
7.4.1.2	Consequências.....	87
7.4.1.3	Como detectar.....	87
7.4.1.4	Como evitar.....	89
8	ANÁLISE DOS DIAGRAMAS DE ISHIKAWA.....	90
9	ANÁLISE DOS PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E CARGA ELÉTRICA SUPERFICIAL.....	94
9.1	Métodos para determinação de tamanho de partícula.....	94
9.2	Métodos para avaliação de carga elétrica superficial.....	101
10	ANÁLISE CRÍTICA PARA FINS REGULATÓRIOS.....	103
10.1	Os excipientes lipossomais.....	103
10.2	Os paradoxos.....	104
10.3	Caracterização da formulação lipossomal.....	105
10.4	Controle de qualidade do produto acabado.....	114
10.5	Principais métodos utilizados para avaliar distribuição de tamanho e carga elétrica superficial.....	115
10.5.1	Determinação de tamanho de partículas.....	115
10.5.2	Determinação da carga elétrica superficial.....	116
10.6	Especificações.....	117
10.7	Estabilidade.....	117
10.7.1	Oxidação e hidrólise.....	119
10.8	Processo produtivo.....	119
10.8.1	Etapas críticas.....	120
10.8.2	Parâmetros operacionais.....	120
10.8.3	Embalagem.....	122
10.9	Armazenamento e Transporte.....	122
10.10	Validações.....	122
10.11	Mudanças.....	123
10.12	Interface com estabelecimentos de saúde.....	123

10.13 Paralelo entre o conteúdo do presente trabalho e dos documentos publicados pelo FDA e EMA.....	124
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
12 CONCLUSÃO.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXO 1.....	155
ANEXO 2.....	156

1. INTRODUÇÃO

1.1 A nanotecnologia na área farmacêutica

Avanços recentes nas ciências químicas têm resultado no desenvolvimento e síntese de centenas de novas drogas com atividade potencial contra um vasto número de alvos terapêuticos *in vitro*. No entanto, muitas dessas drogas não conseguem atingir o seu potencial na clínica, por causa de toxicidade ou de baixa biodisponibilidade ou solubilidade. Por exemplo, apesar de haver inúmeros agentes antitumorais que são altamente tóxicos para células tumorais *in vitro*, a falta de seletividade desse efeito *in vivo* prejudica seu uso na clínica por apresentarem os efeitos tóxicos também em células normais. Muitos fármacos são rapidamente degradados ou eliminados do organismo. Além disso, muitas moléculas sintetizadas têm solubilidade limitada, o que dificulta sua formulação como medicamento além de prejudicarem sua biodisponibilidade, frequentemente abaixo do limiar terapêutico (BORMAN, 1998). Assim, para utilizar o potencial desses agentes terapêuticos, é vital que sejam concebidas técnicas para aumentar sua biodisponibilidade, bem como para otimizar seu potencial terapêutico e minimizar os efeitos indesejados. Dessa forma, há necessidade de sistemas de entrega de fármacos que não apenas atuem como auxiliares na formulação, mas que alterem a biodistribuição de drogas de forma que sua maior fração atinja o tecido alvo (FERRARI, 2005; DE JONG; BORM, 2008).

A nanotecnologia possui grande potencial para trazer benefícios a várias aplicações industriais e tecnológicas. Essas aplicações são baseadas em materiais novos ou convencionais, intencionalmente desenvolvidos para serem nanoestruturados, denominados nanomateriais. Esse termo é frequentemente utilizado para materiais com dimensões entre 1nm e 100nm. No entanto, esse limite superior de 100nm não engloba todos os materiais com propriedades nanométricas genuínas. Muitos podem apresentar tamanhos de partícula bem maiores que 100nm, tal como alguns tipos de lipossomos. Portanto, principalmente para fins regulatórios, o intervalo de tamanho de partícula a ser considerado deve ser mais abrangente (LÖVESTAM, G. et al, 2010).

A nanotecnologia tem atraído investimentos crescentes do setor público e privado em diversas partes do mundo (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007). Com base no crescimento global do mercado em 2011, uma organização de pesquisa de mercado previu que globalmente, as vendas de nanomedicamentos aumentaria de US\$ 50,1 bilhões em 2011 para US\$ 96,9 bilhões em 2016, com uma taxa de crescimento anual de 14,1%. Hoje mais de 60 países possuem iniciativas nacionais ligadas ao estudo das nanociências e nanotecnologia (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI, 2010).

A nanotecnologia tem um valor inestimável para aplicações médicas e industriais, mas também tem trazido novos desafios do ponto de vista regulatório e quanto à segurança do seu uso (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

Um dos aspectos mais relevantes dessa tecnologia é que na escala nanométrica muitas propriedades fundamentais como as químicas, físicas, biológicas e mecânicas dos materiais mudam radicalmente (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014). Essas novas propriedades implicam também em novas interações com as entidades biológicas, resultando nos efeitos desejados e pretendidos com o uso dessa tecnologia mas também em efeitos indesejados ou não pretendidos (CARUTHERS; WICKLINE; LANZA, 2007).

A nanometrologia, que é a ciência que estuda as medições realizadas na escala nanométrica, é vital para caracterizar os nanomateriais quanto ao tamanho, forma e propriedades físicas e químicas. São necessários testes rigorosos e eficientes, com alto grau de precisão e confiabilidade para avaliar os sistemas nanoparticulados, especialmente os utilizados como carreadores de fármaco. A avaliação dos riscos envolvidos na utilização desses materiais, depende em grande parte do uso de métodos com aplicação e sensibilidade apropriadas (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

Em geral, o grande desafio da nanotecnologia, e em particular dos nanomedicamentos, é entender quais características nanoespecíficas interagem com qual sistema ou função biológica a fim de otimizar o potencial terapêutico e minimizar os efeitos indesejados (HOET et al., 2009).

Na área farmacêutica a nanotecnologia tem sido muito utilizada como ferramenta para manipular a farmacocinética de princípios ativos através do desenvolvimento de nanossistemas de entrega de fármacos. A vantagem da nanotecnologia é que os nanoterápicos podem apresentar uma taxa de absorção aumentada por via oral ou tópica, ser direcionados para o tecido ou célula alvo e/ou serem liberados no compartimento celular específico como o citoplasma ou núcleo. Exemplos desses sistemas de entrega de fármacos são os sistemas lipídicos coloidais (lipossomos, nanoemulsões, nanosuspensões, micelas mistas e nanopartículas lipídicas sólidas), sistemas nanoparticulados poliméricos (baseados no uso de hidrogéis, dendrímeros, carbonato de cálcio, protamina, quitosana, membrana de nanoporos de silicone, polissacarídeos), nanoesferas (de ouro, prata, sílica, poliestireno, melamina, alumina), nanocristais e nanotubos de carbono (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

1.2 Um foco nos medicamentos lipossomais injetáveis

Como se vê, a aplicação da nanotecnologia na área farmacêutica envolve o uso de vários sistemas nanoparticulados, e cada um deles possui especificidades que demandam um tratamento individual para fins de análise de riscos.

É importante ressaltar que os produtos baseados em nanotecnologia estão sendo comercializados em todo o mundo, mesmo antes de se ter legislações específicas para sistemas contendo nanoestruturas (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI, 2010).

Diferentes estratégias nanotecnológicas têm sido testadas e estudadas na área farmacêutica, mas dentre os diferentes tipos de carreadores de fármacos, os lipossomos tem recebido maior atenção. Por mais de três décadas os lipossomos tem sido reconhecidos como os carreadores de fármacos de escolha para inúmeras aplicações práticas principalmente por apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta versatilidade na sua composição, morfologia e características fisicoquímicas (LASIC ; PAPAHAADJOPOULOS, 1998).

Já existem muitos medicamentos lipossomais comercializados mundialmente, a maioria deles de uso injetável, como veremos no item 1.3.8. Há também vários produtos em fase de testes clínicos (CLINICALTRIALS.GOV, 2015a, 2015b, 2015c) e as pesquisas em torno dos medicamentos lipossomais são crescentes com inúmeros trabalhos publicados. Do ponto de vista regulatório, foram publicados pela U. S. Food and Drug Administration (U.S. FDA) alguns guias ainda em rascunho contendo tanto recomendações gerais de produção e controle de qualidade de produtos lipossomais (U.S. FDA, 2002) quanto recomendações produto-específicas para medicamentos candidatos a genéricos (U.S. FDA, 2014b, 2014c, 2014d, 2014e). A European Medicines Agency (EMA) publicou um documento de reflexão com objetivo de embasar a concessão de registro de produtos lipossomais intravenosos desenvolvidos com referência a um produto inovador (EMA, 2013). No entanto, ainda não foi realizada uma análise sistemática dos fatores que influenciam a eficácia, toxicidade e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis a fim de se identificar os itens relevantes do ponto de vista regulatório, principalmente no que se refere à sua caracterização, controle de qualidade e estabilidade.

1.3 Lipossomos

1.3.1 Características

Os lipossomos são partículas coloidais compostas de moléculas lipídicas anfifílicas, que formam espontaneamente vesículas que encapsulam parte da fase aquosa em que estão dispersos. As moléculas lipídicas se arranjam em uma ou mais camadas, denominadas lamelas, expondo seus grupos “cabeça” polar para a fase aquosa. Os grupos da “cauda” hidrofóbica se agrupam na bicamada (LASIC; PAPAHAJDOPOULOS, 1998).

A **figura 1** traz a representação esquemática de um lipossomo. Sua estrutura é similar à da membrana das células, e por isso também pode ser usado como modelo lipídico de membrana para estudar as interações entre os lípides da membrana e biomoléculas (como DNA e proteínas), permeabilidade de íons e fármacos (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; ANGELOVA; TSONEVA, 1999). Por serem estruturas muito versáteis, os lipossomos são utilizados tanto na pesquisa básica quanto para fins terapêuticos e aplicações analíticas, como a imobilização de lipossomos em colunas de cromatografia líquida ou a conjugação de antígenos ou anticorpos a lipossomos para a realização de imunoenaios (JESORKA, 2008).

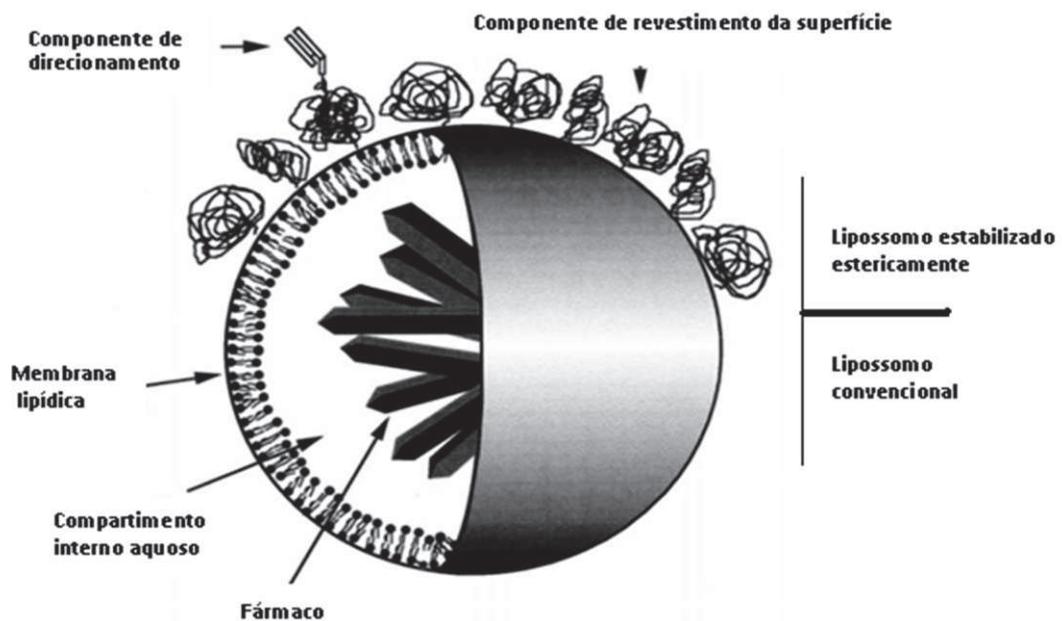


Figura 1 – Representação esquemática de um lipossomo. Fonte: DRUMMOND et al, 1999.

1.3.2 Classificação

Com base em sua lamelaridade e tamanho, os lipossomos são classificados em vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares grandes (LUVs), vesículas oligolamelares (OLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs), vesículas unilamelares gigantes (GUVs) e vesículas multivesiculares (MVV). (LASIC; PAPAHADJOPOULOS, 1998; WU; ZHAO; LEE, 2007). Em termos de sua composição e mecanismo de entrega de fármacos, os lipossomos podem ser classificados em cinco tipos: lipossomos convencionais, estímulo-sensíveis, catiônicos, imunolipossomos ou com direcionamento ativo e de circulação prolongada.

Além destes, também existem nanovesículas conhecidas como virossomos e arqueossomos (SCHWENDENER, 2014). Os primeiros contêm componentes de membranas virais como proteínas e lípidos de forma que a superfície lipossomal se assemelha à de um vírus. Dessa forma, são muito utilizados como vacinas ou adjuvantes e, considerando a possibilidade de manter as propriedades fusogênicas do vírus em questão, também podem ser usados para entrega de material genético ou outras moléculas no interior da célula (BHATTACHARYA; MAZUMDER, 2011; MOSER et al., 2013). Os arqueossomos contêm glicerolípidos provenientes da membrana de microorganismos do reino *Arquea*, semelhantes às bactérias, mas ainda é bastante incipiente seu uso como carreadores de fármacos (NAPOTNIK et al, 2013).

1.3.3 Lipossomos como carreadores de fármacos

Desde a década de 1970 tem havido um interesse crescente no uso de lipossomos como sistemas de entrega de fármacos e macromoléculas, sendo que estes têm sido extensivamente investigados para o direcionamento, liberação controlada e aumento da solubilidade de fármacos (YADAV et al., 2011).

Fármacos hidrofílicos podem ser encapsulados no compartimento interno aquoso das vesículas ou conjugados na sua superfície, enquanto compostos hidrofóbicos podem ser incorporados na bicamada (SHARMA, A.; SHARMA, U. S, 1997). Os lipossomos podem encapsular ou ligar diferentes classes de substâncias, dentre elas fármacos convencionais como antibacterianos, antivirais, antitumorais, hormônios e enzimas; moléculas imunoestimulatórias e fármacos genéticos como ácido desoxirribonucléico (DNA) plasmidial (JULIANO; STAMP, 1979; FENSKE; CULLIS, 2008).

As principais razões para encapsular um fármaco em lipossomos são (PRESANT et al., 1993):

- O fármaco livre é altamente tóxico e a encapsulação reduz os efeitos adversos aos tecidos normais;
- O fármaco livre é pouco solúvel ou insolúvel impedindo dissolução imediata e por isso não apresenta efeitos farmacológicos, uma vez que a biodisponibilidade fica comprometida;
- Os lipossomos liberam lentamente o fármaco resultando em um efeito farmacológico análogo a uma infusão contínua;
- Os lipossomos aumentam a permeação ou penetração cutânea do fármaco;
- Os lipossomos direcionam o fármaco encapsulado para um tecido alvo.
- Os sistemas lipossomais permitem a proteção do fármaco contra degradação química e biológica relacionada à via de administração do medicamento (PRESANT et al., 1993).

Como se vê, um dos principais objetivos do uso de lipossomos como carreadores de fármacos é atingir uma maior concentração do fármaco no tecido alvo, tal como um tumor ou sítio de inflamação e evitar sua distribuição para células e tecidos normais.

O interesse no uso de lipossomos também se deve à possibilidade de manipular sua superfície, tanto através da escolha de diferentes lípidos que podem ser usados em sua composição, quanto através de modificações químicas, pela incorporação de moléculas que afetam a interação dos lipossomos com potenciais locais alvo e com as demais células e proteínas plasmáticas, como o polietilenoglicol (PEG) (JONES, 1995).

Ao longo dos anos as potencialidades dos lipossomos vem sendo bastante exploradas em pesquisas na área farmacêutica, tornando a estrutura das vesículas cada vez mais complexa e multifuncional. A **figura 2** traz uma representação esquemática da evolução dos lipossomos.

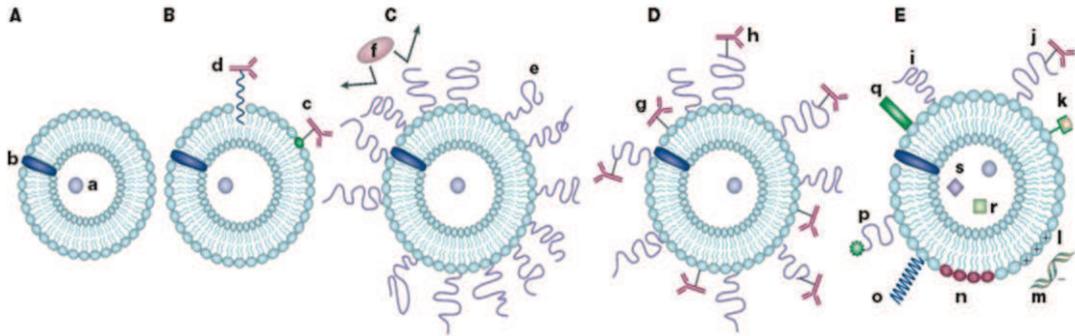


Figura 2 – Evolução dos lipossomos. A – lipossomos convencionais incorporando fármaco hidrofílico no compartimento aquoso (a) e fármaco lipossolúvel na bicamada lipídica (b). B – Imunolipossomo com anticorpo covalentemente acoplado aos fosfolípides da membrana (c) ou ancorados hidrofobicamente à membrana (d). C – lipossomos de circulação prolongada ou furtivos (*stealth*) revestidos com polímero como o PEG (e) que protegem a superfície lipossomal de interações com as opsoninas (f). D – Imunolipossomo de circulação prolongada carregando simultaneamente um polímero protetor e um anticorpo (g, h). E – lipossomos de nova geração cuja superfície pode ser modificada de várias formas. Além das já mencionadas, (i, j, pode ser incorporado marcador diagnóstico (k), lípides carregados positivamente (l), permitindo complexação com moléculas tais como o DNA (m), lípides (n) ou polímeros (o) sensíveis a estímulos, peptídeos penetrantes nas células (p), componentes virais (q), partículas magnéticas (r) e partículas coloidais de ouro ou prata por exemplo (s). Fonte: TORCHILIN, 2005.

1.3.4 Composição

Os lipossomos são compostos de lípidos naturais isolados de fontes animais ou vegetais, ou sintéticos. A bicamada lipídica pode conter outros componentes como colesterol e lípidos conjugados com polímeros hidrofílicos como o PEG (**figura 3**). A permeabilidade da bicamada é regulada pela sua transição de fase (fase gel para líquido-cristalina) que ocorre em determinada temperatura (T_m). Abaixo da T_m a bicamada existe na fase gel, com permeabilidade reduzida e os lípidos altamente empacotados conferindo maior estabilidade. Acima da T_m a bicamada encontra-se na fase líquido-cristalina, mais fluida e dinâmica. Os lípidos com cadeia acila longa e saturada são os mais comumente usados devido a sua alta temperatura de transição de fase (NEW, 1995).



Figura 3 – Composição típica dos lipossomos. Fonte: TORCHILIN, 2005.

A fosfatidilcolina (ou seus derivados) é o principal excipiente lipídico de vários produtos lipossomais disponíveis comercialmente devido à sua característica não tóxica, biodegradável, neutralidade de carga, inércia química e similaridade com os fosfolípidos das membranas biológicas (**figura 3**). Entre os 14 medicamentos lipossomais injetáveis comercializados atualmente nos mercados brasileiro, europeu e norte-americano, 13 utilizam algum componente derivado da fosfatidilcolina (**quadro 1**). A fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, pode ser obtida de fontes sintéticas ou naturais (gema de ovo e grãos de soja) (GARIDEL; LASCH, 2007). O uso de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) ou fosfatidilcolina sintética de longa cadeia acila saturada (como disteoilfosfatidilcolina - DSPC) e a presença de uma quantidade apropriada de colesterol na membrana lipossomal proporcionam um melhor empacotamento da bicamada, minimizando defeitos de organização e a descontinuidade da membrana (BARENHOLZ, 2001).

O colesterol tem um papel reconhecidamente benéfico na formulação lipossomal e está presente na maioria dos medicamentos lipossomais comercializados. Conforme consta no **quadro 1**, quase 60% dos medicamentos atualmente comercializados nos mercados brasileiro, europeu e norte-americano possui colesterol na formulação. Em concentrações adequadas (acima de 30%), aumenta a estabilidade e reduz a permeabilidade da bicamada em temperaturas acima da T_m (GREGORIADIS; DAVIS, 1979; LIAN; HO, 2001).

Um efeito similar do colesterol pode ser observado também com outros fosfolípidos como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) e esfingomiélna (SENIOR; GREGORIADIS, 1982). Essa inclusão do colesterol na bicamada lipossomal resulta em um aumento do empacotamento das moléculas de fosfolípidos, provavelmente como resultado

da acomodação do colesterol nas cavidades moleculares formadas pelos monômeros dos lípidos contidos nas vesículas, aumentando as interações de Van der Waals entre moléculas de lípidos adjacentes (KIRBY; CLARKE; GREGORIADIS, 1980; BARENHOLZ, 2001). Essa ação de preenchimento combinada com a habilidade do colesterol em complexar com os fosfolípidos reduz a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas hidrofílicas e contribui com uma maior estabilidade da membrana lipossomal frente a peroxidação, hidrólise e ação de lipoproteínas plasmáticas (PAPAHADJOPOULOS et al., 1973).

Conforme se pode verificar no **quadro 1**, dos 14 medicamentos comercializados, quase a metade trata-se de lipossomos convencionais. Os demais possuem alguma funcionalidade sendo que dentre esses, 37,5% tratam-se de lipossomos Stealth. Também nota-se que a tecnologia de produção por gradiente de pH é expressiva, estando presente em quase 30% das formulações comercializadas. Quanto aos produtos ainda em fase de testes clínicos, além dos lipossomos Stealth observa-se o surgimento de formulações com novas funcionalidades como lipossomos termosensíveis e com direcionamento ativo.

Quadro 1- Composição dos Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na Anvisa, FDA e EMA e de alguns* potencialmente comercializáveis em fase de testes clínicos.

Produto	Composição lipídica	Tipo de lipossomo	Referência
Abelcet	DMPC, DMPG	Convencional	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
Ambisome	HSPC, CHOL, DSPG	Convencional	SITE FDA http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Search_Drug_Name
Caelyx/ Doxil	HSPC, CHOL, MPEG-DSPE	Furtivo (com gradiente de pH)	SITE FDA http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Search_Drug_Name
Dauno xome	DSPC, CHOL	Convencional	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
Definity	DPPA, DPPC MPEG-DPPE	Furtivo	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiv eid=9136
DepoCyt	CHOL, DOPC, DPPG, Trioleína	Depofoam (MVL)	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
DepoDur	DOPC, CHOL, DPPG, Trioleína	Depofoam (MVL)	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
Epaxal	Lecitina Cefalina	Virosomo	http://drug.fda.moph.go.th/zone_search/files/1C_91_50_NC_Epaxal.pdf
Inflexal V	Lecitina	Virosomo	http://drug.fda.moph.go.th/zone_search/files/2C_27_51_NC_Inflexal%20V.pdf
LEP-ETU*	DOPC, CHOL, Cardioliipina	Convencional	SLINGERLAND, 2013

Quadro 1- Composição dos Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na Anvisa, FDA e EMA e de alguns* potencialmente comercializáveis em fase de testes clínicos (**conclusão**)

Produto	Composição lipídica	Tipo de lipossomo	Referência
Lipodox	HSPC, CHOL DSPE-PEG	Furtivo (com gradiente de pH)	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
Lipoplatin*	DPPG, SPC, CHOL DSPE-MPEG	Furtivo	http://lipoplatin.com/info_sop.php
Marqibo	CHOL Esfingomielina	Convencional (com gradiente de pH)	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm
MBP-426*	DSPC, CHOL, DSPE-PEG	Endereçado	SUZUKI et al., 2008
Mepact	POPC OOPS	Convencional	http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000802/WC500026565.pdf
Myocet	PC CHOL	Convencional (com gradiente de pH)	http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000297/WC500031811.pdf
Thermo dox*	DPPC, MSPC DSPE-PEG	Termosensível	http://omicsonline.org/scientific-reports/2155-983X-SR195.pdf
Visudyne	EPG; DMPC	PDT (luz visível)	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm

CHOL: colesterol; DPPA, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato; DPPC 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; DPPG: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol; DSPC: 1,2-Distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; DSPE-PEG: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[amino (polietilenoglicol)]; DSPG: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol; EPG: fosfatidilglicerol de ovo; HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada; MPEG-DPPE: metoxipolietilenoglicol - 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina; MPEG-DSPE: metoxipolietilenoglicol - 1,2-distearoil-fosfatidiletanolamina; MSPC: 1-miristoil-2-stearyl-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; POPC: 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; SPC: fosfatidilcolina de soja

1.3.5 Produção

Em geral, os processos para obtenção dos lipossomos podem ser divididos em 4 etapas: dissolução do material lipídico em solvente orgânico apropriado; remoção do solvente orgânico geralmente com formação de filme ou pó lipídico; hidratação da fase lipídica com a formação das vesículas; redução e calibração do tamanho das vesículas (WU; ZHAO; LEE, 2007).

Em escala industrial, os métodos mais usados para redução do tamanho das vesículas são extrusão com filtros de grande área superficial e homogeneização em alta pressão. Para purificação, ou separação do material encapsulado do não encapsulado, em escala industrial utiliza-se mais comumente diafiltração tangencial (WAGNER; VORAUER-UHL, 2011).

Os métodos para encapsulamento do fármaco variam conforme suas propriedades. Para polieletrólitos como o DNA, o encapsulamento pode ser alcançado pela complexação eletrostática com lipossomos catiônicos, dando origem aos chamados lipoplexos (BARALDO et al., 2002). Drogas lipofílicas podem ser co-dissolvidas com os lípides durante a preparação dos lipossomos. Drogas hidrofílicas podem ser dissolvidas no meio aquoso e passivamente encapsuladas durante a formação dos lipossomos ou incorporadas através de procedimento de encapsulamento remoto direcionado por gradiente eletroquímico transmembrana. Essa técnica de encapsulamento remoto envolve a exposição das moléculas do fármaco (bases ou ácidos fracos) a lipossomos pré-formados que possuem um gradiente transmembrana de pH, responsável pelo encapsulamento “ativo” do fármaco. A redistribuição da droga entre os compartimentos intralipossomal e extralipossomal ocorre de tal forma que moléculas não carregadas se difundem para dentro da vesícula tornando-se carregadas e assim acumulando no seu interior devido à baixa permeabilidade (CULLIS et al., 1997).

Alterando-se a composição ou método de preparo, as propriedades intrínsecas dos lipossomos (morfologia, estrutura e funcionalidade) são modificadas podendo levar a diferentes comportamentos *in vitro* e *in vivo*.

As características físico-químicas dos lipossomos governam o desempenho da formulação e a forma como o medicamento será biodistribuído, determinando sua interação com componentes celulares e outros tecidos após administração sistêmica. A natureza e extensão dessas interações por sua vez, determinam a forma de entrega dos fármacos (SHARMA, A.; SHARMA, U. S, 1997).

1.3.6 Controle de Qualidade e Atributos de Qualidade

A qualidade de um medicamento é definida como sua adequabilidade para o uso pretendido, o que envolve atributos como identidade, teor (ou potência) e pureza (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE-ICH, 1999).

O controle de qualidade de dispersões lipossomais é complicado devido à natureza supramolecular do sistema a ser analisado. Além disso, muitos testes requerem dissolução, solubilização ou extração dos componentes lipossomais de forma a permitir a análise e quantificação de cada componente (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003). Até o momento, apesar das particularidades dos produtos lipossomais, não existem testes farmacopeicos específicos para avaliar a qualidade dessa classe de produtos.

O desempenho farmacológico de uma formulação lipossomal depende criticamente das suas características físico-químicas. Pequenas mudanças em alguma dessas características pode ter um enorme impacto no comportamento *in vivo* do produto. Assim, a caracterização físico-química da formulação lipossomal é de extrema importância. A construção da qualidade de um produto inclui o controle de qualidade das matérias-primas a serem usadas na produção, controles em processo a fim de detectar as variações lote a lote ou algum problema que possa afetar a qualidade do produto e o controle de qualidade do produto final (GRIT; CROMMELIN, 1993a).

Como não existem metodologias farmacopeicas para controlar a qualidade dos produtos lipossomais, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que deve ser feito em paralelo ao desenvolvimento desses sistemas de liberação. Os métodos analíticos devem abordar os seguintes aspectos: a especificidade dos lipossomos ao alvo de interesse; a liberação do fármaco das vesículas lipossomais; a quantificação tanto do fármaco livre quanto do fármaco encapsulado; a caracterização eficiente dos lipossomos incluindo tamanho, lamelaridade e uniformidade (GOMEZ-HENS; FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

Os produtos lipossomais, assim como os demais medicamentos que estão no mercado, devem possuir atributos de qualidade específicos para que seu desempenho como agente terapêutico seja satisfatório. A definição dos atributos de qualidade do produto que impactam sua qualidade, eficácia e segurança, é um ponto crucial para identificar parâmetros de processo críticos e estratégias de controle que deverão ser implementadas pelo fabricante a fim de garantir a qualidade do produto final. A concepção de um medicamento passa primeiro pela definição das características necessárias para que o efeito terapêutico seja alcançado. Tais características, ou atributos de qualidade, estão

diretamente ou indiretamente relacionados aos efeitos terapêuticos ou adversos exercidos pelo medicamento (ICH, 2009).

Esses atributos, definidos como atributos críticos de qualidade, se referem a propriedades ou características que devem estar dentro de um limite apropriado ou de um intervalo para garantir a qualidade desejada para o produto. Os atributos de qualidade críticos geralmente estão associados com o fármaco, excipientes, materiais intermediários do processo e o produto final (ICH, 2009). A estabilidade dos lipossomos também é um atributo crítico de qualidade dessa classe de produtos (XU; BURGESS; KHAN, 2012a). A lista de atributos críticos de qualidade potenciais pode ser modificada conforme a escolha da formulação e do processo de produção do medicamento lipossomal, assim como à medida que o conhecimento sobre o produto e o processo aumentam (ICH, 2009). A definição e avaliação desses atributos é um desafio tanto para o fabricante quanto para as autoridades regulatórias.

É preciso que toda a cadeia produtiva, desde a aquisição dos materiais e matérias-primas a serem utilizados, as etapas produtivas, os controles tanto de parâmetros operacionais como do produto durante o processo, sejam estabelecidos e monitorados de tal forma a garantir que as especificações estabelecidas para os atributos de qualidade do produto sejam alcançadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Anvisa, 2010). Ou seja, de forma sintética pode-se dizer que os atributos de qualidade de um produto estão envolvidos no início e no fim desse processo e devem ser mantidos dentro das especificações durante toda a vida útil do medicamento.

Essa breve análise nos permite concluir que a identificação dos atributos de qualidade de um produto é crucial tanto para a definição de estratégias de controle quanto para conduzir e balizar o processo produtivo. Para definir ou avaliar a adequação de um processo de fabricação de medicamentos, é preciso conhecer previamente os fundamentos desse processo. Para a empresa fabricante esse conhecimento é vital para estabelecer parâmetros operacionais, especificações, formas de monitoramento, bem como identificar limitações do processo. Para as autoridades regulatórias, esse conhecimento é a base para a avaliação do registro sanitário ou inspeção para verificar o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (U.S. FDA, 2004a).

1.3.7 Desafios tecnológicos

Um dos desafios no desenvolvimento de medicamentos lipossomais é a obtenção de lipossomos que sejam estáveis na formulação e na circulação sanguínea mas que sejam capazes de se desestabilizar e liberar o fármaco especificamente no local de ação (DRUMMOND et al., 1999).

Idealmente, a formulação lipossomal precisa ter: 1) uma razão droga: lípide alta a fim de reduzir a carga lipídica desnecessária ao paciente; 2) uma taxa de encapsulamento relativamente alta para diminuir a quantidade de fármaco livre e o custo de produção; 3) um período de vida útil razoavelmente longo; 4) um processo de produção escalonável. Apesar das intensas pesquisas na área de produtos farmacêuticos lipossomais, ainda há um envolvimento relativamente baixo das indústrias farmacêuticas com a produção dessa classe de produtos, provavelmente por causa das dificuldades tecnológicas encontradas nessa área (LASIC; PAPAHADJOPOULOS,1998). Alguns dos problemas encontrados na produção dos lipossomos são relacionados à estabilidade durante a armazenagem ou no meio biológico, à reprodutibilidade lote a lote, ao processo de esterilização, ao escalonamento do processo e à baixa taxa de encapsulamento (SHARMA, A.; SHARMA, U. S, 1997).

Como o foco da academia nas pesquisas é diferente da indústria farmacêutica, ainda há problemas na implementação de etapas produtivas que sejam reprodutíveis e que possam ser escalonadas e realizadas sob as Boas Práticas de Fabricação, assim como ainda falta a padronização de ensaios de controle de qualidade adequados para essa classe de produtos (LASIC; PAPAHADJOPOULOS,1998).

1.3.8 Mercado farmacêutico

No **quadro 2** constam os produtos lipossomais injetáveis atualmente registrados no mercado brasileiro, norte-americano e europeu, bem como alguns produtos em fase de testes clínicos. Atualmente são comercializados quatorze medicamentos lipossomais injetáveis, sendo que dentre estes quatro são registrados no Brasil, nove nos Estados Unidos da América (EUA) e sete na Europa (via procedimento centralizado, onde o registro do produto é válido em todos os Estados membro da União Européia, ou descentralizado, onde o registro é válido em Estados membro específicos da União Européia). Um desses medicamentos (Lipodox) não possui registro sanitário mas sua comercialização foi autorizada nos EUA por problemas de fornecimento do Doxil (vide observação no **quadro 2**). Considerando os medicamentos comercializados, em 11 deles os lipossomos encontram-se em dispersão aquosa e somente em 3 como pós liofilizados. A principal via de administração é a intravenosa, sendo que somente 4 medicamentos comercializados não são administrados por essa via.

A primeira formulação lipossomal, o Ambisome, foi introduzida no mercado em 1990. No Brasil esse medicamento foi aprovado em 1997. Ambisome é um antifúngico cujo princípio ativo é a Anfotericina B. As drogas antifúngicas são usualmente mais tóxicas que outros tipos de antibióticos porque o patógeno e as células humanas são eucarióticas e têm

alta similaridade. Dessa forma, a anfotericina B pode causar efeitos adversos mais severos aos pacientes que outras classes de antibióticos. Quando os lipossomos são utilizados na formulação, a toxicidade da anfotericina B diminui, permitindo a administração de doses maiores e redução do número de doses e da duração do tratamento. Em alguns casos, a anfotericina B lipossomal é indicada para pacientes nos quais terapias convencionais falharam, naqueles que apresentaram intolerância à formulação convencional ou em casos de nefrotoxicidade pré-existente ou induzida pela anfotericina (MEHTA, 1997; LASIC; PAPAHAADJOPOULOS,1998; ADLER- MOORE; PROFFITT, 2002; LI, 2006).

O Doxil foi um dos primeiros produtos farmacêuticos lipossomais, aprovado pela FDA em 1995, trata-se de uma formulação de doxorubicina encapsulada em lipossomos com revestimento polimérico (PEG) capaz de aumentar o tempo de circulação dos lipossomos na corrente sanguínea . A doxorubicina é um agente antineoplásico com uso clínico aprovado por mais de 30 anos. No entanto, seus efeitos colaterais incluem cardiomiopatia, náusea, vômito e supressão da medula óssea limitam o número de pacientes que são capazes de tolerar o tratamento. Dessa forma, a formulação lipossomal de doxorubicina é capaz de reduzir tais efeitos e assim melhorar o índice terapêutico do fármaco (LASIC; PAPAHAADJOPOULOS,1998). Os lipossomos peguillados, além de diminuir os efeitos adversos ao paciente, aumentam o tempo de circulação dos lipossomos, o que resulta em aumento da sua eficácia (LI, 2006).

O Depocyt e Depopur utilizam uma tecnologia mais recente, de lipossomos multivesiculares (MVLs). Os MVLs, diferentemente dos lipossomos multilamelares (MLVs), contém bicamadas lipídicas não concêntricas, sendo compostos de centenas de compartimentos aquosos poliédricos separados por septos de bicamada lipídica que se assemelham à arquitetura de bolhas de sabão agregadas. O tamanho médio dessa estrutura é de 10-20µm. A tecnologia de produção de MVLs é patenteada e referida como DepoFoam (ANGST; DROVER, 2006).

Atualmente está em fase de estudo clínico (fase III) o produto Thermodox, cujo princípio ativo também é a doxorubicina. Neste caso os lipossomos são termosensíveis, liberando o fármaco em tecidos onde a temperatura encontra-se elevada. Essa liberação é conseguida através de uma mudança na estrutura dos lipossomos em temperaturas corporais elevadas, passando da fase gel para líquido-cristalina. Essa mudança torna os lipossomos mais permeáveis, liberando o fármaco (CHANG; YEH, 2012).

A maioria dos medicamentos lipossomais registrados são aprovados para aplicação intravenosa. Somente o Epaxal e Inflexal são para uso intramuscular e o DepoCyt e DepoDur são para injeção intratecal e epidural respectivamente. O uso oral tem sido bastante pesquisado, mas essa via de administração ainda é bastante problemática devido à ação dos sais biliares, que desestabilizam os lipossomos (CHANG; YEH, 2012).

Quadro 2 - Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na ANVISA, FDA e EMA e alguns em fase de testes clínicos.

PRODUTO	Princípio ativo/ Classe terapêutica	Forma farmacêutica	Fabricantes para Brasil e EUA¹	Registros do produto (ANVISA, FDA, EMA)
Abelcet ^{2,3}	Anfotericina B (Antifúngico)	Suspensão lipossomal injetável (intravenosa)	Sigma Tau Pharmaceuticals Enzon (Indianópolis) – controle de qualidade (CQ) e embalagem; Alpharma (Dinamarca); Bristol Myers Squibb (Porto Rico)	ANVISA: 05/2009 FDA: 11/1995
Ambisome ^{2,3}	Anfotericina B (Antifúngico)	Pó líofilo lipossomal (intravenoso)	Gilead Sciences Incorporated; Astellas	ANVISA:08/1997 FDA: 08/1997
Caelyx ^{2,4} / Doxil ³	Doxorrubicina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal intravenosa	Ben Venue Laboratories, Inc	ANVISA:03/1999 FDA:11/1995 EMA: 06/1996
DaunoXome ^{2,3}	Daurorrubicina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal intravenosa	Gilead Sciences Inc.	ANVISA:01/1998 FDA: 04/1996
Myocet ⁴	Doxorrubicina (antineoplásico)	Pó líofilo de doxorrubicina + suspensão lipossomal+ solução tampão para reconstituição (intravenoso)	GP-Pharm (Barcelona/Espanha); Teva Operations Poland Sp. z o.o.(Polónia)	EMA: 07/2000

Quadro 2- Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na ANVISA, FDA e EMA e alguns em fase de testes clínicos (continuação).

PRODUTO	Princípio ativo/ Classe terapêutica	Forma farmacêutica	Fabricante para Brasil e EUA ¹	Registros do produto (ANVISA, FDA, EMA)
Marqibo ³	Sulfato de Vincristina (antineoplásico)	Solução intravenosa de sulfato de vincristina+ Suspensão lipossomal + Solução de fosfato de sódio para reconstituição	Cangene Corporation	FDA: 08/2012
Visudyne ^{3,6}	Verteporfina (agente antineovascular)	Pó líófilo lipossomal intravenoso	JHP Pharmaceuticals LLC; Hollister-Stier Laboratories LLC	FDA: 04/2000 EMA: 07/2000
DepoCyt ^{3,6}	Citarabina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal intratecal	Pacira Pharmaceuticals, Inc. (San Diego, CA)	FDA: 04/1999 EMA: 07/2001
DepoDur ³	Sulfato de morfina (analgésico)	Suspensão lipossomal intratecal	Pacira Pharmaceuticals, Inc. (San Diego, CA)	FDA: 05/2004
Lipoplatin ¹⁰ (fase III)	Cisplatina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal intravenosa	Regulon Inc.	N/A
LEP-ETU ⁷ (fase II)	Pacitaxel (antineoplásico)	Pó líófilo lipossomal intravenoso	NeoPharm, Inc.	N/A
MBP-426 ¹³ (fase II)	Oxaliplatina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal injetável	Mebiopharm Co. Ltd.	N/A
Epaxal/ ⁸ HAVpur	Vacina de hepatite A	Suspensão lipossomal injetável (intramuscular)	Cruceil Spain Ltd	EMA*:12/1999
Inflexal V/Viroflu ⁸	Vacina de Influenza	Suspensão lipossomal injetável (intramuscular)	Cruceil Spain Ltd	EMA*:10/2005

Quadro 2- Medicamentos lipossomais injetáveis registrados na ANVISA, FDA e EMA e alguns em fase de testes clínicos (conclusão).

PRODUTO	Princípio ativo/ Classe terapêutica	Forma farmacêutica	Fabricante para Brasil e EUA ¹	Registros do produto (ANVISA, FDA, EMA)
Mepact ⁴	Mifamurtida (imunoestimulante)	Pó líófilo lipossomal (intravenoso)	Takeda Ireland Ltd; Takeda Italia S.p.A	EMA: 03/2009
Lipodox ⁵	Cloridrato de doxorubicina (antineoplásico)	Suspensão intravenosa	Sun Pharmaceutical Ind. Ltd.	Comercialização do produto autorizada por problemas de fornecimento do Doxil ¹¹
Definity ³	Perflutren (agente diagnóstico)	Suspensão intravenosa	Jubilant HollisterStier (JHS); Ben Venue Laboratories (BVL)	FDA: 07/2001
Thermodox ⁹ (fase III)	Doxorubicina (antineoplásico)	Suspensão lipossomal intravenosa	Celsion Corp.	N/A

* Registro do produto concedido via procedimento descentralizado (autoridades sanitáriaseuropéias nacionais)

1 planta fabricante do produto lipossomal (não o detentor do registro) ou quando for o caso, do item que contém os lipossomos

2 http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp

3 <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>

4 http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

5 <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm>

6 <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm281782.htm>

7 <http://www.drugs.com/history/lep-etu.html>

8 <http://www.medicines.org.uk/emc/>

9 http://celsion.com/docs/technology_thermodox

10 <http://lipoplatin.com/index.php>

11 <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm292658.htm>

12 <http://investor.lantheus.com/phoenix.zhtml?c=241435&p=irol-newsArticle&ID=1830533>

13 <http://www.mebiopharm.com/english/aacr5586.html>

1.3.9 Aspectos regulatórios

As agências reguladoras têm o dever de proteger e promover a saúde da população, através de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde. Dessa forma, a comercialização de medicamentos, cujo uso potencialmente pode oferecer risco à saúde, é objeto de intervenção regulatória durante todo o ciclo de vida no mercado. Antes que os medicamentos sejam postos à venda, as solicitações de registro de produto pelas empresas fabricantes ou importadoras devem ser criteriosamente avaliadas pela autoridade regulatória, a fim de que o risco-benefício seja determinado e a decisão quanto à autorização para comercialização possa ser tomada. Uma vez deferido o pedido de registro, a fabricação do medicamento passa a ser monitorada através de ações de fiscalização *in loco* para verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, e o desempenho desses medicamentos no mercado é acompanhado através do trabalho de farmacovigilância (BRASIL, 1999).

1.3.9.1 A regulação de medicamentos no Brasil

O arcabouço legal para a regulação de medicamentos no Brasil é bastante extenso e inclui requisitos para o seu registro sanitário, alterações pós-registro, Boas Práticas de Fabricação (BPF), armazenamento, distribuição, transporte e farmacovigilância (Anvisa, 2009; Anvisa, 2010; Anvisa, 2014b).

Para fins de obtenção do registro sanitário de um medicamento, dentre outros documentos, o solicitante deve apresentar informações sobre: o insumo farmacêutico ativo (como estrutura propriedades, processo de síntese, controle de qualidade, estabilidade), o desenvolvimento da formulação, o produto terminado (como componentes da formulação, suas funções e especificações, processo de fabricação), controle de qualidade das matérias-primas e produto acabado, embalagem do produto e estudos de estabilidade (Anvisa, 2014b).

No que se refere às BPF, dentre outros requisitos, o fabricante deve: produzir medicamentos dentro dos padrões de qualidade exigidos; garantir os recursos necessários ao seu armazenamento e transporte adequados; identificar o que é necessário validar para provar que os aspectos críticos de suas operações estão sob controle; possuir especificações para produtos terminados e matérias-primas e garantir o cumprimento dessas especificações mediante ensaios laboratoriais antes de liberar o produto para comercialização; avaliar a estabilidade dos produtos terminados; ter um sistema de controle de mudanças (Anvisa, 2010).

1.3.9.2 Regulação de medicamentos lipossomais

Existem muitos estudos já realizados e em andamento com relação às formulações lipossomais, tanto no sentido de explorar o vasto mundo dos sistemas lipídicos ao qual pertencem os lipossomos, na busca de identificar suas potencialidades e vulnerabilidades, quanto no sentido de melhorar formulações, processos e métodos existentes, solucionando problemas que ainda são um entrave para sua consolidação no mercado farmacêutico.

No âmbito regulatório vem ocorrendo um aumento crescente das discussões sobre a nanotecnologia de uma forma geral, e sobre os riscos que cada categoria de produtos incluídos no mundo nano poderia oferecer.

Nas áreas de cosméticos e de alimentos essa discussão parece ser maior, uma vez que existem mais publicações de diretrizes nessas áreas. Na área farmacêutica não há legislações com requisitos específicos para produtos nanotecnológicos publicados pelas principais autoridades regulatórias: World Health Organization (WHO), FDA, EMA, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Health Canada (HC) e Therapeutic Goods Administration (TGA). Com relação aos produtos lipossomais, até o momento a regulação tem sido feita com o uso das legislações vigentes de cada país/ região utilizadas para os demais produtos farmacêuticos, sendo adotadas recomendações e guias produto-específicos (ainda em rascunho) com abordagem de avaliação caso a caso particularmente contendo recomendações para estudos de bioequivalência e equivalência farmacêutica para candidatos a genérico de medicamentos lipossomais contendo anfotericina B, doxorubicina, daunorubicina e verteporfina (U.S. FDA, 2014b, 2014c, 2014d, 2014e). Foram publicados também dois documentos que contêm recomendações importantes a serem consideradas pelos fabricantes de produtos lipossomais:

- *“Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product”*, publicado pela EMA em fev/2013 (EMA, 2013): O documento discute os princípios para avaliar produtos lipossomais desenvolvidos com referência a um produto inovador, incluindo requisitos clínicos e não clínicos. Inclui os parâmetros que devem ser avaliados para fins de submissão do registro desses produtos.

- *“Guidance for industry – Liposome Drug Products - Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation”* (publicado pela FDA em agosto 2002): trata-se de um guia até o momento em rascunho com recomendações gerais para a produção e controle de qualidade de produtos lipossomais, assim como para avaliação de biodisponibilidade.

O guia em rascunho publicado pela FDA é o documento que trata de forma mais abrangente aspectos da qualidade de produtos farmacêuticos lipossomais. Nesse

documento são mencionadas as seguintes propriedades específicas de formulações lipossomais que são críticas para a qualidade destes produtos e devem ser avaliadas:

- Morfologia dos lipossomos, incluindo lamelaridade;
- Carga líquida;
- Quantificação de fármaco encapsulado e não encapsulado nas vesículas;
- Tamanho de partícula e distribuição de tamanho;
- Temperatura de transição de fase;
- Liberação *in vitro* do fármaco das vesículas;
- Quantificação dos lípides;
- Produtos de degradação dos lípides;
- Propriedades osmóticas

A estabilidade do produto lipossomal é crítica considerando que os lipossomos são susceptíveis à fusão, agregação e liberação do fármaco durante o armazenamento e os lípides são sujeitos à hidrólise e oxidação (U.S. FDA, 2002).

Os componentes lipídicos devem ser avaliados com o mesmo critério que o fármaco, devendo ser observados os seguintes itens:

- Origem
- Processo de síntese/ extração/purificação
- Descrição e caracterização
- Especificação
- Estabilidade (U.S. FDA, 2002).

Com relação à qualidade dos produtos lipossomais, além dos requisitos mencionados no documento publicado pela FDA (com exceção de propriedades osmóticas, que não consta no documento) o *Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product*, considera críticas as seguintes propriedades físico-químicas:

- Identificação e controle de intermediários chave no processo de produção;
- Razão fármaco/ lípide;
- Robustez do processo de reconstituição, quando houver;
- pH do compartimento interno dos lipossomos, quando utilizada técnica de gradiente de pH para encapsulamento;
- se for o caso, caracterização do estado físico do fármaco dentro dos lipossomos (quando há possibilidade de precipitação);
- distribuição e localização do fármaco dentro dos lipossomos (bicamada, superfície ou interior aquoso);
- para formulações lipossomais conjugadas com polímeros ou outras substâncias (como PEG por exemplo), avaliação da qualidade e pureza da substância; detalhes do processo de

conjugação destas aos lipossomos; estabilidade da conjugação; peso molecular do lípido conjugado e distribuição de tamanho; disposição do polímero na superfície lipossomal.

Em agosto de 2006, a FDA constituiu a “*Nanotechnology Task Force*” com o objetivo de identificar eventuais lacunas de conhecimento ou lacunas regulatórias de forma a possibilitar uma melhor avaliação dos produtos que utilizam nanotecnologia. Em julho de 2007, o grupo da força tarefa elaborou um relatório onde constam recomendações que incluem esforços para identificar produtos que contém nanotecnologia e melhor compreender os nanomateriais no que se refere às suas interações com os sistemas biológicos, as propriedades que afetam sua toxicidade, métodos de análise capazes de avaliar a eficácia, segurança e qualidade de produtos nanotecnológicos, coleta e análise de informações científicas sobre o assunto para avaliar categorias específicas de produto (U.S. FDA, 2014a).

A EMA também instituiu a “*Innovation Task Force*” cujos objetivos foram estabelecer uma plataforma de discussão com o setor regulado, a fim de identificar previamente lacunas científicas ou regulatórias no caso de terapias e tecnologias emergentes relacionadas a produtos de uso humano e veterinário, e aumentar o conhecimento da agência quanto ao uso destas, a fim de balisar a conduta regulatória (EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA, 2014a).

Numa apresentação realizada pela FDA em setembro de 2010, no primeiro workshop internacional em nanomedicina organizado pela EMA, um dos questionamentos com relação aos nanomateriais foi a identificação de propriedades críticas que requerem caracterização para garantir a qualidade do produto, bem como uma avaliação adequada do seu desempenho. Também foi mencionado que uma das prioridades do programa CORE (Collaborative Opportunities for Research Excellence in Science Program) é definir características físicas e químicas dos nanomateriais que afetam sua potência e segurança. Neste mesmo workshop, na apresentação realizada pela EMA foi considerado como risco associado a produtos nanotecnológicos a estabilidade desses produtos (EMA, 2014b).

No Brasil, em agosto de 2014 foi instituído um comitê (Comitê Interno de Nanotecnologia- CIN) com a finalidade de coordenar as ações institucionais na área da nanotecnologia julgadas prioritárias pela Diretoria Colegiada da Anvisa. Dentre as atribuições desse comitê estão: coordenar a elaboração de norma que obrigue o regulado a informar sobre a natureza nanotecnológica dos produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária; acompanhar a elaboração de normas ou guias específicos destinados à avaliação de segurança, monitoramento e controle dos produtos e processos nanotecnológicos na área de competência da Agência; acompanhar atividades e participar de ações com agências congêneres, instituições e eventos que tratem sobre estratégias regulatórias e de avaliação de risco de produtos e processos nanotecnológicos; acompanhar a evolução das

políticas regulatórias em âmbito internacional com relação à nanotecnologia de interesse da saúde e da vigilância sanitária; formular proposta de desenvolvimento de pesquisa em ciências regulatórias com vistas a superar lacunas regulatórias em nanotecnologia; formular proposta de cooperação com agências congêneres sobre estratégias regulatórias e de avaliação de risco de produtos nanotecnológicos (Anvisa, 2014a).

1.3.10 Desafios regulatórios

Os documentos com finalidade regulatória até então publicados pela FDA e EMA, apesar de conterem informações importantes e relevantes para avaliação da qualidade de produtos lipossomais, não contemplam todos os itens passíveis de avaliação para os produtos lipossomais injetáveis, além de não abordarem muitas questões relacionadas às BPF e aos métodos analíticos para avaliação de seus atributos de qualidade.

Em setembro de 2004, a FDA publicou um documento denominado Boas Práticas de Fabricação Farmacêuticas para o século XXI – uma abordagem baseada no risco, que tem como objetivo reestruturar a regulação da qualidade farmacêutica. Baseia-se nos princípios da análise de risco, em políticas e padrões com base científica, sistemas de qualidade integrados, cooperação internacional e na forte proteção à saúde pública. O documento descreve as políticas e normas embasadas em conhecimento científico como pilar do processo de regulação (U.S. FDA, 2004b).

Observa-se uma tendência em avaliar os medicamentos e insumos farmacêuticos durante todo o seu ciclo de vida, desde a fase de desenvolvimento até a rotina de fabricação (U.S. FDA, 2004b). Essa visão global promove um melhor entendimento do produto e do processo pelo agente regulado e pelo regulador, permitindo uma avaliação mais precisa de ambos.

A regulação exige conhecimento acerca da matéria regulada, fazendo-se necessário a busca de informações técnicas cientificamente embasadas, por meio de pesquisa laboratorial e bibliográfica e pela troca de informações e experiências entre autoridades regulatórias e as universidades e o setor regulado (U.S. FDA, 2004b).

A compreensão dos fatores que afetam a eficácia, segurança e estabilidade dos produtos lipossomais e a forma com que cada um deles os influencia é fundamental para o embasamento de decisões regulatórias. (U.S. FDA, 2004b)

Nos itens anteriores foi demonstrada uma clara preocupação em definir requisitos para garantir a qualidade e estabilidade de produtos nanotecnológicos, incluindo os lipossomais. Para isso é necessário conhecer as características específicas desses produtos e como elas afetam sua eficácia, toxicidade e estabilidade.

Os lipossomos são formas farmacêuticas únicas, portanto é fundamental que suas especificidades sejam conhecidas para uma regulação efetiva. É necessário que o controle da qualidade de produtos que utilizam essa tecnologia, seja feito com testes e métodos específicos que sejam capazes de demonstrar sua qualidade de forma inequívoca (U.S. FDA, 2002).

A estabilidade dos lipossomos ainda é um fator preocupante, portanto o conhecimento a respeito dos problemas a que estas formulações estão sujeitas, os fatores que influenciam a ocorrência desses problemas e os métodos capazes de identificá-los são essenciais tanto para o fabricante do produto quanto para as autoridades regulatórias que possuem o dever de assegurar que esses medicamentos sejam produzidos e controlados de forma adequada (EMA, 2014b).

Considerando as lacunas existentes nos documentos até então publicados pelas agências reguladoras, bem como a ausência de testes farmacopeicos específicos para lipossomos, faz-se necessária uma análise regulatória a fim de avaliar as especificidades associadas às formulações lipossomais, com foco em alguns dos pontos nevrálgicos da fabricação de lipossomos, como a caracterização do produto, controle de qualidade e estabilidade.

Dessa forma, com base na literatura científica e entrevistas com especialistas na área, neste trabalho procuramos identificar e discutir, de forma sistemática, os fatores que influenciam a eficácia, toxicidade e estabilidade de medicamentos lipossomais injetáveis. Considerando que a estabilidade é um dos pontos críticos para as formulações lipossomais, também foi feita uma análise das causas de problemas relacionados à estabilidade dessas formulações.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Proporcionar conhecimento para a atuação regulatória e embasar o desenvolvimento de regulamentações ou guias contendo requisitos específicos para produtos lipossomais injetáveis, principalmente no que se refere à sua caracterização, controle de qualidade e estabilidade.

2.2 Objetivos específicos

Identificar os atributos de qualidade que impactam a eficácia, toxicidade e estabilidade de formulações lipossomais injetáveis.

Analisar os métodos analíticos utilizados para avaliar alguns dos principais atributos de qualidade.

Identificar requisitos específicos para produtos lipossomais injetáveis, principalmente no que se refere à sua caracterização, controle de qualidade, estabilidade e itens pontuais de BPF.

3. ABRANGÊNCIA

Tendo em vista que a maioria dos produtos farmacêuticos lipossomais atualmente comercializados é injetável, o foco deste trabalho são produtos com esta apresentação. O trabalho também é focado nos aspectos regulatórios referentes à caracterização, controle de qualidade e estabilidade de medicamentos lipossomais injetáveis, bem como em itens pontuais referentes às Boas Práticas de Fabricação.

4. METODOLOGIA

Foi utilizado o seguinte conjunto de estratégias:

- Fazer pesquisa bibliográfica em livros com conteúdo sobre interações entre lipossomos e o meio biológico e seu comportamento *in vivo*, e temas sobre produção, caracterização, controle de qualidade e estabilidade de lipossomos, a fim de identificar os fatores que potencialmente podem impactar a eficácia, toxicidade e estabilidade de formulações lipossomais injetáveis;
- Realizar pesquisa no portal de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério da Educação (CAPES/MEC) e no Google utilizando palavras-chave conforme o tema em questão (ex.: review + nanoparticle; liposome + drug release; liposome + characterization; liposome + stability; liposome + toxicity, etc);
- Através da utilização de uma ferramenta de análise de causa e efeito (diagrama de Ishikawa), propor os fatores que afetam a eficácia e toxicidade de produtos lipossomais injetáveis bem como as possíveis causas para problemas de estabilidade dessas formulações. O diagrama de Ishikawa é elaborado com o intuito de identificar os fatores que potencialmente contribuem para um efeito particular, relacionando-os de forma progressiva com o objetivo de chegar às causas raiz desse efeito (INSTITUTE FOR INNOVATION AND IMPROVEMENT, 2015);
- Enviar os diagramas de Ishikawa propostos a especialistas na área de lipossomos para avaliação e contribuição com intuito de “validar” a adequabilidade dos fatores propostos como “causas” nos diagramas, bem como verificar a existência de possíveis fatores não incluídos (os anexos 1 e 2 relatam as perguntas encaminhadas). Os especialistas

envolvidos nessa avaliação foram: Andreas Wagner (Chefe da área de formulação lipossomal da Polymun Scientific); Daan Crommelin (professor emérito na área Biofarmacêutica da Universidade de Utrecht); Gerard Jensen (Diretor de desenvolvimento e serviços técnicos da Gilead Sciences Inc.); Frédéric Frézard (professor titular no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais);

- Através da pesquisa bibliográfica e com as contribuições recebidas conforme mencionado, identificar os atributos de qualidade que impactam a eficácia e toxicidade dos produtos lipossomais injetáveis, bem como os potenciais problemas relacionados à estabilidade dos produtos lipossomais injetáveis, as respectivas causas e as formas de detectá-los;

- Avaliar as informações obtidas no intuito de identificar itens relevantes para atuação regulatória, especialmente no que se refere à caracterização, controle de qualidade e estabilidade de formulações lipossomais injetáveis, bem como a itens relacionados às BPF;

- Fazer pesquisa bibliográfica em livros, no portal de periódicos da CAPES/MEC e no Google (de forma similar à anteriormente descrita) sobre os principais métodos analíticos utilizados para caracterizar os atributos de qualidade de maior impacto para eficácia, toxicidade e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis;

- Consolidar os itens relevantes identificados com relação aos principais métodos de análise dos atributos de qualidade de maior impacto para eficácia, toxicidade e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis e elaborar um texto (contendo essencialmente as informações constantes no item 9) para revisão de especialistas na área de controle de qualidade de lipossomos, com intuito de “validar” os itens relevantes identificados, bem como verificar a existência de possíveis itens não incluídos. Os especialistas envolvidos nessa avaliação foram: Wim Jiskoot (Professor de Tecnologia de entrega de fármacos na Universidade de Leiden); Michael Kaszuba (Gerente de suporte técnico da Malvern Instruments Inc.); Geisi Rojas Barreto (Cientista de aplicações da Malvern Instruments Inc.); Frédéric Frézard (professor titular no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais).

5. FATORES QUE AFETAM A EFICÁCIA DE MEDICAMENTOS LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS

A eficácia é definida como a capacidade de o medicamento atingir o efeito terapêutico visado (Anvisa, 1998).

A figura 4 traz um diagrama de causa e efeito (Ishikawa) contendo os fatores que impactam a eficácia de uma formulação lipossomal injetável. A estabilidade físico-química da formulação é um dos fatores que influencia a sua eficácia. Porém, isso não será abordado nesse item uma vez que há uma discussão à parte sobre o tema no item 7.

Assim, os fatores que influenciam a estabilidade da formulação não serão apresentados como fatores que influenciam a eficácia.

Há quatro requisitos que devem ser cumpridos a fim de que a formulação lipossomal seja eficiente terapeuticamente: o lipossomo deve ser estável tanto na formulação quanto no plasma, a fim de atingir o local alvo com uma quantidade de fármaco suficiente para ter valor terapêutico; os lipossomos devem ter um tempo de circulação adequado no plasma; os lipossomos devem alcançar o tecido alvo e permanecer por tempo suficiente; o fármaco deve ser liberado dos lipossomos no local alvo e deve estar presente nas células alvo (SENIOR; GREGORIADIS, 1982; BARENHOLZ, 2001).

Em última instância, uma ação terapêutica eficaz depende de uma concentração e de um tempo de ação adequados do fármaco no local alvo. Isso é conseguido através de um conjunto de fatores que começa com o encapsulamento de quantidade suficiente do fármaco dentro das vesículas, passando por uma biodistribuição efetiva, e a liberação do fármaco encapsulado de forma que sua concentração no local de ação seja maximizada e nos demais órgãos e tecidos seja minimizada.

Uma vez na circulação sanguínea sistêmica, os lipossomos são transportados ao longo da vasculatura e se acumulam em vários órgãos através de diferentes mecanismos: aprisionamento em capilares pequenos (especialmente relevante nos capilares dos pulmões para partículas maiores que 200nm); captura por células fagocitárias do sistema reticuloendotelial (RES); extravasamento através do endotélio fenestrado (descontinuado); e adesão às paredes vasculares (DECUZZI et al., 2010).

Os lipossomos protegem o fármaco enquanto o transportam para o local alvo pretendido. A disponibilidade do fármaco para a ação terapêutica dependerá da forma em que se dá sua liberação do carreador (PETRAK, 2005).

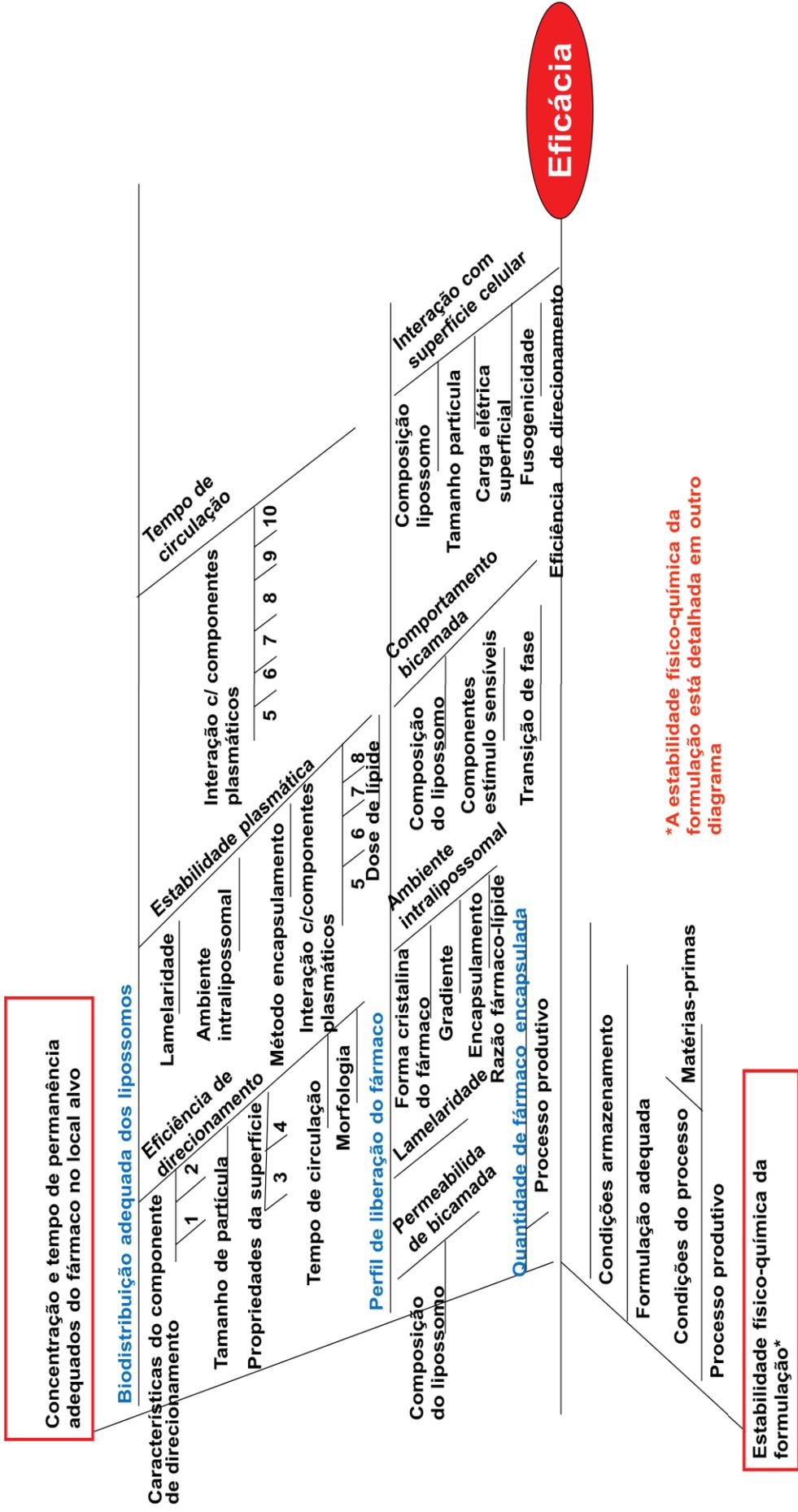


Figura 4 – Fatores que impactam a eficácia de uma formulação lipossomal injetável. A composição dos lipossomos inclui identidade e razão molar dos lípides e componentes de revestimento. 1: Natureza, densidade, conformação e concentração do ligante; 2: Natureza e concentração do componente magnético; 3 – carga elétrica superficial; 4 – Identidade, densidade e espessura do componente de revestimento da superfície. 5- Tamanho da vesícula; 6-Carga elétrica superficial; 7- Composição lipossomal; 8- Identidade, peso molecular, densidade e configuração do componente de revestimento; 9- Identidade do ligante; 10-morfologia.

5.1 Estabilidade plasmática

Uma vez na corrente sanguínea, os lipossomos devem permanecer estáveis resistindo à agregação e liberação precoce do fármaco, que pode anular ou diminuir os efeitos benéficos proporcionados pelo uso do carreador (PETRAK, 2005). Sua remoção pelos órgãos do RES também deve ser evitada (RUENRAROENGSAK et al., 2010; LEE; YEO, 2015).

As interações entre lipossomos e componentes plasmáticos é uma causa importante de instabilidade plasmática e conseqüente liberação precoce do fármaco. A permeabilidade da membrana dos lipossomos ao fármaco encapsulado aumenta quando estes interagem com proteínas plasmáticas (BONTÉ; JULIANO, 1986) como a albumina, que é a proteína mais abundante na circulação sanguínea, e sobretudo as lipoproteínas de alta densidade (HDL). A maioria das apolipoproteínas pode interagir com carreadores lipídicos, podendo perturbar a bicamada e rearranjar sua estrutura para formar estruturas não vesiculares (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002). Lipossomos com superfície carregada apresentam essa interação favorecida quando comparados aos lipossomos eletricamente neutros (BIENVENUE et al., 1985).

A probabilidade de interação entre a bicamada lipídica e proteínas depende das características da interface lípide-água. O comprimento da cadeia acila, a presença de insaturação, as forças de coesão entre moléculas lipídicas e o estado físico da membrana (fase gel ou cristal-líquida) determinam a susceptibilidade a essas interações. Uma elevada curvatura da membrana como no caso das vesículas pequenas (SUVs) torna a estrutura da vesícula mais susceptível à solubilização por lipoproteínas. Os fosfolípidos ou o colesterol podem ser removidos dos lipossomos pelas HDLs plasmáticas, levando à formação de poros na bicamada e liberação do conteúdo lipossomal. Lipases podem se ligar aos lipossomos e clivar a ligação éster dos fosfolípidos, formando ácidos graxos e lisofosfolípidos (LPL), que desestabilizam a membrana (ZASADZINSKI, 2011). As interações com proteínas séricas podem alterar ainda a temperatura de transição de fase da bicamada, o que também pode aumentar sua permeabilidade (QIAN; LI; ZUO, 2012).

Em geral, as propriedades da superfície lipossomal são as principais responsáveis pelo tipo e número de biomoléculas (como as proteínas) que são adsorvidas na sua superfície através de forças eletrostáticas ou hidrofóbicas/ hidrofílicas (ZASADZINSKI, 2011; DUAN; LI, 2013).

Quanto maior a dose de lípidos, menores os efeitos desestabilizadores do plasma (HUNT, 1982; BONTÉ; JULIANO, 1986), pois maior será a razão entre a concentração

de lipídeos dos lipossomos e os componentes plasmáticos capazes de extrair esses lipídeos da bicamada (como HDL e albumina). O inverso ocorre com baixas doses de lipídeos, sendo a bicamada mais propensa à desestabilização (HOOGEVEST; LEIGH; FAHR, 2013).

Lípidos carregados negativamente como fosfatidilserina e fosfatidilinositol interagem fortemente com glicoproteínas (BONTÉ; JULIANO, 1986). Lipossomos carregados positivamente, utilizados principalmente para carreamento de DNA, podem interagir com vários componentes séricos carregados negativamente, o que pode ocasionar liberação precoce e degradação do DNA. A densidade de carga da membrana lipossomal e a razão entre a carga lipossomal e a celular afeta essa interação (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; CARACCILO et al, 2011).

A composição do lipossomo, incluindo polímeros ou outros componentes de revestimento da superfície, afeta a estabilidade plasmática, podendo tanto melhorá-la quanto prejudicá-la. A inclusão de polímeros como o PEG nos lipossomos é uma estratégia comum para minimizar as interações destes com componentes plasmáticos, conforme descrito no próximo item (GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012), mas o aumento de sua concentração pode tornar a bicamada mais permeável ou rompê-la, com a formação de estruturas diferentes como micelas. (SRIWONGSITANONT; UENO, 2002; RANGELOV; MOMEKOVA; ALMGREN, 2010; ZASADZINSKI, 2011).

O revestimento da superfície lipossomal com partículas de ouro pode melhorar a estabilidade do lipossomo bem como a retenção do fármaco (QIN et al., 2011; ZASADZINSKI, 2011).

A lamelaridade também influencia a estabilidade plasmática. Geralmente vesículas multilamelares propiciam maior retenção do fármaco que as unilamelares (KIRBY; GREGORIADIS, 1984). Foi demonstrado em camundongos que se comparada às MLVs ou LUVs, SUVs preparadas com fosfatidilcolina de ovo (EPC) são mais propensas a perder sua estrutura no plasma (QIAN; LI; ZUO, 2012).

Conforme será discutido no item 5.7, o método de encapsulamento do fármaco influencia a forma com que este se encontra no interior do lipossomo (dissolvido, precipitado, cristalino ou amorfo), o que influencia sua estabilidade plasmática.

5.2 Tempo de circulação

Tanto os lipossomos com direcionamento ativo (lipossomos endereçados) quanto aqueles com direcionamento passivo geralmente requerem um tempo de circulação suficiente que possibilite seu acúmulo no tecido alvo (ZASADZINSKI, 2011). Um tempo de circulação adequado depende de uma estabilidade plasmática adequada. Portanto, o que foi descrito no item anterior, também terá impacto neste.

O tempo de circulação está intimamente relacionado à interação dos lipossomos com componentes plasmáticos (proteínas chamadas opsoninas) responsáveis pela sua eliminação da corrente sanguínea. As opsoninas incluem várias sub-classes de imunoglobulinas, alguns componentes do sistema do complemento, fibronectina, proteína de ligação a lipopolissacarídeo e pentraxinas (como proteína C reativa). O papel das opsoninas é se ligar a partículas estranhas (incluindo os lipossomos) a fim de desencadear seu processo de remoção do organismo formando uma “ponte” entre as células fagocitárias (macrófagos) presentes nos órgãos do sistema RES, principalmente fígado, baço e medula óssea, e essas partículas. Assim, a ligação das opsoninas aos lipossomos promove um aumento de sua fagocitose, especialmente pelos macrófagos do fígado (células de Kupffer) que são responsáveis pela remoção da maioria dos lipossomos da circulação (MOGHIMI; PATEL, 1998).

A carga elétrica superficial dos lipossomos influencia a adsorção de opsoninas. A captação pelos macrófagos aumenta com o aumento da carga superficial (tanto positiva quanto negativa) (DUAN; LI, 2013), sendo que lipossomos carregados positivamente em geral têm um tempo de circulação menor no plasma após injeção intravenosa se comparados com seus homólogos neutros ou aniônicos, devido a uma maior interação com os componentes plasmáticos, e captação pelo sistema RES (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

A fagocitose pelos macrófagos tem uma forte dependência em relação à morfologia dos lipossomos (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2006). Além disso, em alguns casos, também existe diferença na biodistribuição de partículas esféricas e não esféricas, não somente no que se refere à captação celular como também na acumulação destas em diferentes órgãos (MURO, 2012; DUAN; LI, 2013).

Geralmente o tempo de circulação dos lipossomos aumenta com a diminuição do tamanho, da densidade de carga elétrica superficial e da fluidez da bicamada (CHANG; YEH, 2012).

Vesículas pequenas, com tamanho inferior a 100nm, podem escapar das células fagocitárias, enquanto vesículas maiores são captadas preferencialmente pelo RES, sendo eliminadas mais rapidamente da circulação (QIAN; LI; ZUO, 2012).

Partículas esféricas com diâmetro menor que 500 nm mostram mínimo margeamento para a parede de alguns vasos, apresentando baixa taxa de adesão na vasculatura, uma vez que essas nanopartículas encontram-se preferencialmente no centro do fluxo sanguíneo, em meio às células vermelhas sanguíneas. Esse efeito favorece um maior tempo de circulação das nanopartículas, uma vez que estas ficam afastadas dos leucócitos circulantes, que ficam acumulados nas proximidades da parede vascular (**figura 5**) (DUAN; LI, 2013; VAN DER MEEL et al., 2014).

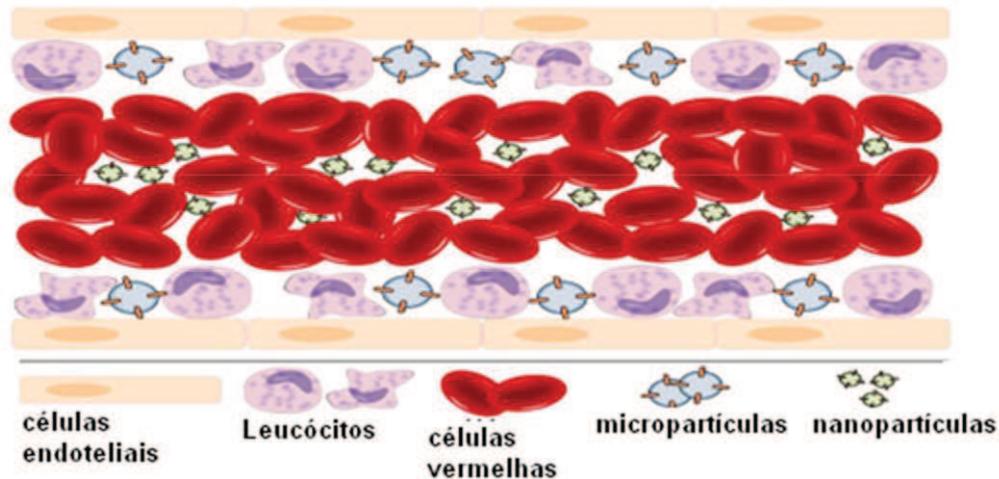


Figura 5 – Representação esquemática do fluxo sanguíneo mostrando a localização das nanopartículas em meio às células vermelhas e a marginação das micropartículas e leucócitos para a parede vascular. Fonte: VAN DER MEEL et al, 2014.

A composição dos lipossomos influencia o tempo de circulação de várias maneiras. Lípidos que reduzem a fluidez da membrana como DSPC aumentam o tempo de circulação (BONTÉ; JULIANO, 1986; OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

A inclusão de polímeros como o PEG na superfície lipossomal é uma estratégia comum para minimizar as interações destas com as opsoninas (GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012). O tempo de circulação estendido de lipossomos peguados é atribuído à habilidade deste polímero de revestimento em reduzir a opsonização dos lipossomos (MAKINO; SHIBATA, 2006). A densidade desse polímero na superfície da membrana influencia esse efeito. Em geral, quanto maior a densidade do polímero, maior é o tempo de circulação (ISHIDA et al., 2005; CHANG; YEH, 2012).

Além disso, o peso molecular do polímero pode influenciar esse efeito protetor. Nesse caso, quanto maior o peso molecular, maior o efeito protetor (até um certo limite) e conseqüentemente maior o tempo de circulação. Geralmente uma maior densidade e maior peso molecular são necessários para mascarar a carga positiva ou negativa e criar uma camada mais hidratada na superfície lipossomal resultando em menor adsorção de proteínas (GREF et al., 2000; CHIU; BALLY; MAYER, 2001; LEVCHENKO et al., 2002; POZZI et al., 2014). No entanto, em alguns casos, essa camada hidratada na superfície lipossomal é maior quando são incorporadas misturas de PEG com pesos moleculares diferentes, se comparada à incorporação somente do PEG de maior peso molecular, o que traduz em uma proteção mais efetiva (SADZUKA et al., 2002). Quando a densidade do PEG na superfície lipossomal é aumentada, a conformação do polímero muda de altamente

enovelada, que se diz em forma de “cogumelo”, para pouco enovelada, que se diz em forma de “escova” (**figura 6**). A configuração do PEG em “escova” é ideal para garantir cobertura completa da superfície lipossomal. Essa tendência para mudar a conformação é dependente do peso molecular do polímero (LI; HUANG, 2010; YANG et al., 2014).

Uma baixa cobertura da superfície lipossomal com o polímero tipicamente na configuração em “cogumelo” leva a falhas na camada protetora, onde as opsoninas podem se ligar. A estabilidade da ligação entre lípide e polímero também é essencial para obtenção do efeito desejado. O lípide ao qual é ancorado o polímero influencia a retenção deste ao lipossomo e o impacto no tempo de circulação (PARR et al., 1994; CHIU; BALLY; MAYER, 2001; DUAN; LI, 2013).

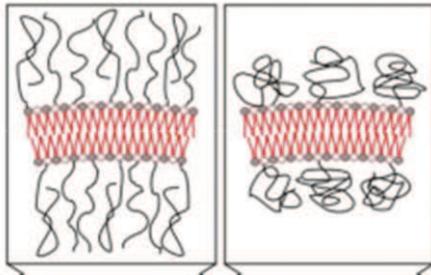


Figura 6 - Representação esquemática do revestimento polimérico na superfície lipossomal. À esquerda, apresentando configuração em escova e à direita configuração em cogumelo. Fonte: BUYENS et al., 2012.

Alternativamente ao PEG, outros polímeros têm sido estudados como apolivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos e dextran, principalmente devido ao efeito de aumento da eliminação da corrente sanguínea, denominado efeito ABC (*Accelerated Blood Clearance*), proporcionado por injeções repetidas de lipossomos peguados conforme descrito no item 6.3 (DUAN; LI, 2013).

A presença de anticorpos como ligantes tornam os imunolipossomos mais susceptíveis à rápida remoção da circulação devido ao reconhecimento do fragmento Fc por receptor específico na superfície dos macrófagos, enquanto fragmentos de anticorpos não ligados ao Fc promovem uma menor taxa de eliminação (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

5.3 Eficiência de direcionamento do carreador

Em geral, pode-se dizer que a eficiência de direcionamento é a habilidade de o carreador se acumular no órgão ou tecido alvo seletivamente e quantitativamente, independente do local e método de administração. Idealmente, nessas condições, a concentração do fármaco no local alvo é maximizada e nos demais tecidos e órgãos minimizada, evitando efeitos tóxicos e adversos (TORCHILIN, 2000).

Para que a formulação lipossomal tenha eficácia terapêutica, o fármaco encapsulado deve alcançar as células-alvo. Esse objetivo pode ser atingido através de direcionamento passivo ou ativo do carreador.

- Direcionamento passivo:

O direcionamento passivo é um processo através do qual as propriedades físicas dos lipossomos junto com a microanatomia do tecido alvo determinam a localização seletiva do agente terapêutico (BARENHOLZ, 2001). Os lipossomos se acumulam em regiões do corpo conforme as características anatômicas e o papel fisiológico das células e tecidos. Um exemplo clássico é o seu acúmulo no sistema RES, cujos macrófagos capturam sistemas coloidais presentes na circulação sanguínea. Conforme descrito no item anterior, o tamanho dos lipossomos e suas características de superfície têm forte influência na sua eficiência de captação pelos macrófagos, no seu tempo de permanência na circulação e, por fim, na sua biodistribuição entre os tecidos do RES (WOODLE; LASIC, 1992).

Outro exemplo comum de direcionamento passivo é o efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR) associado à vasculatura de tumores onde o aumento dos espaços entre as células endoteliais permite um extravasamento de lipossomos circulantes (MURO, 2012). O tamanho das vesículas influencia esse efeito, ou seja, vesículas menores que 400nm aproximadamente são capazes de extravasar a vasculatura fenestrada (GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012).

Os lipossomos convencionais e os peguillados como o Doxil[®] são exemplo de produtos lipossomais com direcionamento passivo (BARENHOLZ, 2001).

A carga superficial também é crítica, favorecendo ou prejudicando a captação dos lipossomos pelos macrófagos ou por outras células com atividade endocítica (PINZON-DAZA et al., 2013). A superfície da membrana celular é carregada negativamente, o que favorece a interação eletrostática e adsorção de componentes carregados positivamente. Sendo assim, geralmente lipossomos catiônicos se ligam em maior extensão à superfície celular que os neutros ou aniônicos (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

A morfologia das vesículas também afeta a eficiência de direcionamento, a fagocitose, endocitose e o subsequente transporte intracelular (MURO, 2012; DUAN; LI, 2013).

- Direcionamento ativo:

O direcionamento ativo requer, além de um tempo de permanência suficiente na circulação, um dispositivo ligado à superfície do lipossomo capaz de reconhecer as células alvo e se ligar a elas (BARENHOLZ, 2001). No direcionamento ativo, o padrão de biodistribuição do lipossomo é modificado através de mudanças na sua estrutura ou composição, seja através da incorporação de um ligante ou de uma molécula capaz de se

ligar a um receptor celular específico localizado no alvo terapêutico (como anticorpos) (WU; ZHAO; LEE, 2007), polissacarídeos, moléculas de baixo peso molecular (como o folato) (PINHEIRO et al., 2011) ou através do uso de partículas magnéticas incorporadas aos lipossomos, sujeitas à ação de um campo magnético externo (TORCHILIN, 2000; NOBUTO et al., 2004).

Apesar de lipossomos com ligantes serem considerados como de “direcionamento ativo”, a presença do ligante não confere ao lipossomo alguma força propulsora que o leve até o tecido alvo, sendo útil somente para aumentar a probabilidade de que o lipossomo se ligue, ou seja, internalizado pelas células alvo quando está próximo a estas (RUENRAROENGSACK et al., 2010; KWON et al., 2012). Como os lipossomos acessam o tecido alvo pela circulação sanguínea, a probabilidade de interação lipossomo-alvo depende também do tempo de circulação (KWON et al., 2012).

A eficiência do direcionamento ativo dos lipossomos com uso de ligantes é determinada primariamente pela seletividade e afinidade da ligação com o receptor, que é superexpressado ou unicamente expressado pelas células alvo (ZASADZINSKI, 2011; VAN DER MEEL et al., 2014). Essa ligação pode ser favorecida ou prejudicada, dependendo da composição do lipossomo e de como ele é produzido. Polímeros utilizados para revestimentos da superfície lipossomal como o PEG por exemplo, dependendo do seu comprimento, podem interferir na interação do ligante com o receptor através de forças repulsivas estéricas ou entálpicas (RUENRAROENGSACK et al., 2010; MURO, 2012).

A densidade do componente direcionador na superfície lipossomal deve ser cuidadosamente balanceada uma vez que a valência, ou a quantidade do componente direcionador na superfície é um parâmetro chave para sua avidéz e habilidade de direcionamento (PURI et al., 2009; MURO, 2012).

Alguns ligantes peptídicos podem ter sua conformação alterada após conjugação com o lipossomo, impedindo com que esses se liguem aos respectivos receptores (PINZON- DAZA et al., 2013).

A captação celular dos lipossomos também é influenciada pelo seu tamanho (RUENRAROENGSACK et al., 2010). Por exemplo, na maioria das células parenquimais, a cinética de internalização das partículas carreadoras diminui com o aumento do seu tamanho. A captação dos lipossomos via receptor de transferrina também possui restrição de tamanho, sendo que lipossomos de aproximadamente 60 nm acoplados à transferrina são capazes de agir no respectivo receptor, ao contrário dos seus homólogos de 120nm (MURO, 2012).

No caso dos lipossomos com partículas magnéticas ou magnetolipossomos, também é possível a obtenção de uma maior concentração das vesículas no órgão ou tecido alvo (TORCHILIN, 2000; NOBUTO et al., 2004). Partículas com propriedades

superparamagnéticas derivadas do óxido de ferro têm sido muito estudadas para tais aplicações (MCBAIN; YIU; DOBSON, 2008; DANHIER; PRÉAT; FERON, 2010; SU, 2012), de forma que o sistema possa responder a um campo magnético externo. Nessa estratégia, o campo magnético retém os lipossomos no local alvo, aumentando seus níveis no local de ação. No que diz respeito ao componente magnético, os parâmetros mais importantes a serem considerados são a concentração e o tipo de fluido férrico empregado (DANDAMUDI; CAMPBELL, 2007; ZHENG et al., 2009). Geralmente essa tecnologia se aplica quando a formulação pode ser injetada com uso de cateter, de forma que a aplicação seja feita perto do local alvo. Como é necessário um campo magnético externo para direcionar as partículas, essa tecnologia funciona melhor quando o alvo está próximo à superfície corporal, sendo mais difícil sua utilização em regiões mais profundas (MCBAIN; YIU; DOBSON, 2008).

O tamanho dos lipossomos também é importante para a eficiência do direcionamento dos magnetolipossomos, uma vez que se as partículas forem muito pequenas, o campo magnético externo pode não proporcionar a atração suficiente para o local desejado (ALEXIOU et al., 2000; TORCHILIN, 2000).

Vale ressaltar que ainda não estão disponíveis no mercado produtos lipossomais que exploram tecnologias de direcionamento ativo, mas existem produtos em fase de testes clínicos (**quadro 2**).

5.4 Perfil de liberação do fármaco

O acúmulo dos lipossomos no tecido alvo não necessariamente significa melhora da atividade terapêutica, pois o fármaco encapsulado pode não ser completamente liberado das vesículas para exercer a ação farmacológica (BANNO et al., 2010).

Após a interação com o alvo terapêutico, os lipossomos precisam liberar seu conteúdo de maneira controlada. A eficácia de várias formulações lipossomais está intimamente ligada à taxa de liberação do fármaco dos lipossomos (JOHNSTON et al., 2006).

Na formulação, a liberação do fármaco pode ocorrer principalmente pela combinação dos seguintes processos: difusão do fármaco através da bicamada de acordo com o gradiente de concentração; penetração de solvente no interior da vesícula com posterior dissolução ou lise osmótica; degradação ou desestabilização do lipossomo com liberação do fármaco. Na formulação, os lipossomos se encontram dispersos num meio aquoso de pequeno volume, conforme descrito anteriormente, uma vez na corrente sanguínea, sofrem um efeito de diluição que deve ser considerado no processo de liberação do fármaco (WASHINGTON, 1990).

O mecanismo predominante de liberação *in vivo* é através de interações dos lipossomos com as células (QIAN; LI; ZUO, 2012), apesar de também ser possível a liberação do fármaco no meio extracelular (HOROWITZ; BARENHOLZ; GABIZON, 1992).

Ao longo das últimas décadas, vem sendo estudadas diferentes estratégias para conseguir uma liberação de fármaco direcionada a um alvo específico. Assim, além daquelas descritas no item anterior para direcionamento dos carreadores, também são utilizadas estratégias para liberação do fármaco no local alvo, que envolvem: adição de lípidos ou polímeros sensíveis a estímulos como alteração de pH, temperatura ou ação de enzimas onde a liberação do fármaco é alcançada através da desestabilização da membrana lipossomal (MEERS, 2001); uso de componentes fotosensíveis ou ultrasom-sensíveis capazes de liberar o fármaco respectivamente mediante a ação localizada de uma fonte externa de emissão de luz (visível, ultravioleta, infravermelha) (SHUM; KIM; THOMPSON, 2001) ou mediante ação de ultrasom (QIAN; LI; ZUO, 2012; EVJEN et al., 2013). Com exceção dos lipossomos fotossensíveis, ainda não estão disponíveis no mercado produtos lipossomais contendo as demais tecnologias.

Uma outra estratégia muito empregada atualmente para fármacos com características ácido-básicas utiliza gradiente eletroquímico transmembrana para o seu encapsulamento. No caso desses lipossomos, a liberação do fármaco é influenciada por esse gradiente conforme descrito no item 5.7 (NAKAMURA et. al, 2012).

A seguir estão descritos os principais fatores que influenciam a liberação do fármaco do interior das vesículas.

5.5 Permeabilidade da bicamada

A permeabilidade da membrana dos lipossomos é influenciada pela fluidez e pelo grau de desordem da bicamada lipídica (TAYLOR et al., 1990; BETAGERI; PARSONS, 1992).

A eficiência de difusão do fármaco através da membrana é inversamente proporcional à viscosidade da membrana. Assim, a incorporação de fosfolípidos com baixa temperatura de transição de fase, como fosfolípidos insaturados ou com cadeias de ácidos graxos curtas, aumentam a taxa de liberação do fármaco se comparados a lipossomos contendo lípidos com alta temperatura de transição de fase, tipicamente com cadeias saturadas e longas (CHARROIS; ALLEN, 2004; FREZARD et al., 2005).

A inclusão de colesterol na membrana tende a aumentar a ordem na organização da bicamada e geralmente reduz a sua permeabilidade.

A natureza e a proporção do lípido acoplado ao polímero de revestimento influenciam também a permeabilidade da membrana dos lipossomos, uma vez que sua

presença causa perturbações no empacotamento dos outros lípidos. Quanto maior a concentração deste lípido, maior a permeabilidade da membrana (YANG; ALEXANDRIDIS, 2000; MAKINO; SHIBATA, 2006).

5.6 Lamelaridade

O número de bicamadas lipídicas (lamelaridade) dos lipossomos influencia a eficiência de encapsulamento, a cinética de liberação do fármaco, e a eficiência de transfecção de material genético (no caso de lipoplexos), portanto é um parâmetro importante a ser considerado (ZUIDAM et al., 1999; FRÖHLICH; BRECHT; PESCHKA-SÜSS, 2001). Geralmente para vesículas de tamanho similar, a liberação do fármaco é maior para lipossomos unilamelares que para multilamelares (YAMAUCHI et al., 2007).

5.7 Ambiente intralipossomal

No meio aquoso interno do lipossomo, os fármacos podem se encontrar dissolvidos ou precipitados (na forma cristalina ou amorfa). Técnicas de encapsulamento como as que envolvem um gradiente eletroquímico transmembrana podem promover a formação de precipitados no interior dos lipossomos. De forma geral pode-se dizer que essas técnicas consistem basicamente no encapsulamento de fármacos que são ionizados no interior dos lipossomos, cujo meio aquoso interno é ácido ou básico em relação ao meio externo (pH fisiológico). Nessas condições, o fármaco não ionizado permeia espontaneamente a bicamada lipídica dos lipossomos pré-formados. Uma vez no interior da vesícula, esse fármaco é ionizado, tornando-se impermeável e permanecendo portanto aprisionado. O fármaco pode também formar um sal no interior da vesícula que quando ultrapassa o limite de solubilidade, leva à sua precipitação (FRITZE et al., 2006; FENSKE; CULLIS, 2008; BARENHOLZ, 2012; GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012).

Assim, nesses casos a razão fármaco-lípido é um fator determinante para a liberação do agente terapêutico (ZUIDAM et al., 1999; JOHNSTON et al., 2006; FENSKE; CHONN; CULLIS, 2008), sendo que uma alta razão fármaco-lípido promoverá liberação *in vivo* mais lenta devido à presença do precipitado no interior do lipossomo (JOHNSTON et al., 2006).

Os precipitados formados no interior da vesícula são muito importantes para a manutenção do encapsulamento durante a armazenagem (BARENHOLZ, 2012), além da influência na taxa de liberação do fármaco conforme mencionado (YAMAUCHI et al., 2007; DRUMMOND et al., 2008).

Conforme representado na **figura 7**, há diferentes formas para gerar um gradiente transmembrana:

- Com uso de tampão ácido, que permanece encapsulado no interior da vesícula após troca do meio externo por um tampão neutro (**figura 7 A**);
- Com uso de soluções contendo sais de bases fracas (ex.:sulfato de Amônio – **figura 7B**) ou ácidos fracos (ex.:acetato de sódio) no interior da vesícula, onde há um equilíbrio entre espécies carregadas e neutras, sendo estas últimas capazes de atravessar a membrana e se deslocar para o meio extralipossomal, uma vez que este encontra-se livre das espécies encapsuladas. Já os prótons liberados ou absorvidos por esses sais permanecem no interior da vesícula gerando o pH ácido ou básico;
- Com o uso de soluções como sulfato de magnésio e manganês e troca do meio externo por um tampão ácido, o que gera um gradiente iônico. A bicamada é impermeável a íons, mas um ionóforo intermedia a saída dos íons divalentes, presentes somente no interior da vesícula e a entrada de um par de prótons, presentes somente no exterior da vesícula, contribuindo para a acidificação do meio interno do lipossomo e gerando então um gradiente de pH. É requerido EDTA para quelar os cátions divalentes no meio externo e assim impulsionar o encapsulamento do fármaco (**figura 7 C**) (FENSKE; CULLIS, 2008).

A manutenção do fármaco encapsulado depende do gradiente eletroquímico transmembrana residual proporcionado pelos íons presentes (BARENHOLZ, 2012), e do ambiente aquoso interno do lipossomo, incluindo volume e concentração dos íons responsáveis pelo gradiente transmembrana, que também influenciam a forma do precipitado (amorfa ou cristalina) bem a extensão da precipitação (ZHIGALTSEVA et al., 2005; BARENHOLZ, 2012).

O perfil de liberação do fármaco depende do pH extralipossomal. A alteração do contra- íon que irá formar o precipitado com o fármaco pode mudar radicalmente o perfil de liberação do fármaco (FRITZE et al., 2006; DRUMMOND et al., 2008; FENSKE; CULLIS, 2008).

Apesar do acima descrito se aplicar a fármacos encapsulados no meio interno aquoso do lipossomo, também foi demonstrado que aumentando-se a concentração de um fármaco lipofílico na bicamada acima de um valor crítico, o fármaco passa a formar agregados (ADLER-MOORE; PROFFITT, 2002).

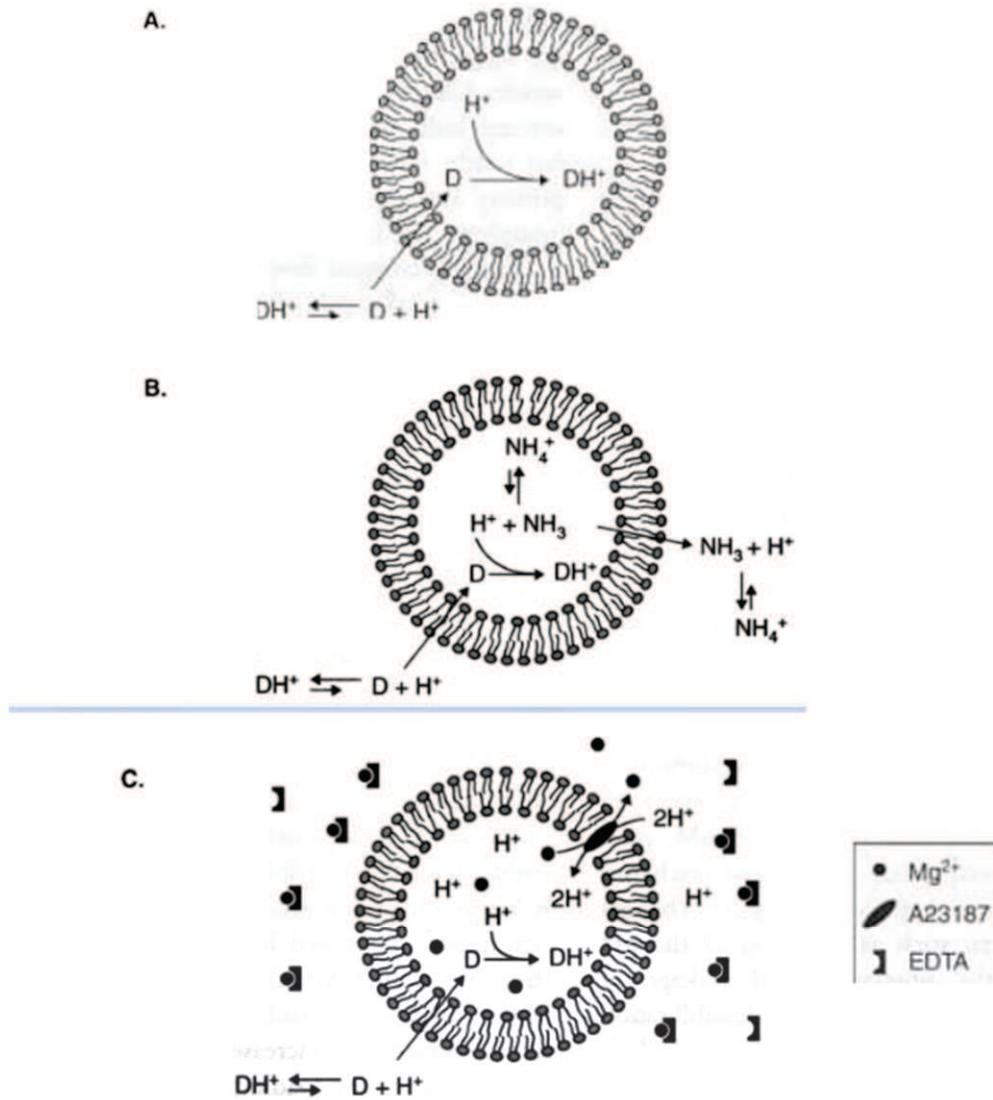


Figura 7 – Representação esquemática do encapsulamento do fármaco em resposta a gradientes de pH transmembrana. A: método de gradiente de pH padrão, com tampão citrato no interior do lipossomo (pH~4) e tampão HEPES no meio externo (pH~7,5). B: um sal de base fraca (sulfato de amônio) é responsável pela geração do gradiente transmembrana à medida que amônia (neutra) sai do interior da vesícula para o meio externo, o que propicia a acidificação do meio interno. C: o gradiente de pH é estabelecido por ionóforos (como o A23187) em resposta a gradientes transmembrana de cátions divalentes como Mg²⁺. O ionóforo acopla o transporte de um cátion divalente para o meio externo ao transporte de dois prótons para o meio interno, propiciando aí um meio ácido. Um quelante como o EDTA é necessário para quelar os cátions divalentes à medida que eles são transportados para fora da vesícula. Fonte: FENSKE; CULLIS, 2008)

5.8 Comportamento da bicamada (sensibilidade a estímulo)

Pode-se dizer que atualmente as estratégias de liberação do fármaco desencadeadas por estímulo baseiam-se em estímulos internos, como pH, temperatura ou presença de enzimas específicas na região alvo, e externos, como fontes de calor, ultrassom, radiação e luz (PURI et al., 2009). Essas estratégias geralmente envolvem a adição de um lípido ou polímero cuja estrutura é alterada mediante um estímulo interno ou externo, o que provoca a desestabilização da bicamada lipídica, liberando o fármaco (DRUMMOND et al., 2008).

5.8.1 Termosensíveis:

A liberação do fármaco de lipossomos termosensíveis baseia-se em mecanismos de desestabilização da bicamada utilizando como base a temperatura de transição de fase da membrana (PURI et al, 2009).

Essa liberação se dá quando os lipossomos se encontram num local onde a temperatura alcança a T_m , o que aumenta significativamente a permeabilidade da membrana permitindo a liberação do fármaco (BANNO et al., 2010; KNEIDL et al., 2014).

Esse aumento de temperatura pode ser proveniente de uma fonte externa (como aplicação de fonte de calor, campo magnético ou ultrassom) ou da própria região alvo, como acontece com alguns tipos de tumor.

Os componentes termosensíveis utilizados podem ser lípides, como a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), ou polímeros como o poli-N-isopropilacrilamida, que possuem temperatura de transição de fase próxima à fisiológica, pouco acima de 37°C (DRUMMOND et al., 2008; KNEIDL et al., 2014). Os lípides também tem sido utilizados nessas formulações tendo em vista sua capacidade de resposta a uma leve hipertermia, como acontece por exemplo em algumas regiões tumorais, permitindo com que os lipossomos liberem o fármaco de forma efetiva no local alvo. Geralmente, quanto maior a concentração dos lípides, mais rápida é a liberação do fármaco (BANNO et al., 2010).

5.8.2 Sensíveis ao pH

Lipossomos sensíveis ao pH são estáveis em pH fisiológico mas se desestabilizam e adquirem propriedades fusogênicas em pH ácido, levando à liberação do seu conteúdo aquoso. Essa propriedade geralmente é conferida pela mistura de fosfatidiletanolamina (PE) ou derivados, e compostos contendo um grupo ácido (ex. grupo carboxílico) que age

como um estabilizador em pH fisiológico. A geometria de cone inverso da PE impede a formação da fase lamelar característica dos lipossomos (**figura 8**). Sendo assim, ao contrário da maioria dos fosfolípides, a PE tende a formar a fase hexagonal inversa acima da temperatura de transição de fase. A presença de moléculas contendo um grupo ácido protonável (carregado negativamente em pH fisiológico) intercaladas à PE, favorece repulsão eletrostática entre essas moléculas permitindo a formação da bicamada, ou seja, em condições fisiológicas os lipossomos estão presentes. Em meio ácido (no compartimento endossomal ou no microambiente do local alvo) o grupo carboxílico (grupo ácido) é protonado e o efeito estabilizador proporcionado pela repulsão entre as moléculas de PE é reduzido, fazendo com que estas adotem a fase não lamelar (hexagonal inversa), o que desestabiliza o lipossomo permitindo a liberação do fármaco (KARANTH; MURTHY, 2007).

Essa propriedade de se manter estável em pH fisiológico e desestabilizar em pH ácido depende do tipo de molécula estabilizadora, bem como da sua razão em relação à PE. (KARANTH; MURTHY, 2007).

Também podem ser usados polímeros e peptídeos fusogênicos que sofrem mudanças conformacionais em pH ácido, aumentando a permeabilidade da membrana no local alvo e permitindo a liberação do fármaco (DRUMMOND et al., 2008).

5.8.3 Sensíveis a ultrassom

As ondas de ultrassom podem ser usadas para induzir efeitos térmicos ou mecânicos. Ou seja, a liberação do fármaco pode se dar tanto mediante a elevação da temperatura quanto aos efeitos mecânicos das ondas ultrasônicas. O efeito provocado pela elevação da temperatura é equivalente àquele descrito para lipossomos termosensíveis. Já os efeitos mecânicos são proporcionados pelo encapsulamento de microbolhas de gás nos lipossomos contendo o fármaco. Essas microbolhas se expandem mediante a ação das ondas de ultrassom causando estresse na bicamada lipídica, formando poros transitórios por onde o fármaco é liberado. A composição do lipossomo e do gás encapsulado, assim como os parâmetros do ultrassom, determinam a sensibilidade das vesículas ao estímulo. Alguns constituintes do lipossomo, tais como lipopolímeros, têm a capacidade de absorver energia ultrasônica proporcionando a formação desses poros na bicamada lipídica através dos quais o fármaco é liberado (HUANG, 2008; SCHROEDER et al., 2009).

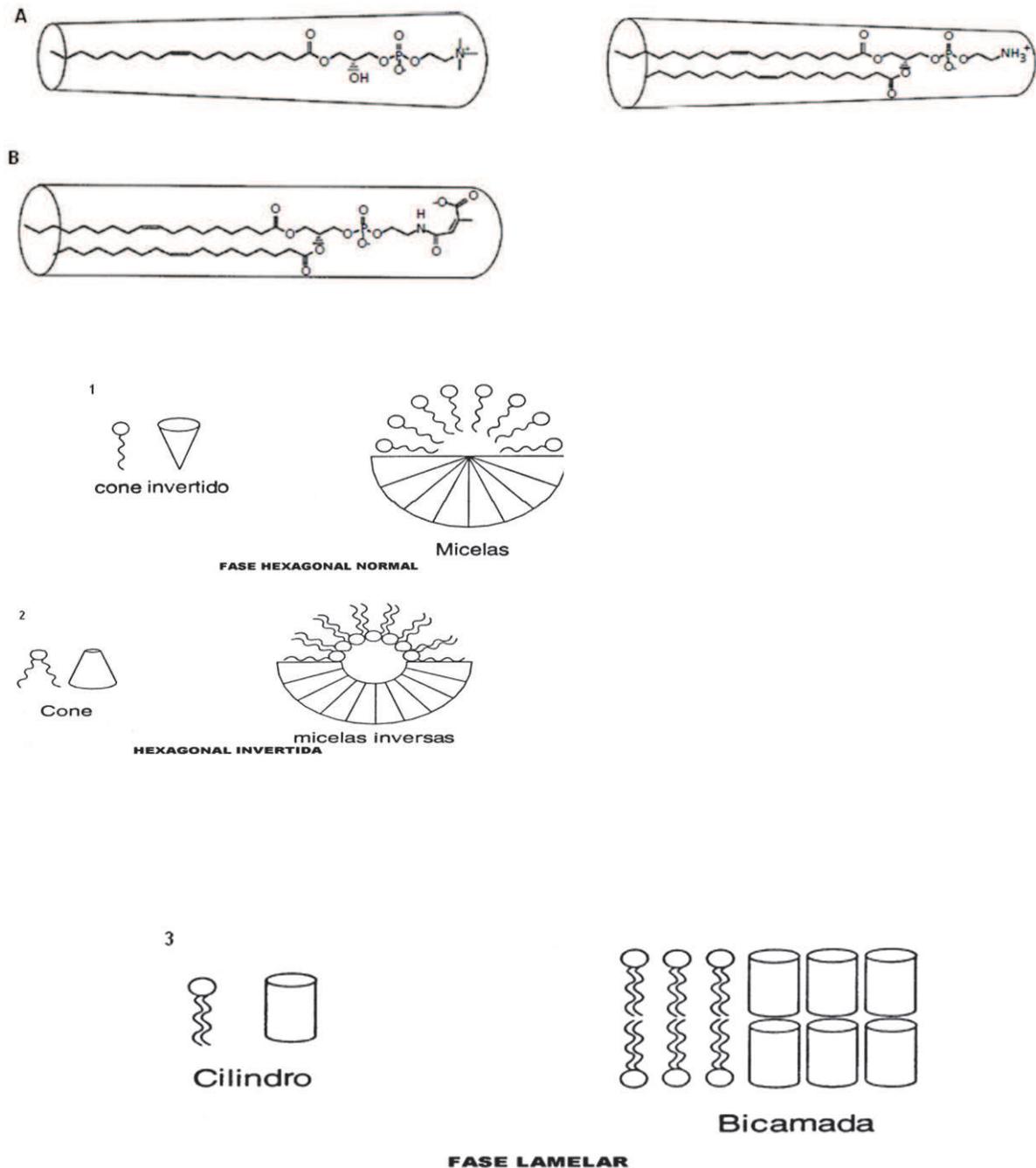


Figura 8- Diferentes estruturas formadas pelos lípidos. A- Lípidos com uma única cadeia acila ou alquila como os lisolípides ou lípidos com grupo cabeça polar fracamente hidratados com uma área molecular pequena em relação às cadeias acila possuem forma cônica, que dá origem a micelas (1) e micelas invertidas (2). B- A maioria dos forfolípides têm uma área de secção transversal equivalente entre o grupo cabeça polar e as cadeias acila, proporcionando ao lípide uma forma cilíndrica, que permite a formação da bicamada (3). Fonte: LASIC, 1998; KARANTH; MURTHY, 2007

5.8.4 Sensíveis à luz

Compostos fotossensíveis são capazes de mudar suas propriedades ou estrutura quando irradiados com luz de comprimento de onda apropriado (WANG et al., 2010). Assim, quando incorporados aos lipossomos, estes os tornam fotossensíveis, respondendo a estímulos de luz visível, ultravioleta (UV), infra-vermelha (IR) e infra- vermelha próxima (NIR) dependendo do composto. A alteração das propriedades ou da estrutura do composto fotossensível o torna incapaz de manter a estrutura da bicamada, o que aumenta sua permeabilidade com consequente liberação do fármaco (SHUM; KIM; THOMPSON, 2001; DANHIER; PRÉAT; FERON, 2010).

Esses lipossomos têm sido usados para terapias fotodinâmicas (PDT). Essa técnica utiliza agentes fotossensibilizadores incorporados no interior aquoso dos lipossomos, que após estímulo luminoso se oxidam gerando espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas, utilizadas principalmente para tratamento de câncer. No caso da PDT, a liberação do fármaco se dá tanto pela ação da fonte de luz nos compostos fotossensíveis da bicamada quanto pelo agente fotossensibilizador encapsulado, cujos produtos de oxidação irão desestabilizar a membrana (DERYCKE; WITTE, 2004).

Os lipossomos sensíveis à luz UV e visível são utilizados atualmente para tratamento de lesões superficiais, dada a capacidade de penetração limitada da luz nos tecidos (DERYCKE; WITTE, 2004; FOMINA; SANKARANARAYANAN; ALMUTAIRI, 2012). O Visudyne®, utilizado para degeneração macular, é um exemplo do uso de PDT. Ele contém como princípio ativo encapsulado um agente fotossensibilizador que após administrado por via intravenosa, deve ser ativado por meio de luz visível (689nm) no local alvo (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014a).

5.8.5 Sensíveis à ação de enzimas

Outra estratégia que tem sido explorada para liberação controlada de fármacos, baseia-se na produção anormal de enzimas como proteases, lipases e glicosidases no local alvo. Essas enzimas são utilizadas para clivar lípides ou outros componentes da membrana lipossomal provocando defeitos na membrana com consequente liberação do fármaco (PURI et al., 2009; RICA; AILI; STEVENS, 2012).

5.9 Interação com a superfície celular

A liberação do fármaco do interior das vesículas se dá basicamente através de interações dos lipossomos com as células (HUNT, 1982).

Essas interações iniciais dos lipossomos com a superfície celular podem ser de quatro tipos conforme demonstrado na **figura 9**: adsorção; endocitose; fusão e troca de componentes lipídicos entre os lipossomos e a membrana celular. A fusão dos lipossomos com a membrana plasmática da célula, embora teoricamente possível, não é comum. A endocitose e a fusão com a membrana endossomal intracelular, precedidas de uma interação específica com receptor de superfície celular ou de uma adsorção superficial, são os mecanismos mais comuns de captação e internalização dos lipossomos que levam à liberação do fármaco no caso de vários tipos de células. Essas interações celulares são altamente dependentes da composição do lipossomo, tamanho, carga e presença de componentes específicos como os direcionadores (KAMPS; SCHERPHOF, 2003; FREZARD et al., 2005; QIAN; LI; ZUO, 2012). No entanto, o modo de captação de um lipossomo também depende do tipo de célula em questão (DAN, 2002).

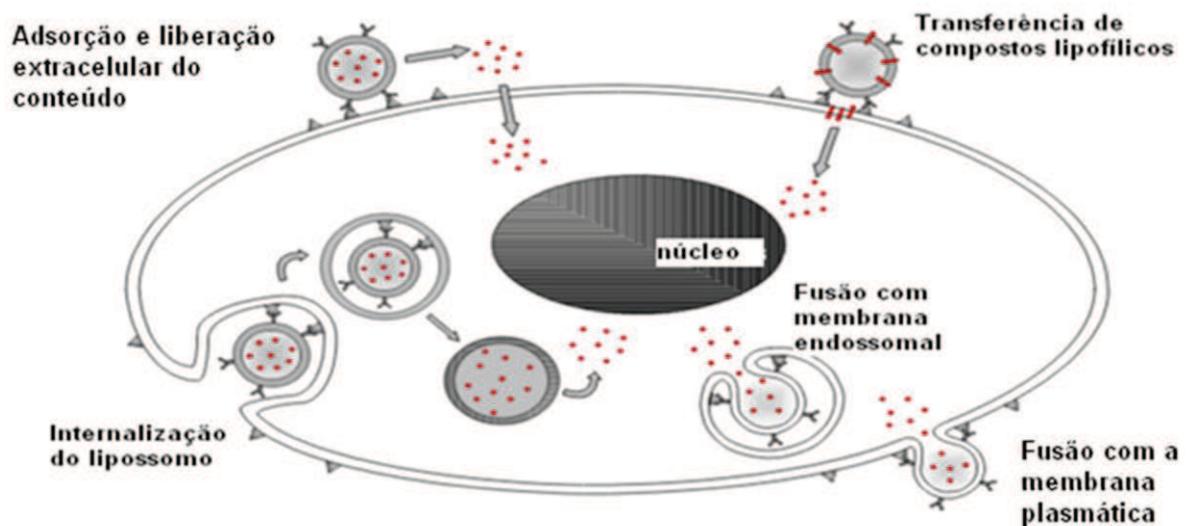


Figura 9 – Possíveis vias de liberação do fármaco do lipossomo. Fonte: KAMPS; SCHERPHOF, 2003.

Existem várias vias endocíticas através das quais os lipossomos podem ser internalizados pelas células (HUTH; SCHUBERT; PESCHKA-SUSS, 2007):

- Endocitose mediada por receptor: a membrana celular possui depressões revestidas por clatrina, que concentram proteínas (receptores) para internalização. Após ligação com o

receptor, formam-se vesículas revestidas que são transportadas para o interior da célula. Esse processo de formação e internalização das vesículas ocorre continuamente, permitindo o transporte do conteúdo da vesícula formada para o interior da célula, onde se funde com outras vesículas a fim de formar os endossomos;

- Endocitose mediada por cavéolos: invaginações na membrana plasmática contendo principalmente uma proteína denominada caveolina, permitem a internalização de substâncias e partículas de forma semelhante à descrita acima. Porém, nesse caso as substâncias internalizadas escapam do sistema endossomal podendo ser entregues em outros compartimentos;
- Fagocitose: realizada principalmente por fagócitos “profissionais” como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Essas células produzem expansões da membrana plasmática (pseudópodes) que envolvem as partículas internalizando-as;
- Macropinocitose: ocorre de forma semelhante à fagocitose mas pode ser realizada por vários tipos de células mediante estímulo de partículas (HUTH; SCHUBERT; PESCHKA-SUSS, 2007).

Lipossomos obtidos a partir de componentes virais, como lípides e proteínas de membrana (denominados virossomos) (DAEMEN et al., 2005), ou obtidos através da fusão de lipossomos com vírus inativados (KUNISAWA; NAKAGAWA; MAYUMI, 2001) são também utilizados para a entrega de fármacos no interior das células. Nesses casos, a fusogenicidade é de extrema importância para a atividade do fármaco (DAEMEN et al., 2005). A fusão dos lipossomos com a membrana endossomal (fusogenicidade), que permite a liberação do fármaco no citosol, pode ser promovida por lípides capazes de formar a fase hexagonal de tipo 2. Lipossomos contendo fosfatidiletanolamina como o dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) são exemplos típicos (BRGLES et al., 2009; FORIER et al., 2014).

Apesar de a endocitose ser o principal mecanismo através do qual o fármaco é liberado dos lipossomos, o primeiro passo para sua internalização é a ligação das nanopartículas à membrana celular. Esta ligação é muito influenciada pela carga elétrica superficial, mais especificamente a razão de carga entre lipossomo e célula (DAN, 2002). Geralmente, lipossomos carregados positivamente se ligam em maior extensão às células por causa de interações eletrostáticas com a superfície celular carregada negativamente, o que possivelmente induz a endocitose (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; DUAN; LI, 2013; FORIER et al., 2014).

Polímeros como o PEG aumentam o tempo de circulação dos lipossomos, mas podem melhorar ou prejudicar a sua interação com as células, podendo comprometer sua captação, dependendo da concentração utilizada. (DUAN; LI, 2013; POZZI et al., 2014). A

espessura da camada de PEG também influencia esses efeitos (BOROWIK et al, 2005; DAN, 2002).

Além disso, o acoplamento de um ligante ao polímero promove a interação da vesícula com um receptor de superfície celular e a endocitose mediada por receptor.

O tamanho das vesículas também afeta sua captação pelas células e a forma e via como os lipossomos são endocitados (DUAN; LI, 2013).

5.10 Quantidade de fármaco encapsulado

Conforme já descrito, uma ação terapêutica eficaz depende da concentração adequada do fármaco no local alvo. Para que esse objetivo seja atingido, vários fatores devem ser considerados, conforme discutido nos itens anteriores. Porém, todos os esforços nesse sentido serão em vão se não houver a quantidade suficiente de fármaco encapsulado dentro das vesículas, uma vez que essa é a condição inicial para se obter a ação terapêutica desejada.

Um dos critérios para se ter sucesso no direcionamento do fármaco para o tecido alvo é ser capaz de encapsular uma grande quantidade de fármaco (RUENRAROENGSACK et al., 2010). O processo produtivo, mais especificamente a forma com que o fármaco é encapsulado, determina a quantidade de fármaco incorporada. Para fármacos anfipáticos, que são bases fracas ou ácidos fracos, a técnica de encapsulamento em lipossomos pré-formados, utilizando gradiente eletroquímico transmembrana é atualmente a principal forma para se alcançar uma alta taxa de encapsulamento (ZUCKER et al., 2009).

6. FATORES QUE AFETAM A TOXICIDADE DE MEDICAMENTOS LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS

Apesar de os lipossomos serem reconhecidos por sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, as formulações lipossomais podem gerar toxicidades não encontradas com a administração do fármaco livre. As causas podem ser uma biodistribuição diferente do fármaco, com resultado do acúmulo dos lipossomos em órgãos diferentes ou toxicidades específicas do carreador devido, por exemplo, ao tamanho das vesículas, aos seus constituintes e a seus produtos de degradação.

A **figura 10** traz um diagrama de causa e efeito (Ishikawa) contendo os fatores que impactam a toxicidade de uma formulação lipossomal injetável. A estabilidade físico-química da formulação é um dos fatores que influencia a sua toxicidade. Porém, isso não será abordado nesse item uma vez que há uma discussão à parte sobre o tema no item 7. Assim,

os fatores que influenciam a estabilidade da formulação não serão apresentados como fatores que influenciam a toxicidade.

6.1 Embolismo

A possibilidade da ocorrência de embolismo está essencialmente relacionada ao tamanho das vesículas ou à sua agregação. Conforme descrito no item 7.1.1, uma formulação está sujeita à agregação em razão de instabilidade físico-química tanto durante o processo produtivo, quanto durante o período de armazenagem do produto. Também pode ocorrer instabilidade plasmática. Os lipossomos podem formar microagregados, principalmente se constituídos de lípidos neutros, o que pode causar oclusão da microvasculatura pulmonar e cerebral e embolia após injeção intravenosa, uma vez que usualmente estes são os primeiros locais com vasos sanguíneos pequenos encontrados (TOLENTINO et al., 2004; BIGBY, 2003).

No caso de emulsões lipídicas injetáveis, a farmacopéia americana estabelece um limite de tamanho de partícula de 5µm (UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY, 2014).

Lipossomos carregados negativamente interagem com plaquetas de forma dose-dependente formando agregados que podem se acumular em órgãos como o pulmão (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

A embolia pulmonar é um dos eventos adversos identificados pós-comercialização do Doxil (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014c), e este efeito também consta na bula do Abelcet (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014b).

A composição lipídica dos lipossomos, especialmente no caso dos catiônicos, influencia sua interação com os eritrócitos, podendo induzir a fusão desses últimos e conseqüentemente ocasionar embolia pulmonar (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; WOJEWODZKA; PAZDZIOR; LANGNER, 2005).

Componentes de revestimento como o PEG, presentes em concentrações adequadas, evitam agregação dos lipossomos, conforme descrito no item 7.1.4, porém em grandes quantidades podem favorecer a formação de microagregados.

6.2 Reações dérmicas/mucosites

A pegulação diminui o reconhecimento dos lipossomos pelo sistema reticuloendotelial, aumentando seu tempo de circulação e conseqüentemente reduzindo sua eliminação do organismo. Isso contribui para a eficiência da ação do fármaco, mas

pode também aumentar a incidência de algumas reações adversas. Dependendo do seu tamanho, as vesículas podem extravasar através de espaços mais largos existentes entre as células endoteliais, encontrados tipicamente nos vasos que irrigam regiões tumorais . Podem também extravasar em outras áreas com alteração da permeabilidade microvascular devido à sua fragilidade, como o que ocorre quando vasos são danificados por meio de fricções repetidas ou traumas, o que propicia o extravasamento das vesículas para os tecidos circundantes, permitindo a ação do fármaco nessa região e conseqüente toxicidade cutânea. Quanto maior o tempo de circulação proporcionado por componentes de revestimento, como o PEG, maior a chance de ocorrer tal extravasamento. Exemplos de regiões onde é passível a ocorrência de tal efeito são a palma das mãos, planta dos pés, axilas, e outras superfícies sujeitas à fricção ou calor (CHARROIS; ALLEN, 2003; O'BRIEN et al., 2004; KIM et al., 2005; MANGILI et al., 2008; CHANG; YEH, 2012; GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012).

6.3 Hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade observadas com alguns medicamentos lipossomais, como dispnéia, taquipnéia, calafrios, dor no peito e nas costas, hipo e hipertensão, também denominadas reações infusionais, acontecem após a primeira exposição ao medicamento lipossomal, sem uma sensibilização anterior. Essas reações são atribuídas à ativação do sistema do complemento pelas vesículas lipossomais em indivíduos sensíveis, e são denominadas pseudoalergia relacionada à ativação do sistema do complemento (CARPA) (SZEBENI et al., 2002; MOGHIMI; HAMAD, 2008).

O sistema do complemento é composto de várias proteínas séricas solúveis que possuem funções únicas e envolve uma cascata de reações que resulta em permeabilidade vascular aumentada, atração de leucócitos para o local de inflamação e aumento de fagocitose e lise celular (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002). Lipossomos com fosfolípidos insaturados podem ativar o sistema do complemento de forma mais potente que os fosfolípidos saturados. Lipossomos carregados positivamente como os lipoplexos ou negativamente, podem ativar o sistema do complemento, enquanto lipossomos neutros mostram ativação de menor intensidade (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; SZEBENI et al., 2002; HOET et al., 2009; LETTIERO et al., 2012; QIAN; LI; ZUO, 2012).

Vários estudos demonstram a ativação do sistema do complemento após administração de produtos lipossomais como Doxil e Ambisome, sendo que as reações infusionais são proporcionais à dose de lípidos administrada (CHANAN-KHAN et al., 2003; SZEBENI et al., 2012). Além disso a morfologia do lipossomo, como demonstrado para o Doxil, e o tamanho das vesículas podem influenciar a ativação do complemento (SZEBENI,

2005; BARENHOLZ, 2012). Quanto maiores os lipossomos, mais eficiente é essa ativação, provavelmente pela maior área superficial disponível para reconhecimento do sistema do complemento (HARASHIMA et al., 1996).

Moléculas que apresentam epítomos repetitivos ou que contém porções amina e hidroxil como no caso do revestimento polimérico dos lipossomos com glicoproteínas e PEG por exemplo, também favorecem a imunogenicidade e ativação do sistema do complemento (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; MOGHIMI et al., 2011; GABIZON; SHMEEDA; GRENADER, 2012; LETTIERO et al., 2012).

Uma outra forma de ativação é a produção de anticorpos após administrações repetidas, como o que ocorre com lipossomos peguilados. Nesse caso há produção de anticorpos anti-PEG que ativam o sistema do complemento acelerando o processo de eliminação dos lipossomos da corrente sanguínea (fenômeno ABC) (BUYENS et al., 2012). A configuração do polímero de revestimento pode influenciar essa ativação. Aumentando a densidade da cadeia do PEG por exemplo, da configuração “cogumelo” para a configuração “escova”, há uma redução dos produtos da ativação do complemento (ZASADZINSKI, 2011).

6.4 Acúmulo de fármaco e outros efeitos indesejados em órgãos não alvo

Uma grande porcentagem dos lipossomos convencionais injetados por via intravenosa é removida da circulação pelas células do RES, especialmente pelas células de Kupffer no fígado (PARNHAM; WETZIG, 1993). As vesículas lipossomais podem apresentar acumulação aumentada no fígado, principalmente com o aumento do seu tamanho (PARNHAM; WETZIG, 1993; OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; BUYENS et al., 2012). No entanto, a distribuição dos lipossomos depende também da sua composição lipídica. Foi demonstrado acúmulo de lipossomos de 400nm contendo fosfatidilserina (PS) nos hepatócitos de ratos após injeção intravenosa, o que não ocorreu com lipossomos do mesmo tamanho contendo fosfatidilglicerol (KAMPS; SCHERPHOF, 2003).

Por outro lado, lipossomos de aproximadamente 300nm ou maiores tendem a acumular no baço, assim como lipossomos peguilados (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002; KAMPS; SCHERPHOF, 2003).

Geralmente, quanto menor a razão fármaco-lípide maior a toxicidade da formulação lipossomal. Para uma dose constante do fármaco, a diminuição da razão fármaco-lípide resulta em aumento da dose de lípide. Tal aumento pode levar a uma maior longevidade dos lipossomos na circulação, o que também pode aumentar o acúmulo do fármaco livre em órgãos e tecidos associados à toxicidade (MAYER, 1989).

6.5 Alta concentração da droga livre no plasma

Um motivo de alta concentração de fármaco livre na circulação é se este estiver presente na formulação sob a forma não encapsulada. A etapa de remoção do fármaco livre, através por exemplo de ultrafiltração, ultracentrifugação, cromatografia por exclusão de tamanho, é crítica, e se não for realizada de forma satisfatória, ou seja, se algum dos parâmetros operacionais apresentar desvios, se as instruções não forem corretamente seguidas ou se a etapa não tiver sido validada, pode haver na formulação uma concentração de fármaco livre maior que a estabelecida, o que pode culminar em toxicidade para tecidos não alvo.

Além disso, se a concentração de PEG utilizada for maior que a requerida, podem existir micelas na formulação concomitantemente aos lipossomos, o que aumenta a permeabilidade da membrana e possibilita a presença de droga livre na formulação (POOLE JR.; OWENS, 2003; SANDSTROM; JOHANSSON; EDWARDS, 2007; BUYENS et al., 2012).

No entanto, ainda que reste somente fármaco encapsulado após a etapa de separação, é preciso garantir que a formulação se manterá estável durante seu prazo de validade. Como descrito no item 7.4.1.1, vários fatores podem influenciar a liberação indevida do fármaco na formulação durante esse prazo.

Outro grande desafio no que se refere à manutenção do fármaco encapsulado, é manter os lipossomos íntegros na circulação sanguínea. A instabilidade plasmática é a principal razão de liberação precoce do fármaco, sendo que os fatores que a influenciam foram descritos no item 5.1. É importante notar que a liberação precoce do fármaco também está relacionada à forma com que este se encontra no interior da vesícula, uma vez que somente o fármaco solubilizado será capaz de atravessar a bicamada (ZHIGALTSEVA et al., 2005).

6.6 Alterações celulares (hemólise, agregação celular, etc)

Conforme descrito no item 6.1, a composição lipídica e a presença de carga nos lipossomos exerce forte influência nas interações com componentes plasmáticos, podendo provocar toxicidade (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

Lípides e componentes não fosfolipídicos que conferem carga negativa ao lipossomo podem exercer efeitos indesejados no organismo como aumento da agregação de trombócitos após administração intravenosa (PARNHAM; WETZIG, 1993).

Pode haver transferência de fosfolípidos da bicamada lipídica dos lipossomos para células como os eritrócitos (células sanguíneas mais numerosas), o que pode causar

desestabilização da membrana celular e conseqüentemente agregação e fusão destes (NISHIYA; LAM, 1995).

Lipossomos carregados positivamente (lipoplexos) também têm grande propensão para interagir com as células. A composição lipídica influencia essa interação, por exemplo, lipoplexos compostos de lipídeos que conferem à bicamada uma estrutura rígida e estável, não induzem a fusão dos eritrócitos. Já os lipídeos que propiciam maior fluidez à membrana induzem essa fusão, aumentando a citotoxicidade dos lipossomos (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

7. FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS LIPOSSOMAIS INJETÁVEIS

Conforme descrito até aqui, pode-se concluir que a tarefa de produzir um medicamento lipossomal com qualidade adequada não é simples. Vários fatores influenciam sua eficácia e segurança e devem ser considerados durante o processo produtivo.

As formulações lipossomais podem trazer muitos benefícios para o paciente, porém podem ocorrer efeitos danosos se houver mudanças imprevistas ou indesejadas na qualidade e desempenho do produto (XU; BURGESS; KHAN, 2012).

Uma das principais etapas limitantes do uso dos lipossomos é a sua estabilidade química e física. Os efeitos produzidos por eventuais problemas de estabilidade afetam o comportamento *in vivo* dos lipossomos (RUOZI et al., 2005). Uma vez desenvolvida para ser disponibilizada no mercado, a formulação lipossomal deve ser estável durante todo o período de armazenagem mantendo suas características antes de atingir o tecido alvo e produzir sua ação. Nas últimas três décadas, foi dada uma atenção considerável ao estudo e à otimização da estabilidade dos lipossomos, mas ainda há muito trabalho para se alcançar condições ideais para sua aplicação (YADAV et al., 2011).

A **figura 11** traz um diagrama de Ishikawa contendo os fatores que impactam a estabilidade de uma formulação lipossomal injetável.

A estabilidade da formulação lipossomal pode ser classificada em física, química e biológica, sendo que todas estão inter-relacionadas. A estabilidade de prateleira (*shelf life*) dos lipossomos é determinada pela estabilidade química e física (YADAV et al., 2011). Uma maior estabilidade da bicamada (em termos de retenção do fármaco pelas vesículas), favorece um maior tempo de meia vida do fármaco na circulação. Quando se trata da estabilidade de sistemas de liberação de fármacos lipossomais, há dois aspectos importantes a serem considerados: os componentes da bicamada lipídica podem sofrer

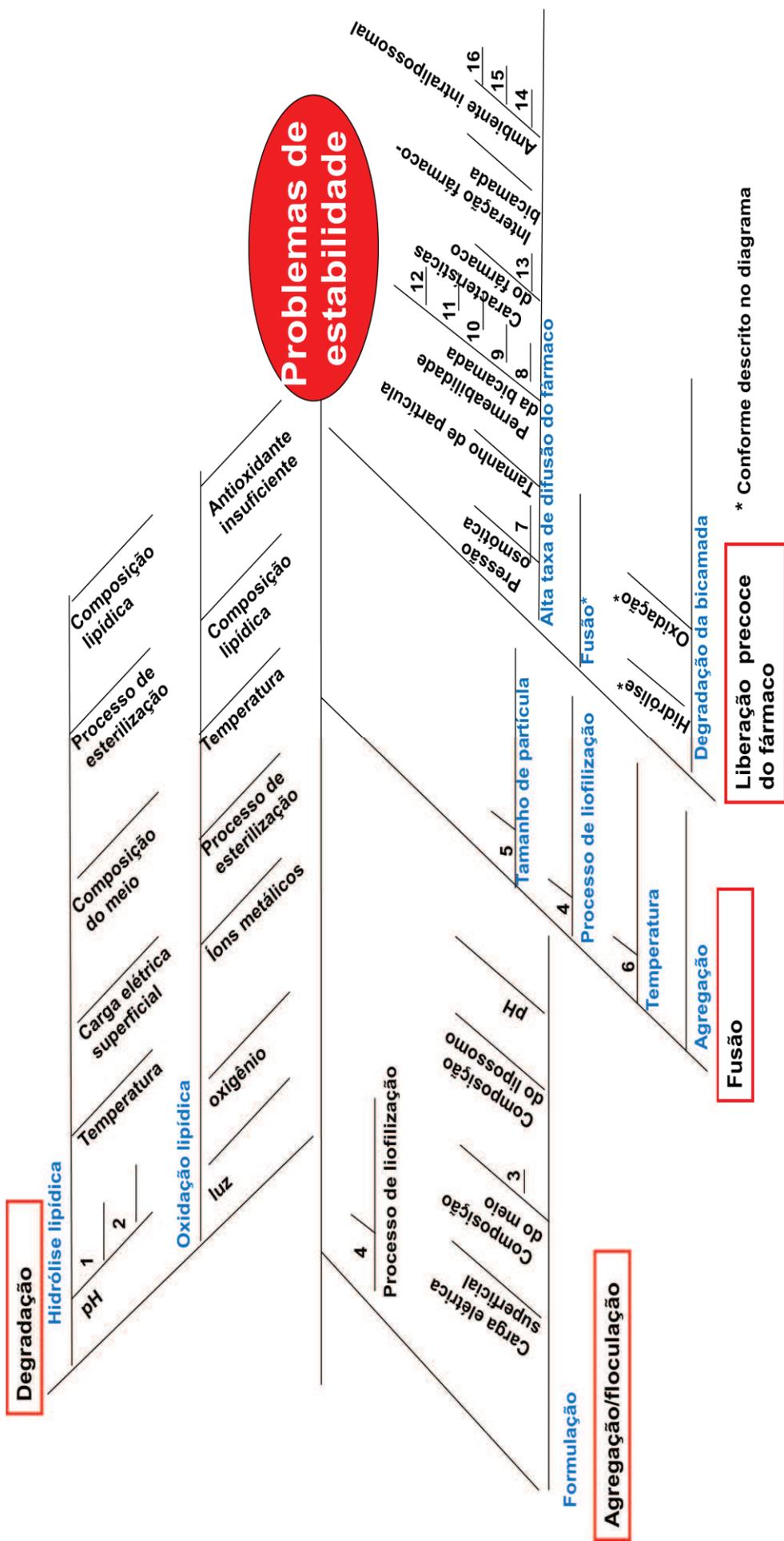


Figura 11 - Fatores que impactam a estabilidade de uma formulação lipossomal injetável. A composição do lipossomo inclui identidade e concentração dos lípides e componentes de revestimento. 1- acidez; 2- basicidade; 3- presença de íons polivalentes/alta força iônica; 4- crioproteção não efetiva; 5- processo produtivo; 6- temperatura próxima à transição de fase; 7- variação da força iônica; 8- composição do lipossomo; 9- temperatura; 10- pH; 11- força iônica; 12- hidratação da bicamada; 13- coeficiente de partição óleo-água; 14- método de encapsulamento; 15- forma cristalina do fármaco; 16- gradiente de pH transmembrana.

degradação química por hidrólise ou oxidação e a estrutura dos lipossomos pode ser afetada por processos físicos como agregação/ floculação e fusão/ coalescência. A ocorrência desses fenômenos resultam em diminuição da qualidade dos produtos lipossomais (ZHANG; PAWELCHAK, 2000; YADAV et al., 2011).

A estabilidade química e física dos lipossomos está intimamente relacionada à presença de bicamadas lipídicas mecanicamente fortes e bem empacotadas, o que reduz o acesso de agentes oxidantes e hidrolisantes (ZHANG; PAWELCHAK, 2000).

Como os lípides usualmente formam a espinha dorsal da bicamada, sua estabilidade é muito importante (YADAV et al., 2011). Transformações químicas e físicas desses lípides podem mudar a estrutura do sistema lipossomal, o tamanho e distribuição de partículas, a capacidade de encapsulamento com liberação precoce do fármaco, as propriedades interfaciais e o seu comportamento *in vivo* (GRIT; CROMMELIN, 1993a; HEURTAULT et al., 2003).

Para evitar os problemas de degradação dos fosfolípides, em algumas situações estes são substituídos por surfactantes não iônicos em formulações denominadas niossomos (KAZI et al., 2010). Porém este tipo de vesícula não está sendo abordada neste trabalho principalmente pelo fato dos surfactantes serem geralmente mais tóxicos que os fosfolípides.

7.1 Agregação (floculação):

7.1.1 Por que ocorre

A agregação consiste na formação de estruturas maiores de material lipossomal (**figura 12**). Essas unidades ainda são compostas de lipossomos individuais. Em princípio esse processo é reversível, com aplicação de forças de cisalhamento leves, mudança da temperatura ou quelando os íons metálicos que podem ter iniciado a agregação (YADAV et al., 2011).

Quando em dispersões aquosas, forças de atração entre as vesículas (em geral forças de Van der Waals) fazem com que elas se agreguem (HEURTAULT et al., 2003). A formação de agregados lipossomais é um fenômeno natural e inevitável para membranas que não possuem carga elétrica líquida (GRIT; CROMMELIN, 1993a; SWAROOP KUMAR, 2011) ou estabilização estérica.

A carga elétrica superficial dos lipossomos é um importante parâmetro que gera um potencial elétrico de superfície responsável pelas interações eletrostáticas entre as vesículas e as moléculas, partículas e superfícies ao seu redor.

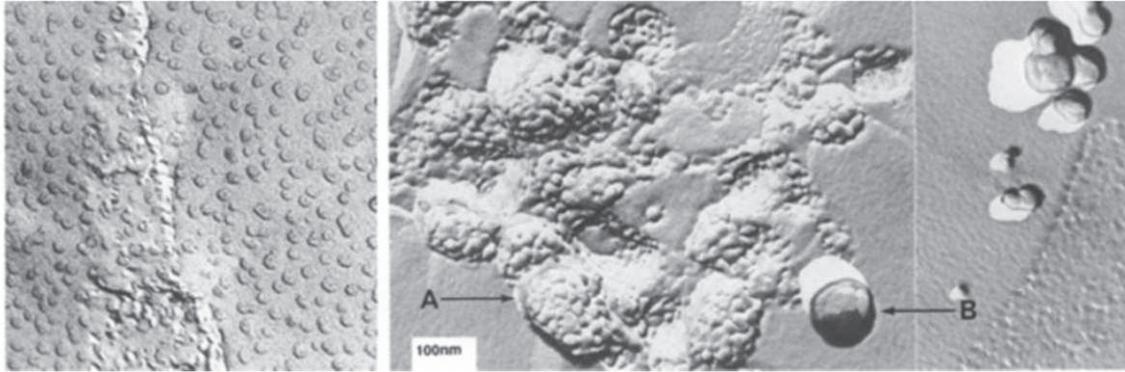


Figura 12: Microscopia eletrônica de criofatura de vesículas lipossomais contendo DPPC (dispersão aquosa). A imagem à esquerda mostra as vesículas íntegras, homodispersas. Na imagem à direita, as setas A e B indicam respectivamente as vesículas agregadas e fundidas. Fonte: KOMATSU; OKADA, 1995.

Esse potencial é determinado não somente pela estrutura dos componentes da bicamada, mas também pela composição do meio aquoso, incluindo pH e força iônica (GRIT; CROMMELIN, 1993a; VAN BALEN et al., 2004; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

Mesmo lipossomos providos de carga líquida podem sofrer agregação quando se encontram num meio aquoso com alta concentração de eletrólitos (alta força iônica), uma vez que estes podem exercer um efeito de blindagem da carga dos lipossomos favorecendo sua agregação (GRIT; CROMMELIN, 1993a; BARALDO et al., 2002).

Durante a etapa de congelamento do processo de liofilização, os cristais de gelo formados podem causar um estresse mecânico na bicamada lipossomal, alterando a sua organização estrutural e tornando-a propensa à agregação. Na etapa de desidratação, o aumento abrupto da concentração de soluto pode induzir degradação química dos lipossomos (STARK; PABST; PRASSL, 2010; IZUTSU; YOMOTA; KAWANISHI, 2011). Dessa forma o uso insuficiente, inadequado ou a não utilização de crioprotetores (em geral açúcares como trealose e sacarose) durante o processo de liofilização favorece o processo de agregação das vesículas (ENGEL et al., 1994; JONGE et al., 2007).

7.1.2 Consequências

A agregação/floculação resulta na variação da carga elétrica e do tamanho dos lipossomos, duas propriedades que possuem um importante papel no direcionamento de fármacos, e na interação com células e componentes plasmáticos (ALONSO et al., 1995; LIAN; HO, 2001; YADAV et al., 2011).

A distribuição de tamanho das partículas é uma característica chave para o sistema carreador do fármaco. Sua biodistribuição, o acesso aos tecidos alvo, o tempo de

circulação dos lipossomos na corrente sanguínea, bem como potencial toxicidade são dependentes dessa característica (LIAN; HO, 2001; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

7.1.3 Como detectar

Quando ocorre esse fenômeno, as partículas apresentam um aumento do seu diâmetro. O aumento da proporção de partículas de maior tamanho ao longo do tempo pode ser um indicador de instabilidade física. Mudanças na intensidade da luz espalhada, no raio hidrodinâmico e distribuição de tamanho evidenciam as interações intervesiculares como a agregação (XIA; SUN; LIANG, 2014).

Há diferentes métodos para detectar essa alteração de tamanho conforme descrito no item 9.1.

O potencial zeta também pode ser utilizado para monitorar o processo de agregação. Quase todas as partículas em contato com um líquido adquirem carga elétrica na sua superfície gerando um potencial elétrico chamado de potencial zeta. A agregação/fusão altera o perfil eletrostático da formulação, alterando o potencial zeta. Os detalhes dessa técnica são discutidos no item 9.2.

7.1.4 Como evitar

Existem dois mecanismos básicos que contribuem para a estabilidade de uma dispersão coloidal: repulsão estérica e repulsão eletrostática. A estabilização estérica envolve a adição de polímeros à superfície lipossomal, o que evita o contato entre as partículas. A estabilização eletrostática é o efeito da repulsão eletrostática das partículas em razão da distribuição de cargas no sistema.

As forças de Van der Waals promovem a atração entre os lipossomos, enquanto a repulsão eletrostática promove o efeito contrário. Assim, a presença de forças eletrostáticas repulsivas, proporcionadas pelo aumento da densidade de carga na superfície lipossomal (ALONSO et al., 1995; SWAROOP KUMAR, 2011), e a redução da concentração de eletrólitos (NACKA et al., 2001), permitem uma estabilização da formulação. Ou seja, para vesículas não estabilizadas estericamente, quanto maior a densidade de carga na superfície lipossomal proporcionada pelos lípidos carregados incorporados à bicamada, maior o valor do potencial zeta e menor a propensão à agregação. O aumento da concentração de eletrólitos no meio aquoso da formulação exerce um efeito de blindagem das cargas da superfície lipossomal, reduzindo a repulsão eletrostática e favorecendo a agregação. De forma contrária, um meio aquoso com baixa força iônica propicia um

aumento de repulsão entre as partículas (GRIT; CROMMELIN, 1993a; HUPFELD et al., 2010).

A viscosidade do meio também influencia a agregação das vesículas lipossomais, sendo que o seu aumento tende a evitar a agregação (ALONSO et al., 1995).

Já no caso da estabilização estérica, a incorporação de lípidos conjugados com polímeros hidrofílicos na superfície lipossomal, forma uma camada adicional de hidratação, reduzindo as forças atrativas entre as vesículas e aumentando as forças repulsivas proporcionadas pela hidratação, por forças eletrostáticas e pelo fator estérico (LIAN; HO, 2001; GARBUZENKO; BARENHOLZ; PRIEV, 2005; OWEN; STRASTERS; BREYER, 2005). A incorporação desses polímeros geralmente produz um efeito de blindagem da carga superficial, o que tende à redução de repulsão eletrostática e diminuição do potencial zeta. Porém a estabilização das vesículas se dá de forma física, sendo que a espessura da superfície polimérica é um fator determinante para que o contato entre membranas lipossomais vizinhas seja dificultado (YAROSLAVOV et al., 2011). Vários estudos têm determinado o tamanho ótimo do polímero hidrofílico bem como sua densidade ótima na superfície lipossomal a fim de obter maior estabilidade da formulação (GARBUZENKO; BARENHOLZ; PRIEV, 2005).

Uma outra forma de melhorar a estabilidade física e química das formulações lipossomais é através de remoção da água. O processo mais comumente utilizado para este fim é a liofilização ou *freeze-drying*, que consiste em remover a água de uma amostra congelada através de sublimação sob vácuo (SAETERN et al., 2005; ABDELWAHED et al., 2006).

Os parâmetros da liofilização devem ser ajustados para cada formulação. A temperatura, pressão e tempo de liofilização afetam a qualidade do produto final. Além disso, devem ser utilizados crioprotetores em quantidades suficientes para evitar mudanças na distribuição do tamanho de partículas durante o processo (CHEN et al., 2010). O efeito dos crioprotetores, como os açúcares trealose e sacarose, está relacionado à habilidade de interação direta destes com a cabeça polar dos fosfolípidos através da formação de pontes de hidrogênio no lugar da água. Como não cristalizam, os crioprotetores formam uma matriz amorfa em torno das vesículas durante a etapa de congelamento substituindo os cristais que seriam formados pela água e evitando a danificação da bicamada lipídica e conseqüentemente a agregação e a fusão dos lipossomos. O tipo e a quantidade utilizada do crioprotetor, considerando a razão lípide:crioprotetor, afetam o efeito de proteção (KOUDELKA et al., 2010; STARK; PABST; PRASSL, 2010).

7.2 Coalescência (Fusão)

7.2.1 Porque ocorre

A coalescência/fusão de lipossomos corresponde à reorganização da membrana lipídica com relocação de moléculas individuais após aproximação de duas vesículas a uma distância de poucos nanômetros, perturbação local da estrutura da bicamada e mistura do conteúdo dos compartimentos lipossomais, formando uma nova estrutura coloidal (**figura 12**)(GRIT; CROMMELIN, 1993a; CEVC; RICHARDSEN, 1999; MARTENS; MCMAHON, 2008; MIRJANIAN et al., 2010; MARSDEN; TOMATSU; KROS, 2011).

A presença de agregação pode acelerar o processo de fusão dos lipossomos (YADAV et al., 2011), mas diferentemente do que ocorre na agregação, forças de atração de van der Waals não são suficientes para desencadear o processo de fusão das vesículas (KOMATSU; OKADA, 1995). A fusão é um processo irreversível e os lipossomos não podem ser recuperados, sendo que a estrutura original do lipossomo é definitivamente perdida (GRIT; CROMMELIN, 1993a; YADAV et al., 2011).

O tamanho e o tipo de lípides utilizados influenciam a ocorrência de fusão. Lipossomos particularmente com tamanho inferior a 100nm, especialmente quando obtidos por métodos que envolvem alta energia de cisalhamento, são propensos a fundir-se para reduzir a tensão superficial (PORNATTANANGKUL et al., 2010). Os lípides podem ter características fusogênicas dependendo de sua natureza. O DOPC por exemplo é mais fusogênico que o DPPC (MIRJANIAN et al., 2010).

Lípides que adotam configuração de fase hexagonal inversa, promovem a fusão da bicamada lipídica. O DOPE por exemplo forma essa fase em temperaturas acima de 10⁰C e, portanto, não forma bicamada em temperatura fisiológica. A incorporação de DOPE na membrana de lipossomos conseqüentemente favorece a fusão dos lipossomos com as membranas biológicas (STERNBERG et al., 1998; HEURTAULT et al., 2003).

Temperaturas próximas à transição de fase dos lípides propiciam a coexistência de regiões nas fases gel e líquido-cristalina, o que acelera a interação e fusão entre as membranas (XU; BURGESS; KHAN, 2012a).

Durante o processo de liofilização, o uso insuficiente, inadequado ou a não utilização de crioprotetores favorece o processo de fusão das vesículas (ENGEL et al., 1994; JONGE et al., 2007).

7.2.2 Consequências

As consequências da fusão das vesículas são semelhantes ao que ocorre na agregação (vide item 7.1.2). Em acréscimo, a fusão dos lipossomos usualmente é acompanhada pela liberação dos componentes encapsulados na fase aquosa para o meio externo (YAROSLAVOV et al., 2011) o que altera completamente a farmacocinética do produto.

O fármaco encapsulado no lipossomo deve ser liberado precisamente no tecido alvo em um determinado tempo após a sua administração para melhorar seu índice terapêutico e minimizar a toxicidade para células e tecidos normais. Assim, a perda do fármaco associado ao lipossomo resulta em toxicidade potencial para células e tecidos normais, bem como diminuição da eficácia terapêutica. (QIN et al., 2011).

7.2.3 Como detectar

Para detectar a fusão de membranas em geral, deve ser avaliada a mistura dos lípides das membranas ou a mistura/liberação do conteúdo aquoso das vesículas fundidas (VICOONE; PESSIN, 2008). A fusão entre lipossomos resulta ainda em aumento do diâmetro hidrodinâmico das vesículas, que também pode ser verificado com uso das técnicas descritas no item 9.1. No entanto, essas técnicas não são capazes de distinguir entre fusão e agregação (KOMATSU; OKADA, 1995). Assim, a fim de confirmar a ocorrência de fusão outras técnicas devem ser usadas como as de microscopia eletrônica (MARSDEN; TOMATSU; KROS, 2011).

7.2.4 Como evitar

Uma vez que vesículas menores são mais propensas a fundir-se, as etapas produtivas responsáveis pela redução e calibração do tamanho das vesículas são críticas. A homogeneização em alta pressão é a técnica mais utilizada para este fim. A pressão utilizada, o número de ciclos ou passagens do produto pelo equipamento influenciam o tamanho e a distribuição de tamanho das vesículas. (BRANDL et al., 1993). Portanto, esses parâmetros devem ser controlados. Caso seja utilizada técnica de extrusão, a membrana deve ter tamanho de poro adequado e homogêneo lote a lote (MORTON; SALUDES; YIN, 2012).

Para ocorrer a fusão deve haver uma íntima aproximação entre as vesículas e as bicamadas devem de alguma forma ser desestabilizadas sob alguma ação de estresse

(MARTENS; MCMAHON, 2008), as medidas para evitar agregação (mencionadas no item anterior), hidrólise e oxidação (mencionadas nos itens seguintes), também evitam a fusão.

7.3 Degradação

Existem duas vias de degradação que podem limitar a estabilidade da formulação lipossomal: a hidrolítica e a oxidativa.

7.3.1 Hidrólise lipídica

7.3.1.1 Porque ocorre

As membranas lipossomais são constituídas principalmente de glicerofosfolípidos, que são sensíveis à hidrólise das ligações ésteres que unem os ácidos graxos ao glicerol (HEURTAULT et al., 2003; SWAROOP KUMAR, 2011). Os LPLs são os produtos primários dessa hidrólise (GRIT; CROMMELIN, 1992) que podem ser posteriormente hidrolisados a glicerofosfatos (GPCs) e ácidos graxos livres (ZHANG; PAWELCHAK, 2000; SWAROOP KUMAR, 2011), sendo que o ácido glicerofosfórico é o produto final (SWAROOP KUMAR, 2011).

A hidrólise é catalisada em presença de ácidos e bases (ZUIDAM; CROMMELIN, 1995; JESORKA; ORWAR, 2008). Portanto, em geral, valores de pH não fisiológico promovem a hidrólise lipídica que também é influenciada pela temperatura, carga elétrica superficial dos lipossomos e a composição do meio (ZUIDAM; CROMMELIN, 1995; VAN WINDEN; CROMMELIN, 1997; MOOG et al., 2000).

A taxa de hidrólise é uma função do pH da superfície do lipossomo, o que depende não apenas do pH da formulação mas também do potencial elétrico de superfície dos lipossomos. Quando lípidos carregados estão presentes na bicamada, o pH da superfície lipossomal é diferente do pH da formulação. A incorporação de lípidos carregados na bicamada gera um potencial elétrico de superfície que provoca uma redistribuição dos cátions e ânions, incluindo prótons e íons hidroxila na interface bicamada - água. Assim, o pH da superfície lipossomal difere do pH da formulação (*bulk*) devido a esse efeito de redistribuição. Essa diferença depende da densidade de carga da superfície e composição do meio aquoso e pode ser calculada (GRIT; CROMMELIN, 1993a; ZUIDAM; CROMMELIN, 1995; MOOG et al., 2000; CROMMELIN; ZUIDAM, 2007; SWAROOP KUMAR, 2011).

Dispersões que se afastam do pH 6,5 na interface lipossomal tanto na direção ácida quanto básica, tendem a apresentar um aumento na taxa de hidrólise. No caso de lipossomos neutros, este pH coincide com o pH da formulação (GRIT; CROMMELIN, 1992; GRIT; CROMMELIN, 1993a; HEURTAULT et al., 2003; CROMMELIN; ZUIDAM, 2007; SWAROOP KUMAR, 2011).

De forma geral, o aumento da temperatura e da concentração das espécies químicas na formulação favorecem a hidrólise (GRIT et al., 1989; GRIT; CROMMELIN, 1993a; DU PLESSIS et al., 1996; SWAROOP KUMAR, 2011).

As formulações lipossomais injetáveis devem ser estéreis, portanto devem passar por um processo de esterilização. Os métodos que utilizam calor ou radiação gama podem propiciar hidrólise. Na radiação gama, quanto menor o tamanho de partícula, maior a propensão a danos causados pela degradação dos lípides. A extensão dessa degradação é dependente da composição lipossomal (CROMMELIN; ZUIDAM, 2007).

7.3.1.2 Consequências

A hidrólise dos fosfolípides é um dos maiores problemas para a estabilidade química de dispersões lipossomais. A formação de quantidades substanciais dos produtos da hidrólise pode levar a um aumento ou diminuição no tamanho de partícula, aumento na permeabilidade da bicamada lipídica e a vários efeitos tóxicos (ZUIDAM et al., 1995; MOOG et al., 2000).

Os LPLs não adotam configuração de bicamada lipídica, mas se organizam em estruturas micelares quando dispersos em água (GRIT; CROMMELIN, 1992). Portanto a formação de LPLs e ácidos graxos pode alterar a organização da bicamada, tornando-a sensível à fusão e propensa a mudanças morfológicas, o que aumenta a sua permeabilidade e as chances de liberação precoce do fármaco (GRIT; CROMMELIN, 1993a; HEURTAULT et al., 2003).

7.3.1.3 Como detectar

Os LPLs são produtos intermediários da hidrólise, portanto sua concentração nas dispersões lipossomais não pode ser usada como único parâmetro de monitoramento. Foi demonstrado em muitos estudos que a taxa de conversão dos lisofosfolípides nos seus análogos glicerofosfatados é maior que a taxa de conversão dos fosfolípides em lisofosfolípides. Além disso, a concentração de lisofosfolípides pode atingir um nível estacionário depois de um período enquanto a hidrólise dos fosfolípides ainda acontece.

Assim, a fim de se avaliar o processo de hidrólise, a concentração dos fosfolípidos e de todos os seus compostos de degradação, ou seja, LPLs, ácidos graxos e GPCs deve ser determinada (GRIT; CROMMELIN, 1993a; ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

Um método preciso é a quantificação dos fosfolípidos e LPLs por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e os GPCs por análise de fosfato total após extração dos lípidos. O grau de hidrólise (%) é determinado da seguinte forma:

$$100\% - \frac{[\text{fosfolípidos}] \times 100\%}{[\text{fosfolípidos}] + [\text{LPL}] + [\text{GPC}]}$$

No entanto, para estimar níveis baixos de hidrólise, pode ser feita a determinação de ácidos graxos livres, uma vez que estes compostos não são hidrolisáveis (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

No caso de emulsões lipídicas injetáveis, a farmacopéia americana limita o nível de ácidos graxos livres na formulação ($\leq 0,07$ mEq/g) (UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY, 2014)

7.3.1.4 Como evitar

Armazenamento em temperaturas baixas (4-6°C), ajuste do pH das dispersões próximo à neutralidade na interface lipossomal, diminuição da concentração das espécies químicas dos tampões são recomendados para evitar hidrólise (GRIT; CROMMELIN, 1993a; DU PLESSIS et al., 1996).

Conforme descrito no item 7.1.4, a remoção de água da formulação através da liofilização, contribui para sua estabilidade.

7.3.2 Oxidação

7.3.2.1 Porque ocorre

Na presença de iniciadores como oxigênio, temperatura, radicais livres, luz, agentes fotosensibilizantes e íons metálicos, os lípidos podem formar radicais livres, que são espécies químicas contendo um elétron não emparelhado e portanto, altamente instáveis. Na presença de oxigênio esses radicais se estabilizam abstraindo um hidrogênio de outras espécies químicas, nesse caso outras moléculas de lípidos, propagando o processo de

oxidação de forma autossustentada conforme representado na **figura 13** (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Lípidos contendo ácidos graxos insaturados são os mais sensíveis à formação de radicais, uma vez que a insaturação permite a deslocalização do elétron desemparelhado remanescente ao longo da cadeia lipídica (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

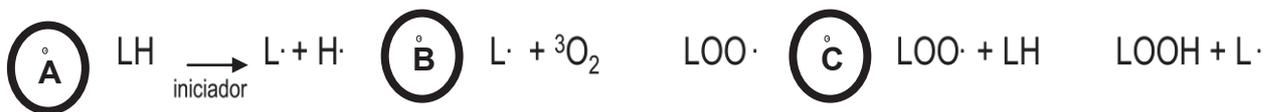


Figura 13 – Representação esquemática do processo de oxidação lipídica onde LH é o lípido e LOO· o radical peróxido. A e B: Fase de iniciação em presença do iniciador e oxigênio com formação dos radicais. C: Fase de propagação autossustentada com o ataque a novas moléculas lipídicas. Fonte: LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007.

No entanto, fosfolípidos que contém cadeias saturadas também podem sofrer oxidação em temperaturas elevadas. Exposição a radiação eletromagnética ou presença de traços de íons de metais de transição iniciam a formação de radicais na cadeia lipídica, com a abstração de um átomo de hidrogênio (GRIT; CROMMELIN, 1993a).

De forma semelhante ao descrito no item 7.3.1.1, alguns processos de esterilização podem impactar a ocorrência de oxidação.

7.3.2.2 Consequências

Os efeitos da oxidação são semelhantes aos da hidrólise. O processo de oxidação gera subprodutos de diferentes naturezas químicas, que aumentam a permeabilidade da bicamada (HEURTAULT et al., 2003), ocasionando perda do material encapsulado, agregação e modificação morfológica das vesículas.

7.3.2.3 Como detectar

Uma das estratégias para se monitorar a degradação oxidativa de uma formulação é fazer o doseamento do substrato não oxidado, que geralmente envolve métodos espectrofotométricos ou cromatográficos. Muitas substâncias oxidáveis possuem estruturas poliênicas conjugadas, com propriedades de absorção ou fluorescência no espectro UV-VIS (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). A GC é a técnica mais utilizada para determinação quantitativa dos ácidos graxos remanescentes ou não oxidados dos fosfolípidos (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

De forma contrária à estratégia baseada na perda de substrato, pode-se analisar a ocorrência de oxidação através da formação dos produtos primários e secundários. Os hidroperóxidos são considerados produtos de oxidação primários e as técnicas utilizadas para sua determinação são a determinação de dienos conjugados por espectrometria no ultravioleta e medição iodométrica (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; JESORKA; ORWAR, 2008). Também existem metodologias para determinação dos produtos secundários ou endoperóxidos.

- Determinação de hidroperóxidos

A medição iodométrica é um dos métodos mais antigos para avaliar a oxidação lipídica, sendo utilizado para quantificar os hidroperóxidos. Conforme esquematizado na **figura 14**, em meio ácido os hidroperóxidos reagem com o íon iodeto gerando iodo, que pode ser titulado usando solução de tiosulfato de sódio em presença de solução de amido (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007) ou pode ser determinado espectrofotometricamente com leitura em ~353nm (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003). Esse método possui algumas desvantagens, pois é relevante somente para amostras em que a oxidação não é muito intensa uma vez que pode haver decomposição dos hidroperóxidos. Além disso, exposição à luz, a absorção de iodo pelos ácidos graxos insaturados e a formação do iodo através da oxidação dos íons iodeto na presença do oxigênio ambiente podem interferir e levar a uma sub ou superestimação, dependendo do caso. A presença de água nas formulações lipossomais também é um fator prejudicial a essa técnica. Assim, torna-se necessária uma extração seletiva e quantitativa dos lípides evitando a geração de hidroperóxidos ou sua decomposição durante a análise (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

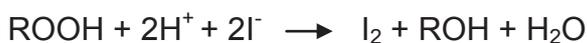


Figura 14 – Reações químicas envolvidas no método iodométrico para quantificação de hidroperóxidos. Fonte: LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007

Outro método utilizado para determinação dos produtos primários da oxidação é a espectrometria no UV. Mais de 90% dos hidroperóxidos formados pela lipoperoxidação possui um sistema diênico conjugado resultante da estabilização do radical pelo rearranjo da dupla ligação. Esses compostos relativamente estáveis absorvem na região UV (~235nm) formando um “ombro” no pico principal de absorção das duplas ligações não conjugadas (200-210nm) dos lípides não oxidados. Para melhorar a resolução entre esses picos, extração sistemática dos lípides usando solvente orgânico antes da análise pode ser

feita. Além disso, assim como no método iodométrico, é preciso garantir que a reação de oxidação não atinja estágios avançados e que as condições do processo e temperatura sejam suficientemente amenas para limitar a decomposição do hidroperóxido (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

O método de oxidação do íon ferroso em laranja do xilenol (FOX) também é utilizado para determinação de hidroperóxidos, e consiste na oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} mediada pelos peróxidos com formação de um complexo na presença de laranja do xilenol que pode ser determinado espectrofotometricamente (~560nm). Assim como descrito anteriormente, é preciso evitar que a reação de oxidação atinja estágios avançados durante a análise (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

- Determinação de endoperóxidos

Uma terceira estratégia para monitorar a degradação oxidativa é através da determinação dos seus produtos secundários, os endoperóxidos. O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) envolve a reação do TBA com um aldeído (malondialdeído) produzido pela decomposição dos hidroperóxidos, que produz um cromóforo de cor avermelhada com pico de absorção em ~532 nm (FORADADA et al., 2000).

As desvantagens desse método são: o malondialdeído se forma apenas a partir de cadeias de ácidos graxos que contém pelo menos três ligações duplas; o TBA não reage especificamente com o malondialdeído, podendo reagir com outros aldeídos, produtos de degradação de proteínas, açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos. Além disso, o malondialdeído não ocorre em muitos lípidos oxidados (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Um dos métodos mais antigos para determinação de produtos secundários provenientes do processo de oxidação lipídica baseia-se na reação entre a *p*-anisidina e os produtos secundários que contém carbonila aldeídica, levando à formação de uma base de Schiff que absorve em 350nm. A resposta colorimétrica obtida varia conforme a extensão da insaturação do aldeído. Assim, mesmo em concentrações idênticas, a resposta será mais intensa para aldeídos bi-insaturados que para aldeídos monoinsaturados. Além disso, a *p*-anisidina reage com todos os aldeídos de forma semelhante ao que ocorre com o método TBA (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

Para quantificar compostos voláteis derivados da decomposição dos hidroperóxidos, pode ser usada GC. Alguns compostos são altamente específicos da oxidação degradativa de uma família de ácidos graxos poli-insaturados. Por exemplo, propanal é o principal marcador da oxidação de ácidos graxos da família *n*-3, enquanto hexanal e pentanal são marcadores da família *n*-6. Mas o método deve envolver a avaliação de vários desses compostos. Para recuperar esses marcadores, pode ser usada

a técnica de *headspace* (HS) associada à GC (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

7.3.2.4 Como evitar

A oxidação pode ser prevenida evitando-se o contato dos lípides com os iniciadores do processo, trabalhando numa atmosfera de gás inerte como nitrogênio ou argônio, através da eliminação do oxigênio do recipiente que contém a formulação (SWAROOP KUMAR, 2011), através da adição de antioxidantes ou pela seleção de fosfolípides com cadeias acila saturadas (GRIT; CROMMELIN, 1993a ; HEURTAULT et al., 2003).

A adição de antioxidantes e quelantes pode garantir a estabilidade química prolongada da formulação lipossomal (ZHANG; PAWELCHAK, 2000; SAETERN et al., 2005).

Os agentes antioxidantes previnem a oxidação de duas formas: protegendo os lípides dos iniciadores desse processo (com uso de agentes quelantes como EDTA no caso de íons metálicos e ácido cítrico) (GRIT; CROMMELIN, 1993a; HEURTAULT et al., 2003) ou estagnando a fase de propagação da oxidação, usualmente através da transferência de um átomo de H para o radical livre responsável pela propagação da reação de oxidação (com uso de compostos fenólicos como o tocoferol – **figura 15**).



Figura 15 – Representação esquemática da ação antioxidante através da transferência de um átomo de H do antioxidante A-H para o radical LOO· estagnando a fase de propagação do processo de oxidação. Fonte: LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007.

A peroxidação de fosfolípides nos lipossomos também pode ser minimizada pelo uso de matérias-primas de alta pureza, livres de hidroperóxidos e íons de metais de transição. O armazenamento em temperaturas baixas e proteção contra luz também reduz a oxidação (GRIT; CROMMELIN, 1993a; HEURTAULT et al., 2003).

O uso de tampões como HEPES e Tris tem um efeito protetor contra a peroxidação lipídica (GRIT; CROMMELIN, 1993a).

7.4 Liberação precoce do fármaco

Uma formulação lipossomal bem sucedida deve atingir o tecido alvo na sua forma intacta (NGUYEN et al., 2013).

Uma das causas de liberação precoce do fármaco é a degradação ou desestabilização da bicamada lipídica, que pode ocorrer devido à hidrólise e oxidação dos lípidos ou à fusão dos lipossomos, conforme discutido nos itens anteriores. Outro motivo de liberação precoce do fármaco é sua alta difusão através da bicamada lipídica, que pode ser favorecida por vários fatores, descritos a seguir.

7.4.1 Alta taxa de difusão do fármaco

7.4.1.1 Porque ocorre

A composição lipídica do lipossomo e o estado físico da bicamada (gel ou líquido cristalino) influenciam a perda do fármaco encapsulado. Fosfolípidos insaturados proporcionam menor densidade de empacotamento da bicamada, aumentando sua fluidez e facilitando a liberação do fármaco (GRIT; CROMMELIN, 1993a; MAHERANI et al., 2012).

Membranas no estado líquido cristalino são mais permeáveis ao material encapsulado que quando estão no estado gel, em que a liberação do fármaco é mais lenta (TAYLOR et al, 1990; BETAGERI; PARSONS, 1992; HOSSANN et al., 2010). O armazenamento dos lipossomos em torno da temperatura de transição de fase dos lípidos aumenta a permeabilidade da bicamada, exceto quando a formulação contém frações substanciais de colesterol (geralmente mais de 30%) ou outros compostos que diminuem a permeabilidade e inibam a transição de fase da membrana, fazendo com que a liberação do fármaco dependa pouco da temperatura (BETAGERI; PARSONS, 1992; GRIT; CROMMELIN, 1993a; CHOW; HEATH, 1995; RISBO et al., 1997; LIAN; HO, 2001; OWEN; STRASTERS; BREYER, 2005; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

Tanto a natureza da cabeça polar do fosfolípide quanto o comprimento das cadeias de ácidos graxos afetam a T_m . A temperatura de transição de fase de uma bicamada lipídica aumenta com o aumento da cadeia e grau de saturação dos ácidos graxos. Fármacos ligados à bicamada também podem afetar a T_m e essa interação pode favorecer sua liberação (LIAN; HO, 2001; OWEN; STRASTERS; BREYER, 2005; GUBERNATOR et al., 2010).

O transporte passivo de um fármaco através da bicamada depende de sua lipofilicidade, expressada como o logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) octanol-água

(MAZAK; KOKOSI; NOSZAL, 2011; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012; MAZAK; NOSZAL, 2012).

A lipofilicidade é uma característica físico-química muito importante para o desenvolvimento de fármacos para sistemas carreadores. Por exemplo, normalmente formas não carregadas do fármaco são mais lipofílicas que as iônicas ou que seus isômeros zwitterônicos. Mas em alguns casos esse comportamento pode ser diferente (MAZAK; NOSZAL, 2012).

A partição de um fármaco em sistemas lipossomais é governada por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (VAN BALEN et al., 2004; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

A forma cristalina em que o fármaco se encontra encapsulado pode influenciar a sua liberação. Compostos lipofílicos podem se cristalizar ou precipitar, separando-se da bicamada lipídica com o tempo ou com armazenamento do produto em temperaturas baixas (ZUIDAM et al., 2003). Os fármacos hidrofílicos incorporados em lipossomos se difundem mais rapidamente para o meio externo quando se encontram solubilizados no compartimento aquoso (BETAGERI; PARSONS, 1992; IMMORDINO et al., 2004) quando comparado ao fármaco na forma de precipitados ou de forma cristalina no interior da vesícula (FENSKE; CULLIS, 2008).

O pH é um fator crucial para determinar o comportamento de partição dos fármacos ionizados ou com propriedades ácido-básicas, uma vez que influencia a forma com que este permanece encapsulado (se protonado, neutro, em forma de sal, etc) (VAN BALEN et al., 2004). Assim, a liberação precoce do fármaco pode se dar indiretamente, se houver alteração da composição intralipossomal, como por exemplo a liberação de componentes do tampão (CEH; LASIC, 1997).

O pH e a força iônica também afetam a permeabilidade da bicamada (FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012). A variação da força iônica do meio aquoso após a formação dos lipossomos pode ocasionar variações na pressão osmótica que gera os efeitos de inchaço ou encolhimento das vesículas dependendo da concentração do meio extra e intralipossomal (ALONSO et al., 1995; TSUKAGOSHI; OKUMURA; NAKAJIMA, 1998; HUPFELD et al., 2010; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

A fluidez e permeabilidade da membrana podem ser alteradas pela ação das moléculas de água não solventes, que estão fortemente ligadas aos grupos polares dos fosfolípidos contribuindo para a formação de pontes entre os grupos cabeça polares de fosfolípidos adjacentes (VAN BALEN et al., 2004). Os polímeros covalentemente ligados aos lípidos da bicamada tem um papel importante na estabilidade termodinâmica dos lipossomos pelo efeito de desidratação da bicamada lipídica (LIAN; HO, 2001).

O tamanho das vesículas também influencia a liberação do fármaco. Geralmente, diminuindo-se o seu tamanho aumenta-se a taxa de liberação (HOSSANN et al., 2010). O processo de preparação dos lipossomos tem grande impacto no tamanho das vesículas lipossomais (XU; BURGESS; KHAN, 2012a).

7.4.1.2 Consequências

Alta taxa de difusão do fármaco implica em sua liberação precoce do lipossomo, e no organismo assume a farmacocinética da droga livre. As consequências disso são alteração do perfil de toxicidade e atividade farmacológica do fármaco, diminuição dos seus níveis no tecido ou célula alvo e alteração de sua taxa de eliminação do organismo (DRUMMOND et al., 1999).

7.4.1.3 Como detectar

- DSC

A temperatura de transição da membrana, que é indicativa da permeabilidade da membrana, pode ser determinada por DSC (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

- Diálise

A taxa de difusão do fármaco através da bicamada pode ser determinada através de técnicas de diálise (BETAGERI; PARSONS, 1992, XU; BURGESS; KHAN, 2012) onde o fármaco liberado difunde-se através de uma membrana de para o meio acceptor, que é subsequentemente analisado quanto ao conteúdo do fármaco (NGUYEN et al., 2013). Diálise de equilíbrio tem sido frequentemente considerada como método de referência para determinar a partição fármaco- lipossomo (FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

- Ultrafiltração

Para determinar a eficiência de encapsulamento, deve-se separar os lipossomos do fármaco não encapsulado (livre). Um dos métodos de separação é a ultrafiltração da formulação lipossomal. O ultrafiltrado é coletado para determinar a concentração de droga livre (Clivre). A concentração total do fármaco (Ctotal) também é determinada após o rompimento das vesículas a liberação do fármaco encapsulado, utilizando-se por exemplo um surfactante como Triton-X100. A eficiência de encapsulamento (EE) é calculada da seguinte forma:

$$EE\% = \frac{(1 - Clivre) \times 100}{Ctotal}$$

A partir da eficiência de encapsulamento pode ser calculada a porcentagem do fármaco encapsulado e a porcentagem da droga livre (XU; BURGESS; KHAN, 2012a).

- Ultracentrifugação

De forma semelhante, a eficiência de encapsulamento pode ser determinada por ultracentrifugação, que leva à sedimentação dos lipossomos. Nesse caso, a concentração do fármaco livre é determinada através do doseamento do fármaco sobrenadante após o processo de ultracentrifugação (ZHANG et al., 2004). No entanto, tanto o processo de ultracentrifugação quanto a diluição da amostra (que quase sempre é necessária) pode potencialmente induzir a liberação do fármaco.

Na centrifugação em minicolunas contendo gel, a dispersão lipossomal pode ser analisada sem diluição da amostra (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

- Cromatografia por exclusão de tamanho

Um outro método possível é a cromatografia por exclusão de tamanho, no qual o fármaco fica retido no gel da coluna cromatográfica enquanto os lipossomas saem no volume de exclusão. Deve ser avaliado se a interação entre a fase estacionária e os lipossomos pode induzir a liberação do fármaco. Na centrifugação em minicolunas contendo gel, a vantagem é que a dispersão lipossomal pode ser analisada sem diluição da amostra (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

- Microscopia

No caso de fármacos lipofílicos que apresentam cristalização e precipitação, separando-se da bicamada, pode ser feita identificação desses cristais ou precipitados com uso de microscópio óptico. A quantificação pode ser feita por centrifugação de baixa velocidade com subsequente análise do sobrenadante, que contém o fármaco encapsulado nos lipossomos (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

- Extrusão

Outro método que pode ser utilizado é a separação dos lipossomos do fármaco precipitado através de extrusão, com uso de filtro de policarbonato. Nesse caso, os lipossomos passam através da membrana e o precipitado fica retido. No entanto, esse processo pode contribuir para a separação de fase do fármaco lipofílico, superestimando a quantidade de fármaco precipitado (ZUIDAM; DE VRUEH; CROMMELIN, 2003).

- Outras

Além das técnicas mencionadas onde ocorre a separação entre o material encapsulado e o não encapsulado, existem métodos onde essa separação não é necessária. A polarografia de pulso diferencial, tem sido aplicada para a quantificação de forma não destrutiva em dispersões lipossomais, de clorotiazida encapsulada, adsorvida nos lipossomos e livre (GOMEZ-HENS; FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

Também pode ser usada espectroscopia de ressonância magnética (H-RMN). A determinação da taxa de encapsulamento é baseada na detecção de um ácido ou base (correspondente ao fármaco livre) que possui uma frequência de ressonância

(deslocamento químico) sensível ao grau de protonação da molécula, que por sua vez deve ser sensível a mudanças de pH. Quando o pH do meio externo é alterado, um deslocamento químico referente ao fármaco livre é observado. O pico correspondente à ressonância do próton do fármaco encapsulado permanece inalterado e não é afetado pela mudança de pH do meio externo. Dessa forma, a ressonância dos prótons do fármaco encapsulado e não encapsulado pode ser completamente resolvida (MAHERANI et al., 2012).

7.4.1.4. Como evitar

Além das medidas já descritas nos itens 7.2.4, 7.3.1.4 e 7.3.2.4, referentes à degradação e fusão da bicamada, para evitar liberação precoce do fármaco, as características do meio aquoso devem ser ajustadas antes da formação das vesículas, a fim de evitar um possível estresse osmótico (ALONSO et al., 1995).

A fluidez da membrana pode ser cuidadosamente controlada através da seleção dos lípides e da fração de cada lípide incorporado à membrana (OWEN; STRASTERS; BREYER, 2005).

Lípides com alta temperatura de transição de fase evitam os possíveis efeitos prejudiciais que podem ser ocasionados quando as formulações se encontram em temperaturas próximas à T_m (DRUMMOND et al., 1999). No caso de formulações que possuem essa transição de fase, a formulação deve ser armazenada pelo menos 30°C abaixo da temperatura de transição de fase dos lípides. Por outro lado, os lipossomos não devem ser armazenados a temperaturas de congelamento, uma vez que isso pode causar rompimento das vesículas. Dessa forma, para lípides com temperatura de transição de fase menor que aproximadamente 32°C, a temperatura de armazenamento deve ser 2-8°C (XU; BURGESS; KHAN, 2012a).

A formação de complexos pouco solúveis com o fármaco no interior do lipossomo contribui para a diminuição da sua taxa de liberação da vesícula (GUBERNATOR et al., 2010). O preparo de formulações contendo lipossomos vazios, que são misturados ao fármaco e encapsulados por gradiente de pH, imediatamente antes da injeção, assim como a comercialização de produtos liofilizados, são alternativas para evitar a liberação do fármaco durante o armazenamento (DRUMMOND et al., 1999; SAETERN et al., 2005; ABDELWAHED et al., 2006).

8. ANÁLISE DOS DIAGRAMAS DE ISHIKAWA

Os diagramas de causa e efeito, ou diagramas de Ishikawa, constantes nas figuras 3, 9 e 10, contemplam os fatores que influenciam três requisitos (tratados como os efeitos a serem avaliados) fundamentais para a comercialização de um medicamento: eficácia, segurança e estabilidade. Cada um desses efeitos possui diferentes categorias de causas principais (destacados nas caixas de texto em vermelho) que se referem às causas imediatas do respectivo efeito. Cada uma dessas categorias se desdobra em causas primárias (em azul) e conforme o caso, subsequentemente se desdobram em causas secundárias (em negrito) que podem apresentar sub-causas relacionadas. Cada um desses desdobramentos é feito com o intuito de identificar as causas raiz do efeito, ou os fatores que o influenciam, que no fim estão relacionadas a atributos de qualidade do produto, condições ambientais e de processo ou a propriedades do fármaco e da bicamada.

No caso da eficácia e toxicidade, a grande maioria das causas-raiz identificadas estão relacionadas a atributos de qualidade do medicamento (sistema fármaco- lipossomo). No caso da estabilidade, apesar de estas serem também bastante expressivas, as condições ambientais ou de processo representam as causas-raiz predominantes.

Analisando os diagramas de Ishikawa é possível identificar os atributos de qualidade críticos para eficácia, segurança e estabilidade de medicamentos lipossomais injetáveis. Pode-se observar que todos os fatores que influenciam a estabilidade também impactam a eficácia e toxicidade.

O **quadro 3** traz a relação dos atributos de qualidade e propriedades que podem ser extraídos de cada diagrama. Como os fatores que afetam a estabilidade foram analisados separadamente, a influência destes na eficácia e toxicidade não foi apresentada. Os atributos de qualidade que influenciam somente a estabilidade são: concentração do antioxidante, ausência de íons metálicos, pH, propriedades osmóticas, identidade, concentração e distribuição do crioprotetor, força iônica, composição do meio, presença de agregação/fusão, oxidação lipídica, hidrólise lipídica e coeficiente de partição óleo/água do fármaco. Pode ser verificado no **quadro 3** que todos os atributos que afetam a eficácia, também afetam a toxicidade e vice-versa, com exceção da formação de diferentes estruturas supramoleculares, que está envolvida somente na toxicidade da formulação. Nos diagramas isso também é visível: estabilidade plasmática, tempo de circulação e perfil de liberação do fármaco são fatores que influenciam a eficácia e a toxicidade. Portanto, todos os atributos de qualidade relacionados a estes também afetarão direta ou indiretamente a eficácia e a toxicidade. A eficiência de direcionamento influencia indiretamente a toxicidade, pois determina a dose do medicamento a ser administrado e está relacionada à interação

Quadro 3 – Atributos de qualidade extraídos dos diagramas de Ishikawa. Em destaque os atributos de qualidade que têm impacto direto concomitantemente na eficácia, toxicidade e estabilidade.

Atributo de qualidade	Eficácia	Toxicidade	Estabilidade
Tamanho/ distribuição de tamanho	X	X	X
Carga elétrica superficial	X	X	X
Composição lipídica	X	X	X
Quantificação dos componentes estímulo-sensíveis	X	X	X
Fármaco encapsulado/ livre	X	X	X
Perfil de liberação do fármaco	X	X	X
Ambiente intralipossomal (pH, concentração de íons, gradiente transmembrana)	X	X	X
Forma cristalina do fármaco encapsulado	X	X	X
Transição de fase	X	X	X
Identidade do componente de revestimento da superfície	X	X	X
Densidade e concentração do componente de revestimento da superfície	X	X	X
Concentração de antioxidante			X
Ausência de íons metálicos			X
pH			X
Propriedades osmóticas			X
Identidade, concentração e distribuição do crioprotetor			X
Força iônica			X
Composição do meio			X
Presença de agregação/ fusão			X
Oxidação lipídica			X
Hidrólise lipídica			X
Coeficiente de partição óleo-água do fármaco			X

Quadro 3 – Atributos de qualidade extraídos dos diagramas de Ishikawa. Em destaque os atributos de qualidade que têm impacto direto concomitantemente na eficácia, toxicidade e estabilidade (**conclusão**)

Atributo de qualidade	Eficácia	Toxicidade	Estabilidade
Morfologia das vesículas	X	X	
Espessura/ Peso molecular do componente de revestimento da superfície	X	X	
Lamellaridade	X	X	
Diferentes estruturas supramoleculares		X	
Identidade do ligante	X	X	
Densidade e concentração do ligante	X	X	
Conformação do ligante	X	X	
Razão fármaco-lípide	X	X	X
Identidade do componente magnético	X	X	
Concentração do componente magnético	X	X	
Conformação do componente de revestimento da superfície	X	X	
Fusogenicidade	X	X	

do lipossomo com a superfície celular, que por sua vez afeta o perfil de liberação do fármaco, que poderá ser uma causa de toxicidade caso ocorra de forma inadequada.

Observa-se nos diagramas de Ishikawa, que para a eficácia existem basicamente dois fatores principais que a influenciam: concentração e tempo de permanência adequados do fármaco no local alvo, além da estabilidade físico- química da formulação. Todos os outros fatores estão relacionados a estes. Se considerarmos as causas primárias, secundárias e as respectivas sub-causas relacionadas à eficácia, o fator que possui influência predominante é a composição do lipossomo, seguida pelo tamanho de partícula e carga elétrica superficial (que possuem igual participação). Os fatores relacionados ao processo produtivo aparecem em seguida como os que mais influenciam a eficácia. A morfologia; lamellaridade; ambiente intralipossomal; natureza; concentração e espessura do componente de revestimento; natureza, densidade e conformação do ligante, também se destacam como fatores relevantes.

Já no caso da toxicidade, existem seis causas principais, além da instabilidade físico-química da formulação: embolismo; reações dérmicas/mucosite; hipersensibilidade; acumulação dos lipossomos em órgãos não alvos; alta concentração de fármaco livre no plasma e alterações celulares. Se considerarmos as causas primárias, secundárias e as respectivas sub-causas relacionadas à toxicidade, o fator que possui influência predominante também é a composição do lipossomo, seguida pelo tamanho de partícula, carga elétrica superficial e processo (que possuem igual participação). A natureza, densidade e conformação do componente de revestimento aparecem em seguida como o que mais influenciam a toxicidade. A dose de lípidos também se destaca como um fator importante. E a morfologia, lamelaridade e ambiente intralipossomal aparecem mais de uma vez no diagrama.

Os problemas de estabilidade ocorrem devido a cinco causas principais: degradação química, alterações físicas (agregação e fusão) e liberação precoce do fármaco. Se considerarmos as causas primárias, secundárias e as respectivas sub-causas relacionadas à estabilidade, o fator predominante é o processo produtivo, seguido pelas condições de temperatura e pH. A carga elétrica superficial, composição do meio e composição lipídica aparecem em seguida como os fatores que mais influenciam a estabilidade. A composição dos lipossomos (que inclui, além da composição lipídica, os componentes de revestimento), e o tamanho de partícula também destacam-se como fatores importantes. A presença de luz, oxigênio, íons metálicos e quantidade de antioxidante na formulação aparecem mais de uma vez no diagrama.

Alguns atributos de qualidade nitidamente se destacam em termos de sua influência. O tamanho da partícula, a carga elétrica superficial, a composição do lipossomo (natureza e proporção dos lípidos e componentes de revestimento), os componentes estímulo-sensíveis, a quantidade de fármaco encapsulado e não encapsulado, o perfil de liberação do fármaco, o ambiente intralipossomal, a forma cristalina do fármaco encapsulado e o comportamento de transição de fase influenciam diretamente tanto a eficácia quanto a toxicidade e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis e razão fármaco-lípido.

Verificando os três diagramas, também nota-se que a carga elétrica superficial, composição do lipossomo (especialmente a lipídica) e o tamanho das vesículas, são os atributos de qualidade dominantes em termos da extensão de sua influência.

9. ANÁLISE DOS PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO E CARGA ELÉTRICA SUPERFICIAL

9.1 Métodos para determinação de tamanho de partícula

O tamanho da partícula é um importante indicador da estabilidade coloidal de formulações lipossomais e um parâmetro importante para a biodistribuição dos lipossomos, considerando que afeta a sua passagem através dos capilares e dos espaços entre as células endoteliais fenestradas, a sua captação pelas células via endocitose, bem como sua remoção da circulação sanguínea (OPANASOPIT; NISHIKAWA; HASHIDA, 2002).

Os métodos para determinação de tamanho variam em complexidade e grau de sofisticação (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003) e podem ser classificados em três tipos: (MYHRA; RIVIERE, 2013)

- Métodos de análise em conjunto: levam em consideração todas as partículas analisadas na amostra ao mesmo tempo, podendo estas ter ou não tamanhos diferentes, mas geram um resultado que representa a distribuição de tamanho de uma população de partículas analisada. Ex.: espalhamento de luz dinâmico (DLS), difração a laser (LD);
- Métodos de separação: utilizam técnicas que separam fisicamente as partículas conforme o seu tamanho. Ex.: cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), fracionamento em fluxo de campo (FFF);
- Métodos de contagem: caracterizam a amostra através da contagem e determinação de tamanho de partículas individuais, gerando uma distribuição de tamanho baseada em números. Ex.: métodos microscópicos (como cryo-TEM), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA/PTA) (MYHRA; RIVIERE, 2013).

Os métodos mais utilizados para determinação de tamanho de partículas coloidais são a espectroscopia de correlação de fótons (PCS) também chamada de espalhamento de luz dinâmico (DLS) ou espalhamento de luz quase elástico (QELS) e a difração a laser (LD).

O DLS envolve uma fonte de laser iluminando uma amostra líquida que contém partículas que em solução/ suspensão possuem movimento Browniano. O DLS mede as flutuações da intensidade da luz espalhada de forma tempo-dependente, causada pelo movimento browniano dessas partículas (HEURTAULT et al, 2003; ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003; BRAR; VERMA, 2011). Quanto maior o diâmetro hidrodinâmico da partícula, mais lento será o movimento Browniano (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014d). Portanto, partículas menores fazem com que a flutuação da intensidade de luz espalhada ocorra de forma mais rápida. O diâmetro hidrodinâmico é calculado pela

equação de Stokes-Einstein (**Figura 16**) (WASHINGTON UNIVERSITY IN ST. LOUIS, 2014; MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2015a.).

Apesar de o DLS poder ser medido em múltiplos ângulos, a maioria dos instrumentos comerciais comumente utilizados faz uso de um único ângulo de espalhamento.

A viscosidade, temperatura e a concentração da suspensão lipossomal são os parâmetros mais importantes para o DLS. A viscosidade da dispersão deve ser determinada e controlada, pois afeta diretamente o movimento browniano das partículas e conseqüentemente o resultado calculado do tamanho do lipossomo. Dessa forma, a amostra precisa ser diluída a uma concentração apropriada (suficientemente baixa para evitar espalhamentos múltiplos de luz e interações entre as partículas) e a viscosidade do meio deve ser determinada na mesma temperatura em que a análise será efetuada (tipicamente 25°C), uma vez que a viscosidade depende da temperatura (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003; HACKLEY; CLOGSTON, 2010; BARENHOLZ, 2012; MAHERANI et al., 2012).

Idealmente o espectrômetro de correlação de fótons deve estar localizado numa sala separada e em superfície livre de vibrações (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003).

O equipamento deve ser verificado quanto ao seu desempenho periodicamente com materiais de referência fornecidos por órgãos específicos como o NIST e outros reconhecidos nacionalmente, ou devem ser rastreáveis a estes. Para tal são utilizados materiais de referência como pérolas de polistireno de tamanhos definidos (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2014b, 2014c).

O preparo das amostras é crítico para a confiabilidade dos resultados. O meio utilizado para diluição da amostra deve ser filtrado (normalmente em filtro 0,22µm) a fim de eliminar partículas contaminantes que possam interferir na análise, especialmente quando os lipossomos têm tamanho menor que 100nm. A translucidez do meio é verificada através da contagem de fótons (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003). O processo de dispersão da amostra para análise pode alterar o tamanho das partículas, invalidando os resultados. A presença de artefatos como partículas ou bolhas de ar também pode interferir nos resultados (PARTICLE TECHNOLOGY LABS, 2014).

Dependendo da potência do laser e do comprimento de onda, é possível utilizar o DLS para determinação do tamanho de partículas no intervalo de aproximadamente 1nm a 3µm. O menor limite de detecção do tamanho de partícula por esse método é determinado por vários fatores, incluindo a potência do laser, sensibilidade do detector, a concentração

da amostra, o tamanho de partícula e a diferença entre o índice de refração das partículas e o meio de dispersão (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003).

A difração a laser (LD) ou espalhamento de luz laser a baixo ângulo (LALLS) também é bastante utilizada para determinação de tamanho. A LD também se baseia no espalhamento de luz incidente sobre as partículas da amostra, porém determina a variação angular da luz espalhada pelas partículas à medida que o feixe de laser passa através da amostra. Partículas grandes espalham a luz em ângulo menor e com maior intensidade, enquanto partículas pequenas espalham a luz em ângulos maiores e com menor intensidade. Portanto, a distribuição de tamanho das partículas é calculada com base no ângulo e na intensidade desse espalhamento do laser, e os resultados são apresentados em termos do volume das partículas. Diferentemente do DLS, a LD pode ser utilizada tanto para análise de amostras em dispersões aquosas quanto para análise de pós (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2014b).

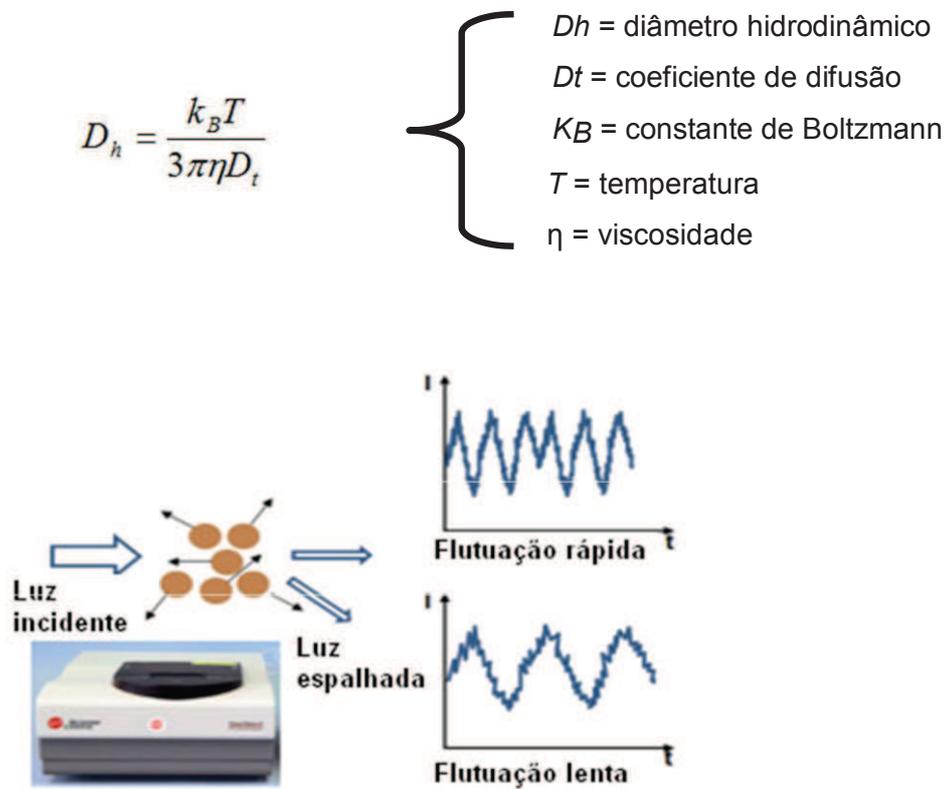


Figura 16 - Princípio geral de funcionamento do DLS e equação de Stokes-Einstein. Fonte: GRASSIAN RESEARCH GROUP AT THE UNIVERSITY OF IOWA DEPARTMENT OF CHEMISTRY, 2014; MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2015a.

O equipamento de LD deve ser verificado periodicamente com materiais de referência fornecidos por órgãos específicos como o NIST e outros reconhecidos nacionalmente, ou devem ser rastreáveis a estes (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2014; HACKLEY, 2015).

Os cálculos de tamanho utilizando-se os métodos de DLS e LD são feitos considerando que as partículas são esféricas. Ou seja, independente da morfologia das partículas, o tamanho calculado será equivalente ao diâmetro de uma partícula esférica. (ALMGREN; EDWARDS; KARLSSON, 2000; HEURTAULT, B. et al, 2003; KELLY; ETZLER, 2014).

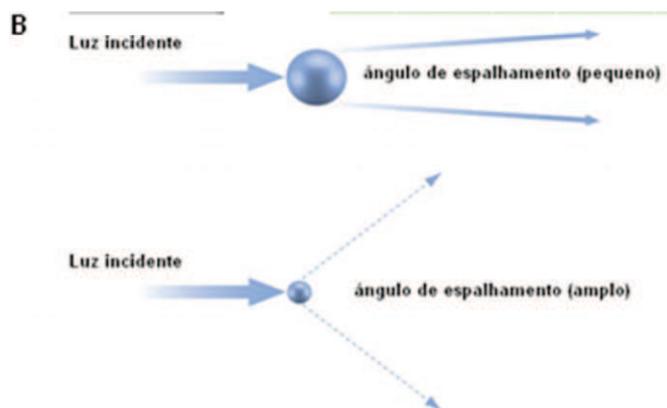
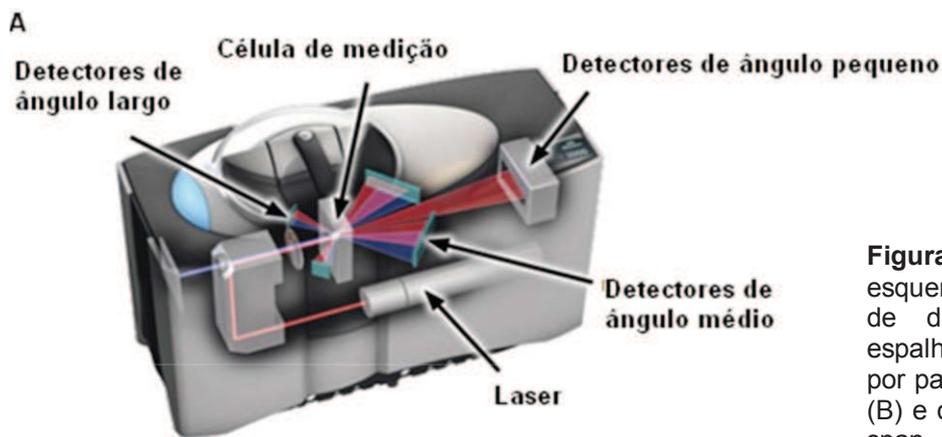
É importante ressaltar que essas técnicas não determinam de forma direta o tamanho das partículas, cada uma delas faz a determinação de uma propriedade física distinta da partícula, que é correlacionada ao diâmetro equivalente de uma esfera. Por exemplo, no DLS o tamanho calculado será equivalente ao diâmetro de uma partícula esférica que tem o mesmo coeficiente de difusão (movimento translacional) que as partículas analisadas, e como é detectada a intensidade da luz espalhada, o tamanho de partícula é baseado nessa intensidade. A LD reporta os resultados como o diâmetro de uma partícula esférica que tem o mesmo volume da partícula que está sendo analisada. Portanto, diferentes técnicas produzem diferentes resultados (HORIBA SCIENTIFIC, 2014).

As propriedades ópticas da amostra, como o índice de refração e coeficiente de absorção, devem ser conhecidos pois na maioria dos casos, os cálculos de tamanho utilizados nessas técnicas dependem desses valores (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014e).

Como o DLS e o LD analisam a amostra como um conjunto, geralmente não fornecem resultados confiáveis em amostras com população de lipossomos muito polidispersas (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Por exemplo, partículas grandes espalham muito mais a luz que partículas pequenas, fazendo com que o resultado possa ser tendencioso às partículas maiores (ZUIDAM; VRUEH; CROMMELIN, 2003; BUYENS et al., 2012). Portanto os valores do índice de polidispersão (PDI) para a técnica de DLS, e do Span para a técnica de LD, são determinantes para a validade dos resultados. Quanto menor o PDI, mais uniforme é a amostra, sendo que valores menores que 0,05 são raramente encontrados, exceto no caso de padrões altamente monodispersos. Valores maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho muito ampla (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2015b). Já no caso da LD, o chamado span é o indicativo da polidispersão da amostra pois é calculado com base nos valores de D10, D50 e D90, que se referem respectivamente aos diâmetros em que 10%, 50% e 90% das partículas da amostra têm tamanho menor (**figura 17 C**)(PARTICLE TECHNOLOGY LABS., 2015).

Para superar limitações relacionadas a uma possível polidispersão da amostra, bem como possibilitar uma análise confiável de amostras que potencialmente possam conter pequenas proporções de agregados (JENSEN et al., 2007), a combinação do DLS e LD com técnicas de separação, como cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), fracionamento em fluxo de campo (FFF), fracionamento capilar, são bastante úteis pois ocorre separação do analito por tamanho antes que este passe pelo detector, facilitando a análise (HUPFELD et al., 2010; SAKAI-KATO et al., 2011; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012).

Para o DLS e LD as propriedades ópticas da amostra e/ou do meio dispersante (dependendo do caso) como o índice de refração devem ser conhecidas, uma vez que na maioria dos casos os cálculos para determinação de tamanho dependem desse valor.



C

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

Figura 17 - Representação esquemática de um instrumento de difração a laser (A), do espalhamento de luz provocado por partículas grandes e pequenas (B) e da fórmula para o cálculo do span (C) Fonte: MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2014b; PARTICLE TECHNOLOGY LABS., 2015.

Na técnica de cromatografia por exclusão de tamanho deve-se ter o cuidado no uso das colunas, pois normalmente são preenchidas com partículas poliméricas coloidais que são propensas a entupimento e há risco de interações eletrostáticas entre o material de empacotamento da coluna e as nanopartículas do meio (JESORKA; ORWAR, 2008).

A cryo-TEM também pode ser usada para determinação de tamanho de partículas de até aproximadamente 400 nm (RANGELOV; MOMEKOVA; ALMGREN, 2010), no entanto um número substancial de partículas devem ser consideradas a fim de se obter um resultado aceitável, estatisticamente confiável (ANDERSON et al., 2013).

Um outro método que vem sendo utilizado para determinação do tamanho de partículas é a análise de rastreamento das (nano)partículas, também chamado de NTA ou PTA, que como o DLS, é baseado na detecção do movimento Browniano. Possui a vantagem de rastrear partículas individuais, o que propicia melhor resolução em amostras polidispersas e mostra pequenas diferenças de tamanho (FILIFE; HAWA; JISKOOT, 2010; ANDERSON et al, 2013). A luz espalhada pelas partículas é capturada por uma câmera digital e o movimento de cada partícula é rastreado quadro a quadro por um software (**Figura 18**). A movimentação das partículas está relacionada ao seu tamanho (diâmetro hidrodinâmico). Diferentemente do DLS, que fornece uma distribuição de tamanho baseada na intensidade de luz espalhada, o NTA é baseado numa análise partícula a partícula, o que fornece uma distribuição baseada em números. De forma semelhante ao DLS, o movimento das partículas é influenciado pela viscosidade do líquido e temperatura (NANOSIGHT, 2014).

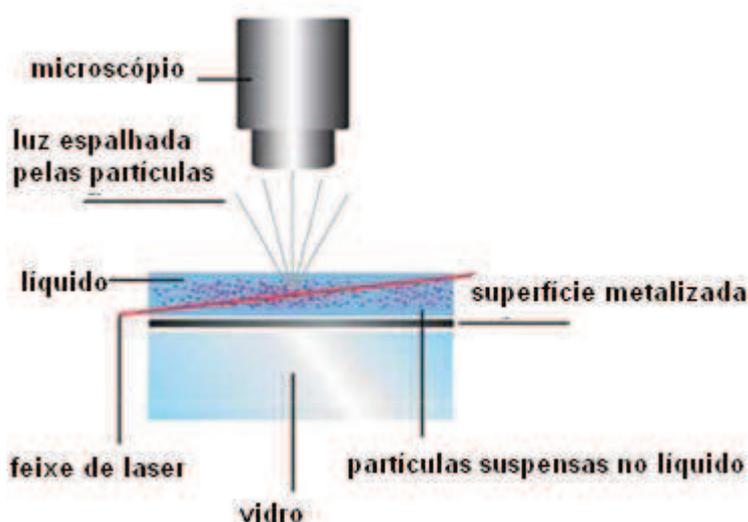


Figura 18 – Representação esquemática da técnica de análise da trajetória das partículas.
Fonte: NANOSIGHT, 2014.

9.2 Métodos para avaliação de carga elétrica superficial

A carga elétrica superficial de dispersões lipossomais, normalmente é estimada através do potencial zeta (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014a, 2014c). Ao redor de cada partícula é formada uma dupla camada elétrica a partir dos íons encontrados no meio: a primeira constitui-se de íons fortemente ligados à superfície (camada de Stern) e na segunda os íons tornam-se fracamente associados à superfície lipossomal à medida que se distanciam da superfície da partícula (camada difusa). Entre essas duas camadas há um local imaginário chamado de plano de deslizamento, cujo potencial elétrico é o que se denomina como potencial zeta (**Figura 19**). Os fatores mais importantes que afetam o potencial zeta, além da natureza das partículas, são a composição do meio (força iônica ou condutividade) e o pH (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014c).

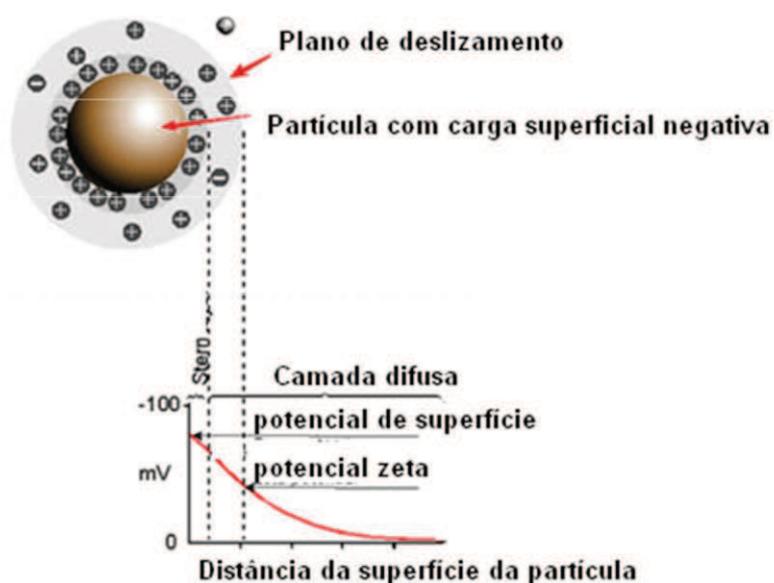


Figura 19: Representação esquemática da dupla camada elétrica formada em torno de uma partícula em suspensão e do local onde é medido o potencial zeta. Fonte: MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2014d.

O método mais comumente utilizado para determinar o potencial zeta é o espalhamento de luz eletroforético (ELS), também denominado velocimetria laser Doppler (LDV) (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014c). Esse método determina a velocidade de partículas submetidas à eletroforese, ou seja, é baseado na mobilidade eletroforética das partículas. Mediante a aplicação de um campo elétrico através de uma célula contendo a amostra, as partículas carregadas da dispersão lipossomal migram em direção ao eletrodo de carga oposta, conforme seu potencial zeta. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, maior a velocidade com que as partículas se movem, ou seja, maior a sua mobilidade

eletroforética (GRIT; CROMMELIN, 1993). Durante a eletroforese, um feixe de laser intercepta os lipossomos, que espalham a luz. A mobilidade eletroforética é determinada a partir da mudança da frequência da luz espalhada pelas partículas e depende do campo elétrico aplicado, constante dielétrica, viscosidade do meio e potencial zeta. O potencial zeta é então calculado a partir da mobilidade determinada com o uso de um cálculo matemático (GRIT; CROMMELIN, 1993; JONES, 1995; FRANZEN; ØSTERGAARD, 2012; MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014c).

Para lipossomos sem revestimento superficial, quanto maior o potencial zeta (em valor absoluto), maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor a tendência à agregação. Tipicamente é admitido que nesses casos, um potencial zeta de no mínimo [30]mV, é requerido para estabilização eletrostática. Portanto a redução do potencial zeta pode resultar em agregação a menos que os lipossomos sejam estabilizados estericamente. Nesse caso, devido à presença de uma barreira estérica proporcionada pelo componente de revestimento na superfície da partícula, a amostra pode ser estável mesmo se o potencial zeta for muito baixo (HEURTAULT et al, 2003).

No caso de lipossomos estabilizados estericamente, como os pegulados, o potencial zeta tipicamente diminui com o aumento da densidade do componente de revestimento. Isso pode ser explicado porque o plano de deslizamento é movido para mais longe da superfície da partícula devido à presença do componente de revestimento (GARBUZENKO et al, 2005). Nesse caso, o potencial zeta se relaciona com a densidade e natureza química do polímero de revestimento, bem como a espessura da camada formada. Para revestimentos neutros, quanto maior sua densidade, menor o potencial zeta (até um limite). (LEVCHENKO, 2002; MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014f).

Para as medidas de potencial zeta existem materiais de referência bem caracterizados que são dispersões de partículas com mobilidade eletroforética conhecida, e devem ser usados periodicamente para a verificação/ qualificação de desempenho do equipamento (FAIRHURST, 2013; BUMILLER, 2014; NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2014a). Um cuidado necessário para as medidas do potencial zeta é com relação ao preparo das amostras, que muitas vezes devem ser diluídas antes da análise. Para caracterizar a formulação, bem como para o monitoramento de sua estabilidade, o meio de diluição deve ser o mesmo da amostra uma vez que as características originais desta devem ser preservadas e o meio exerce grande influência nos resultados obtidos (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014c).

O desempenho do equipamento é muito importante para a exatidão da análise, sendo importante verificá-lo utilizando um padrão eletroforético. A limpeza da célula capilar, ausência de partículas estranhas e artefatos como bolhas de ar também são fundamentais para evitar interferência nos resultados. A resolução do pico obtido depende da intensidade

do campo aplicado (intensidades baixas fornecem resolução baixa) e do ângulo de espalhamento (MEULENAER; VAN DER MEEREN; VANDERDEELEN, 2006; MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2014c).

10. ANÁLISE CRÍTICA PARA FINS REGULATÓRIOS

As vesículas lipossomais, utilizadas pela indústria farmacêutica como sistemas carreadores de fármacos, possuem características peculiares. Elas não exercem ação farmacológica, mas são capazes de alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica de diversos agentes terapêuticos, sendo esse o principal objetivo do seu uso e o foco deste trabalho. É preciso ter em mente que em alguns casos os lipossomos são utilizados somente para viabilizar a ação de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em meio aquoso, não ficando retidos nas vesículas após a administração. Portanto, alguns itens discutidos nesse trabalho não se aplicam nesses casos. Dessa forma, antes da avaliação de um produto lipossomal, o primeiro item a ser observado é a finalidade dos lipossomos na formulação.

10.1 Os excipientes lipossomais

A maioria dos excipientes utilizados nos produtos lipossomais possuem funções específicas não somente para a viabilidade e estabilidade da formulação, mas também exercem um papel essencial no desempenho *in vivo* do produto, sendo os principais responsáveis pelas complexas interações entre as vesículas e os sistemas biológicos, além de influenciar direta ou indiretamente a liberação do fármaco. Portanto compreender a função de cada um dos excipientes do produto é essencial.

Os lípides são os compostos majoritários da formulação. A capacidade de encapsulamento, a integridade e estabilidade da bicamada dependem em grande medida das características dos lípides utilizados. Por isso devem receber a mesma atenção e o mesmo nível de exigência que o princípio ativo durante a avaliação regulatória. Ou seja, o fornecedor dos lípides deve ser qualificado. Seu processo de obtenção ou de extração (no caso de lípides obtidos de fontes naturais), incluindo reagentes, intermediários formados e potenciais impurezas, devem ser avaliados. Deve ser feito estudo da estabilidade dos lípides pelo fabricante.

Antes de tudo cabe fazer uma reflexão acerca da definição vigente de “excipiente”. Conforme a Lei 6360/76, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências, a definição de excipiente está incluída na

definição de matérias-primas: *substâncias ativas ou inativas que se empregam na fabricação de medicamentos e de outros produtos abrangidos pela Lei n° 6360/1976, tanto as que permanecem inalteradas quanto as passíveis de sofrer modificações.* A RDC 60/2014 que dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências, também adota esta definição. Na RDC 17/2010 que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos, a definição de excipiente também está incluída na de matéria-prima: *qualquer substância, seja ela ativa ou inativa, com especificação definida, utilizada na produção de medicamentos. Exclui-se dessa definição os materiais de embalagem.* A Consulta Pública CP 31/2012, que contém uma proposta de regulamentação quanto às Boas Práticas de Fabricação de Excipientes Farmacêuticos, é o único documento que contém uma definição específica de excipiente: *qualquer componente que não seja substância ativa, adicionado intencionalmente à formulação de uma forma farmacêutica.* Analisando as definições apresentadas nota-se uma tendência a considerar os excipientes como componentes inativos. No caso dos lipossomos, a maioria dos excipientes utilizados são partes fundamentais não somente do efeito farmacológico, mas também da ocorrência de efeitos adversos, o que os coloca numa posição muito além de meros adjuvantes ou auxiliares. Assim, o termo “inativo” não é adequado para designar a maioria dos excipientes lipossomais. Tampouco o termo “ativo” seria aplicável, pois a matéria-prima ou substância ativa da formulação é o fármaco. Portanto, pode-se dizer que o conceito de “matéria- prima” contido nas legislações mencionadas, não é adequado para englobar os excipientes lipossomais com as complexas funções mencionadas. O conceito adotado pela CP 31/2012 é mais abrangente, mas esta definição não caracteriza a importância desses componentes para a eficácia e segurança de formulações lipossomais.

10.2 Os paradoxos

Os diagramas de Ishikawa mostram os fatores que influenciam a eficácia, segurança e estabilidade de produtos lipossomais injetáveis. A análise de algumas particularidades desses produtos nos mostra sua complexidade. O PEG, usado em aproximadamente 15% das formulações atualmente comercializadas e em formulações potencialmente comercializáveis, é um componente muito benéfico por um lado, mas pode gerar preocupações dependendo da quantidade adicionada, podendo prejudicar a entrega do fármaco no local alvo, alterar a estabilidade da bicamada e provocar efeitos adversos.

Da mesma forma a dose de lípidos tem um caráter dual. Por um lado, uma alta dose de lípidos contribui para a estabilidade plasmática, o que é desejável, mas pode aumentar a toxicidade do produto.

A presença de carga elétrica superficial é desejável para a estabilidade de lipossomos convencionais. Porém, na maioria das vezes a presença dessa carga também propicia a ocorrência de interações não desejadas com componentes plasmáticos e celulares.

As interações entre lipossomos e componentes plasmáticos e celulares devem ser evitadas na medida em que essa interação é a principal responsável pela desestabilização ou eliminação dos lipossomos da circulação, mas por outro lado são desejadas na medida em que estão envolvidas no processo de liberação do fármaco no local alvo. Dessa forma, tudo o que interfere nessas interações torna-se crítico no processo de fabricação dos lipossomos.

10.3 Caracterização da formulação lipossomal

Considerando os atributos de qualidade descritos no **quadro 3**, e as complexas interações entre os lipossomos e componentes plasmáticos e celulares que afetam sua eficácia e segurança, conforme descrito no texto da dissertação, podemos extrair uma relação de testes que devem ser usados para caracterizar os lipossomos, conforme consta no **quadro 4**.

Nessa relação não constam testes produto-específicos, mas testes que se aplicam aos lipossomos de forma geral ou em alguns casos, a categorias específicas como lipossomos estabilizados estericamente ou com liberação estímulo-sensível (devidamente sinalizados na tabela). Também não estão incluídos testes comuns a outros produtos injetáveis não lipossomais, relacionados no item 10.4.

Antes de tudo, deve ser frisado que essa caracterização deve ser feita utilizando-se lotes comerciais, não sendo suficiente a caracterização de lotes piloto. Esta caracterização deve elucidar cinco aspectos: composição, propriedades, estrutura e funcionalidade/ desempenho, e deve ser preditiva da ação farmacológica do produto no organismo.

No que se refere à composição, deve ser feita uma análise quantitativa de cada componente e os requisitos de qualidade de cada um deles devem demonstrar sua identidade, qualidade e pureza.

Deve ser determinada a concentração de cada lipídeo individualmente no produto acabado, não sendo suficiente somente a análise de lípidos totais uma vez que a eficácia e segurança do produto, a estabilidade da formulação, assim como a estabilidade plasmática dependem de uma concentração ótima de cada lipídeo.

A quantidade de fármaco encapsulado e livre deve ser especificada. Na maioria dos casos o fármaco é um composto já aprovado para uso humano na sua forma livre. Portanto, nesses casos sua toxicidade já é conhecida na forma livre. O encapsulamento do fármaco no lipossomo pode ou não aumentar essa toxicidade. Dessa forma isso deve ser avaliado e considerado no momento de se estabelecer a especificação para a quantidade de fármaco livre e encapsulada.

No que se refere à estrutura, a comprovação da correta localização do fármaco (se está encapsulado no compartimento aquoso, incorporado na bicamada lipídica, associado na superfície) e ainda se encontra-se dissolvido, precipitado ou cristalizado é necessária pois impacta diretamente sua farmacocinética e farmacodinâmica.

Além disso, os lípides em meio aquoso podem formar diferentes estruturas supramoleculares além dos lipossomos, como por exemplo as micelas. Fármacos encapsulados em estruturas que não os lipossomos, apresentam perfil de liberação e estabilidade bastante diferentes. Portanto, a presença de outras estruturas supramoleculares altera a farmacocinética e farmacodinâmica do princípio ativo. Dessa forma, deve ser demonstrado que o processo produtivo não forma outras estruturas diferentes dos lipossomos ou que estas são eliminadas da formulação.

Outro aspecto importante é a comprovação de densidade adequada do polímero na superfície lipossomal, no caso de formulações lipossomais que os contém. Durante processos produtivos que utilizam polímeros associados a lípidos, ou seja, em que a inserção do polímero é feita antes da formação das vesículas, esses polímeros podem se distribuir tanto na parte interna quanto na parte externa da bicamada. Porém, somente quando localizados na parte externa são capazes de exercer o efeito desejado de estabilização estérica e de proteção das vesículas. Portanto, a determinação da concentração do componente de revestimento no produto final nem sempre reflete a real cobertura da superfície do lipossomo, sendo necessária a verificação de sua densidade utilizando metodologias apropriadas.

No caso de lipossomos com carga elétrica líquida, deve ser estabelecida uma correlação entre o pH da superfície lipossomal e o pH da formulação, para o controle da qualidade do produto e monitoramento da estabilidade da formulação.

Já o desempenho do produto leva em consideração suas interações com o meio biológico, a forma com que os lipossomos interagem com células e componentes plasmáticos e a liberação do fármaco.

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA (A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C).

Teste	Justificativa	Presente em
Interação do fármaco com o lipossomo /Partição do fármaco óleo-água ¹	A localização do fármaco e sua interação com o lipossomo, a sua afinidade pela bicamada, influenciarão a estabilidade do encapsulamento, o perfil de liberação do fármaco e o desempenho do produto in vivo.	A
Potencial zeta ^{1*}	O potencial zeta está relacionado à carga elétrica superficial. Influencia fenômenos de agregação/ fusão, tempo de circulação, estabilidade plasmática, interação/ captação celular e hipersensibilidade. Para vesículas convencionais o valor mínimo recomendado é 30mV (valor absoluto). Alterações no potencial zeta são indícios de problemas de estabilidade. Para vesículas estabilizadas estericamente não há um valor mínimo.	A,B,C
Condutividade ^{1*}	Avalia a força iônica ou concentração de eletrólitos no meio aquoso, que influencia fenômenos de agregação/ fusão.É desejável baixa condutividade no caso de formulações contendo lipossomos não estabilizados estericamente	N/A
Comportamento de transição de fase ^{1*}	Quando há transição de fase da bicamada, esta define a estabilidade dos lipossomos na formulação e na circulação, bem como o perfil de liberação para lipossomos termosensíveis. Para estabilidade adequada a temperatura de transição de fase da bicamada deve ser acima de 37°C.	A,B,C

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos -C)(**continuação**)

Teste	Justificativa	Presente em
Propriedades osmóticas ^{1*}	Os lipossomos podem aumentar ou reduzir o volume interno aquoso mediante variações na concentração de compostos não solúveis no seu interior ou no meio externo.	B
Identificação e quantificação dos lípides ¹	A Identificação e quantificação de cada lípide individualmente é fundamental para a integridade da membrana, estabilidade (físico-química e plasmática), interação com componentes celulares e toxicidade do produto.	A,B,C
Quantificação/caracterização de componentes sensíveis a estímulo ⁵	Para lipossomos com sensibilidade a estímulo, esses componentes são determinantes para a liberação do fármaco. Influenciam também a estabilidade da formulação.	N/A
Lamelaridade ¹	Influencia a estabilidade plasmática, perfil de liberação do fármaco e eficiência de encapsulamento	B,C
Razão fármaco/lípide ¹	Influencia estabilidade plasmática, liberação do fármaco e hipersensibilidade	A,B,C
Identidade, concentração e distribuição do crioprotetor ²	Influencia a estabilidade das vesículas durante e após o processo de liofilização.	N/A

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C)(continuação)

Teste	Justificativa	Presente em
Oxidação ^{1*}	A oxidação pode desestruturar a bicamada, aumenta a permeabilidade da membrana e favorece agregação das vesículas.	A,B
Hidrólise ^{1*}	A hidrólise pode desestruturar a bicamada, aumenta a permeabilidade da membrana e favorece agregação das vesículas.	A,B
Distribuição de tamanho de partícula ^{1*}	O tamanho das vesículas afeta o direcionamento do fármaco, sua captação pelas células, estabilidade plasmática e de prateleira, o tempo de circulação na corrente sanguínea, o perfil de liberação do fármaco e toxicidade do produto. A homogeneidade quanto à distribuição de tamanho das vesículas é essencial para se ter o efeito farmacológico esperado.	A,B,C
Identificação de agregação/fusão ^{1*}	A agregação e fusão são indicativas de falta de estabilidade do produto, e podem ocasionar alteração na biodistribuição dos lipossomos, embolismo e perda do fármaco encapsulado (no caso da fusão).	A,B
Morfologia ¹	Afeta o tempo de circulação, a forma como os lipossomos são transportados através da vasculatura, captação celular e hipersensibilidade.	A,B,C
Quantificação do fármaco encapsulado ^{1*}	Somente o fármaco encapsulado terá a farmacocinética e farmacodinâmica esperadas e em muitos casos também a ação farmacológica esperada.	A,B,C

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C)(continuação)

Teste	Justificativa	Presente em
Quantificação do fármaco livre ^{1 *}	O fármaco na forma livre pode interferir nas propriedades farmacológicas na toxicidade da formulação e é um indicativo de instabilidade do produto.	A, B, C
Perfil de liberação do fármaco encapsulado ¹	Não há ação terapêutica sem liberação do fármaco das vesículas. O perfil dessa liberação é um fator determinante para a eficácia e segurança do produto. É desejável que não haja liberação precoce do fármaco ou que esta seja negligenciável	A, B, C
Identidade do componente de revestimento ³	As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e a estabilidade variam conforme o componente de revestimento, conforme seu peso molecular, bem como o respectivo lipídeo ao qual está ligado.	A, C
Concentração do componente de revestimento ³	Essencial para o efeito estabilizador e protetor da vesícula na formulação e no plasma, o que afeta o tempo de circulação, a interação do lipossomo com as células e imunogenicidade.	C
Densidade do componente de revestimento na superfície lipossomal ³	Influencia as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da formulação. Somente quando localizado na superfície lipossomal o componente de revestimento é funcional. Caso sua inserção seja feita após a formação das vesículas esse teste pode ser dispensado.	A

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C)(**continuação**)

Teste	Justificativa	Presente em
Estabilidade da ligação entre componente de revestimento e lípide ³	O revestimento deve permanecer na superfície lipossomal, resistindo ao tempo de armazenamento e à circulação sanguínea.	A
Conformação da cadeia do polímero de revestimento ³	Somente na conformação ideal, o polímero de revestimento promove uma cobertura adequada da superfície lipossomal.	N/A
Identidade, Concentração do componente direcionador ⁴	Determina a avidéz do ligante em relação ao receptor e no caso de componentes magnéticos, a habilidade de direcionamento.	N/A
Estabilidade da ligação entre componente direcionador e lipossomo ^{4*}	O componente direcionador deve permanecer associado ao lipossomo resistindo ao tempo de armazenamento e à circulação sanguínea.	N/A
Conformação do ligante ⁴	Essencial para a interação ligante-receptor. Mudanças na conformação podem impedir essa ligação.	N/A
Presença de outras estruturas lipídicas ¹	Potencialmente essas estruturas podem ser formadas concomitantemente aos lipossomos o que altera a farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco.	N/A

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C)(continuação)

Teste	Justificativa	Presente em
Gradiente iônico transmembrana ^{6 *}	Mantém o fármaco encapsulado e é um fator determinante para a estabilidade da formulação na armazenagem e no plasma, bem como para o perfil de liberação do fármaco.	C
Forma cristalina do fármaco ^{6 *}	Importante para o perfil de liberação do fármaco e desempenho <i>in vivo</i> .	A, C
Concentração dos íons responsáveis pelo gradiente transmembrana ^{6 *}	Propiciam as condições para o estabelecimento do gradiente transmembrana e do pH intralipossomal.	C
pH intralipossomal ^{6 *}	Importante para a estabilidade da formulação e desempenho <i>in vivo</i> .	A, C
Fusogenicidade ¹	É uma propriedade importante para a liberação do fármaco no sítio alvo mas que, se não controlada, pode gerar toxicidade.	N/A
Captação/interação celular ¹	A interação dos lipossomos com as células alvo influencia a liberação do fármaco. A interação com as células envolvidas na eliminação dos lipossomos da corrente sanguínea, como os macrófagos, afeta o tempo de circulação. Ambos afetam a ação farmacológica.	A

Quadro 4 – Testes para caracterização e estabilidade (marcados com *) de formulações lipossomais injetáveis, com indicação de sua presença ou não nos documentos publicados pela EMA(A) ou FDA (requisitos gerais para produtos lipossomais - B e produto-específicos - C)(conclusão)

Teste	Justificativa	Presente em
Interação lipossomos- componentes plasmáticos ¹	A interação com componentes plasmáticos como as proteínas normalmente precede a eliminação dos lipossomos da circulação sanguínea e afeta a estabilidade plasmática.	A,B
Quantificação do fármaco livre e encapsulado no plasma ¹	Após administração, o fármaco deve permanecer na circulação sanguínea majoritariamente na sua forma encapsulada até alcançar o local alvo.	A,B,C
Teste de ativação do complemento ¹	A hipersensibilidade pode ocorrer com produtos peguados ou não peguados e é multifatorial.	A

¹ aplicável a todas as formulações lipossomais; 2 aplicável a formulações lipossomais liofilizadas

3 aplicável a formulações lipossomais estabilizadas estericamente; 4 aplicável a formulações lipossomais com direcionamento ativo

5 aplicável a formulações lipossomais estímulo-sensíveis; 6 aplicável a formulações lipossomais com gradiente eletroquímico transmembrana

10.4 Controle de qualidade do produto acabado

A análise do produto final é uma das formas de se comprovar sua qualidade e o cumprimento das especificações. Os testes de rotina normalmente devem incluir verificação da identidade e quantidade dos componentes da formulação, potência do produto, impurezas relacionadas ao processo e ao produto e ausência de contaminantes. Na rotina de fabricação de produtos lipossomais, nem todos os testes constantes no **quadro 4** precisam ser realizados, apesar de todos serem relevantes seja para sua eficácia, toxicidade ou estabilidade. As análises de rotina devem ser suficientes para confirmar sua qualidade e dependerá do produto em questão, da avaliação de risco de cada fabricante considerando a forma com que seu produto foi desenvolvido (se foi adotada a abordagem de *quality by design*), seu histórico de produção, a robustez do processo produtivo bem como os controles efetuados durante o processo e a consistência de fornecimento e das análises efetuadas nas matérias-primas.

O fabricante deve ser capaz de mostrar que cada lote do produto acabado possui as características necessárias relacionadas no **quadro 4** de acordo com a aplicabilidade a cada caso e conforme o teste em questão, seja por meio de análises de rotina, controles consistentes durante o processo, apresentando justificativas científicas plausíveis baseadas em estudos prévios ou baseado no desenvolvimento do produto.

Porém há de se notar que algumas dessas características merecem destaque pela participação direta concomitantemente na eficácia, toxicidade e estabilidade, conforme destacado no **quadro 3**. São elas: tamanho/ distribuição de tamanho de partícula, carga elétrica superficial, composição do lipossomo (identidade e proporção dos lípides e componentes de revestimento), quantificação dos componentes estímulo-sensíveis, quantificação do fármaco encapsulado/livre, perfil de liberação do fármaco, ambiente intralipossomal (pH, gradiente iônico transmembrana e concentração dos íons responsáveis pelo gradiente), estado fisicoquímico (forma cristalina) do fármaco encapsulado e transição de fase da membrana lipídica (quando existe).

Analisando visualmente os diagramas de Ishikawa, nota-se uma influência massiva da composição do lipossomo, tamanho/distribuição de tamanho de partícula e carga elétrica superficial principalmente na eficácia (**figura 4**) e toxicidade (**figura 10**) de formulações lipossomais. Além disso, as características do meio (pH, composição, força iônica) apresentam influência marcante na estabilidade (**figura 11**).

Dada a relevância dos atributos de qualidade acima descritos, bem como a possibilidade de serem alterados durante o processo produtivo, esses atributos deveriam ser avaliados a cada lote, conforme a aplicabilidade ao produto em questão.

A pureza é um dos itens que devem ser demonstrados na produção lote a lote. A principal fonte de potenciais impurezas geradas durante o processo produtivo é a degradação dos lípides por processos de oxidação e hidrólise. Considerando que os lípides são os componentes majoritários das formulações lipossomais e altamente susceptíveis a essas duas vias hidrolíticas, tanto produtos de degradação como os antioxidantes (fundamentais para evitar a propagação da oxidação) deveriam ser quantificados a cada lote.

Caso algum dos atributos de qualidade não seja avaliado lote a lote, deve haver uma justificativa cientificamente embasada para tal, de forma que o fabricante seja capaz de assegurar que a identidade, quantidade dos componentes e pureza da formulação sejam demonstradas para cada lote. Nesses casos, ainda que seja justificável a ausência de avaliação de algum desses atributos, faz-se necessária sua análise periódica em intervalos regulares.

Como mencionado anteriormente, a definição das análises de rotina depende, dentre outros fatores, do tipo de produto fabricado. Dessa forma, outros testes podem ser necessários para análise rotineira. Por exemplo, para produtos com direcionamento ativo, a avaliação da densidade e concentração do componente direcionador provavelmente deveria ser realizada rotineiramente.

Deve ser observado que além dos testes específicos para produtos lipossomais incluídos no **quadro 4**, devem ser considerados os seguintes testes comuns a produtos injetáveis não lipossomais: aparência; identificação, pureza e concentração do fármaco; perfil de impurezas do produto; uniformidade de dose; material particulado; pH; quantificação do antioxidante, determinação de íons metálicos, osmolalidade; redispersibilidade; esterilidade; pirogenicidade. Como a maioria dos processos de produção de lipossomos utiliza solventes orgânicos para dispersão dos lípides, é necessário o teste de solventes residuais no produto acabado. No caso dos produtos liofilizados, além desses testes também deve ser analisado o conteúdo de água e tempo de reconstituição.

10.5 Principais métodos utilizados para avaliar distribuição de tamanho e carga elétrica superficial

10.5.1 Determinação de tamanho de partículas

Considerando as limitações de cada método, e dependendo do índice de polidispersão da amostra, pode ser necessária uma combinação de diferentes técnicas a fim de caracterizar a distribuição de tamanho das partículas. A caracterização do produto é necessária para a definição do método ideal para o monitoramento de rotina.

As especificações devem ser definidas conforme a propriedade da partícula mensurada para o cálculo de tamanho, que dependerá do método utilizado. Ou seja, a especificação varia conforme o método utilizado.

Um item muito importante a ser considerado durante a validação desses métodos é a faixa de operação que se pretende trabalhar, que deve considerar não somente o tamanho de partícula que se deseja alcançar mas também a capacidade do método em detectar partículas menores ou maiores, conforme as variações inerentes ao processo produtivo.

O número de partículas analisadas para a determinação da distribuição de tamanho por métodos de contagem, normalmente é menor que no caso dos métodos de análise em conjunto. Portanto para esses métodos a representatividade da amostra é ainda mais crítica.

O preparo das amostras é uma etapa crítica da análise, pois pode interferir negativamente nos resultados caso seja feita de forma inadequada. Possíveis partículas interferentes do meio de diluição devem ser eliminadas, geralmente utilizando filtro 0,22 μm , principalmente durante a análise de lipossomos menores que 100nm.

Geralmente para os métodos de DLS, LD e NTA devem ser conhecidas as propriedades ópticas da amostra e do meio dispersante, a fim de que os resultados obtidos sejam confiáveis. Para os métodos de DLS e NTA, é necessário que seja conhecida a viscosidade do meio na mesma temperatura em que a análise será efetuada, uma vez que a temperatura afeta a viscosidade e esta afeta o movimento das partículas e conseqüentemente o resultado da análise.

Os equipamentos devem ser verificados periodicamente quanto ao seu desempenho, com uso de materiais de referência fornecidos por órgãos específicos reconhecidos nacionalmente, ou devem ser rastreáveis a estes.

10.5.2 Determinação da carga elétrica superficial

A carga superficial do lipossomo é um fator determinante para sua interação com componentes plasmáticos e celulares. Portanto, deve haver uma faixa ótima onde as interações indesejadas sejam minimizadas e as desejadas sejam maximizadas.

A forma mais usual para se estimar a carga elétrica superficial de lipossomos é o potencial zeta. No caso de lipossomos sem revestimento, quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, maior a repulsão entre as partículas. Para estabilização físico-química de formulações aquosas, geralmente [30mV] é considerado o valor mínimo. No caso de lipossomos com revestimento polimérico esse critério não se aplica.

O método mais comumente utilizado é o ELS, e a mobilidade eletroforética das partículas depende do campo elétrico aplicado (intensidades baixas fornecem resolução baixa), viscosidade do meio (afeta a mobilidade das partículas) e constante dielétrica. O desempenho do equipamento deve ser verificado periodicamente com um padrão eletroforético. A limpeza da célula capilar e a ausência de artefatos como bolhas de ar também são fundamentais para que não haja interferência negativa nos resultados.

O pH e a composição do meio afetam diretamente o potencial zeta. Assim o ideal é que se analise uma amostra no seu estado original, para que os resultados sejam o mais próximo possível da situação real em que o produto ficará armazenado ou será utilizado.

10.6 Especificações

Através da análise dos diagramas de Ishikawa nota-se que um único atributo de qualidade pode influenciar de diversas formas a eficácia, toxicidade e estabilidade de formulações lipossomais. Assim, pequenas variações nesses atributos podem ter grande impacto no desempenho ou qualidade do produto. Por exemplo, o tamanho das vesículas é um atributo que tem impacto no direcionamento do fármaco, captação celular, estabilidade, tempo de circulação, liberação do fármaco e toxicidade. Assim, se o fabricante estabelece uma faixa de 75 a 100 nm para o tamanho médio das partículas, é preciso demonstrar que o desempenho *in vivo* de uma formulação com tamanho médio de 75nm é equivalente ao desempenho de uma formulação com tamanho médio de 100 nm. Nesse sentido, um outro fator bastante importante para garantir a especificação de tamanho do produto, é o tamanho de poro da membrana no caso da técnica de extrusão. O tamanho de poro deve ser especificado e o fornecedor das membranas deve ser qualificado de forma a garantir homogeneidade lote a lote.

O fabricante deve ser capaz de justificar as especificações estabelecidas para cada atributo de forma a correlacioná-las com seu desempenho *in vivo*. A quantidade de fármaco livre permitida deve ser especificada e devidamente justificada, de forma que a eficácia e segurança do produto sejam mantidas.

10.7 Estabilidade

A estabilidade físico-química e plasmática da formulação estão entre os maiores desafios a serem superados pelos fabricantes de produtos lipossomais. Nesse sentido, a remoção da água diminui o risco de problemas relacionados à estabilidade, tornando as formas farmacêuticas liofilizadas melhores alternativas. Porém até o momento isso não é uma realidade.

Dada a importância das vesículas lipossomais para a ação do medicamento, é de extrema importância que suas características físicas e químicas sejam mantidas ao longo de toda a vida útil do produto. As formulações lipossomais podem ser comercializadas na forma de dispersão aquosa, pó liofilizado ou como kits contendo a dispersão lipossomal, o princípio ativo liofilizado e a solução tampão para reconstituição (e encapsulamento do ativo) no momento do uso. O risco de problemas relacionados à estabilidade dessas formulações está diretamente relacionado à sua forma farmacêutica. As apresentações em que os lipossomos se encontram dispersos em fase aquosa, principalmente as que contêm o fármaco encapsulado, são as que oferecem maior risco e são mais sujeitas a instabilidade química e física. Apesar disso, conforme mostrado no **gráfico 1**, 77% dos produtos lipossomais atualmente comercializados encontram-se na forma aquosa sendo que destes 62% são dispersões lipossomais contendo o fármaco e 15% são dispersões aquosas contendo lipossomos vazios para reconstituição e encapsulamento do fármaco no momento do uso. Somente 23% são pós liofilizados lipossomais. Dentre os produtos ainda em fase de testes clínicos, existem muitos na forma aquosa (**quadro 2**).

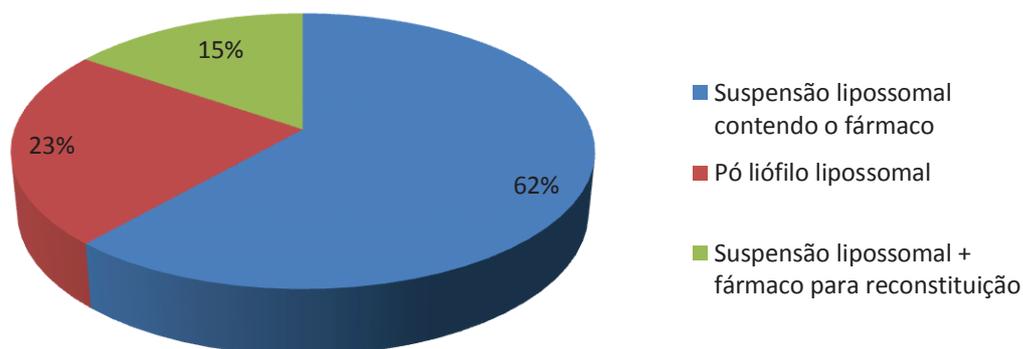


Gráfico1 –Apresentação dos produtos lipossomais injetáveis comercializados no Brasil, EUA e Europa.

As formulações comercializadas sob a forma aquosa são mais propensas a problemas de estabilidade, enquanto as liofilizadas estão sujeitas a estes problemas em grau muito menor. A ocorrência de agregação, fusão e liberação precoce do fármaco está relacionada ao desempenho do processo de liofilização. Os problemas de estabilidade podem ocorrer não somente durante o período de armazenagem do produto final, mas durante o processo produtivo, portanto a estabilidade da formulação deve ser avaliada também em estágios intermediários de produção, sempre que o produto for exposto a condições que potencialmente possam provocar instabilidade.

Além disso, vale ressaltar que todas as formulações, independente da apresentação, serão administradas como dispersões aquosas contendo o fármaco encapsulado nos lipossomos. Portanto a estabilidade pós- reconstituição deve ser avaliada, considerando os mesmos testes utilizados para as dispersões aquosas.

10.7.1 Oxidação e hidrólise

A oxidação e a hidrólise são processos degradativos que envolvem a formação de diferentes subprodutos, primários e secundários. À medida que esses processos evoluem, a concentração do lípide diminui enquanto a concentração dos subprodutos primários e secundários aumenta. Dessa forma, para avaliação e acompanhamento desses processos degradativos é importante que sejam combinados métodos que quantifiquem o lípide não degradado e os produtos de degradação.

Existem vários métodos que podem ser usados para essa determinação, sendo que estes devem levar em consideração os produtos intermediários e finais da hidrólise e oxidação para evitar subdimensionamento. Portanto os métodos utilizados devem refletir o processo degradativo dos lípides, ou seja, deve-se conhecer o mecanismo de degradação bem como os subprodutos formados a fim de se definirem os métodos ideais para cada caso. É importante demonstrar que o método é seletivo para os produtos em questão pois interferentes podem estar presentes como subprodutos originados da degradação do antioxidante.

No caso de processos degradativos que ocorrem em pequena proporção, pode-se utilizar um método que quantifique um subproduto que não apresenta degradação subsequente, ou seja, não hidrolizável ou oxidável.

Técnicas cromatográficas e espectrofotométricas são preferíveis devido à maior precisão na obtenção dos resultados e menos interferentes.

Considerando que a temperatura favorece a hidrólise e a oxidação é induzida pelo oxigênio, é importante que as amostras a serem analisadas estejam protegidas da exposição a tais fatores e que as condições da análise sejam controladas nesse sentido.

10.8 Processo produtivo

As vesículas lipossomais podem ser produzidas por diferentes métodos que foram brevemente descritos por não ser este o foco do trabalho. No entanto, o processo produtivo tem impacto na eficácia, toxicidade e estabilidade dos lipossomos, o que pode ser observado nos diagramas de Ishikawa (**figuras 4, 10, 11**). Assim, alguns aspectos pontuais podem ser observados conforme descrito a seguir.

10.8.1 Etapas críticas

A determinação das etapas e dos parâmetros operacionais críticos, e o monitoramento de ambos durante o processo é fundamental para a qualidade do produto final. As empresas fabricantes devem fazer uma análise minuciosa dos fatores relacionados ao processo produtivo que impactam os atributos de qualidade do produto, a fim de determinar a criticidade de cada etapa considerando sua capacidade e a forma com que elas influenciam cada atributo. Considerando os diagramas de Ishikawa (**figuras 4, 10 e 11**), os itens descritos no **quadro 4**, e o item 10.4, no que se refere ao processo produtivo, pode-se considerar crítico:

- Quantidade adicionada de cada lípide individualmente;
- Quantidade adicionada dos componentes de revestimento e componentes direcionadores quando houver;
- Formação das vesículas;
- Remoção do solvente orgânico comumente utilizado na dispersão dos compostos hidrofóbicos;
- Método de encapsulamento;
- Estabelecimento do gradiente de pH quando utilizada essa técnica para encapsulamento ;
- Calibração do tamanho das vesículas;
- Remoção do fármaco livre não encapsulado;
- Etapa de liofilização (quando houver);
- Etapa de esterilização.

Considerando a propensão dos lípides à oxidação, deve ser evitado o contato destes com oxigênio, ou seja, o processo produtivo deve ser conduzido em atmosfera de gás inerte.

Quando o lipossomo possuir ligantes sujeitos a mudança de conformação, como ligantes peptídicos, deve-se garantir que o processo de conjugação não altere sua conformação.

10.8.2 Parâmetros operacionais

Os parâmetros operacionais das etapas mencionadas no item anterior devem ser rigorosamente estabelecidos e monitorados, pois estes terão impacto direto nos atributos de qualidade do produto (**quadro 5**).

Quadro 5 -Parâmetros operacionais que devem ser controlados durante a produção de formulações lipossomais injetáveis

Parâmetro	Justificativa
Temperatura	Influencia o estado físico da membrana (gel ou cristal líquido), a eficiência de formação de vesículas, a taxa de encapsulamento; temperaturas altas podem degradar os lípides e induzir oxidação. Lípides que possuem polimorfismo (como DOPE) não formam bicamada em determinadas temperaturas.
pH	Influencia a taxa de encapsulamento no caso de técnicas baseadas em gradiente de pH. A hidrólise dos lípides é influenciada por alterações de pH
Condutividade	Após a formação dos lipossomos, mudanças na força iônica do meio aquoso podem gerar variação da pressão osmótica que geram deformações na vesícula e possível extravasamento do fármaco.
Pressão e número de ciclos	Para a homogeneização em alta pressão, técnica mais utilizada para calibração do tamanho das vesículas, esses parâmetros são essenciais na definição do tamanho e polidispersão das vesículas.
Parametros de liofilização	A temperatura, pressão e tempo de liofilização afetam a qualidade do produto final.

10.8.3 Embalagem

A embalagem do produto deve mantê-lo em condições favoráveis à sua estabilidade e protegê-lo dos efeitos deletérios provocados pela sua exposição ao ambiente. A eliminação do oxigênio do recipiente que contém o produto acabado evita a oxidação lipídica. No caso de lipossomos cuja liberação do fármaco é fotossensível, a embalagem primária deve protegê-lo da luz, de forma a impedir a liberação precoce do fármaco.

10.9 Armazenamento e Transporte

É fundamental que o lipossomo se mantenha íntegro durante todo o prazo de validade do produto, de forma a evitar sua degradação ou o extravasamento do fármaco encapsulado, principalmente no caso das formulações lipossomais em dispersão aquosa. Dessa forma, o armazenamento e o transporte do produto devem ser feitos em temperaturas menores que a temperatura de transição de fase (T_m) da bicamada lipídica (pelo menos 30°C abaixo da temperatura de transição de fase dos lípides), caso ela exista, não devendo ser armazenados em temperatura inferior a 2°C . Assim nesses casos, bem como no caso de lipossomos cuja liberação do fármaco é termosensível, o produto deve ser armazenado e transportado sob refrigeração ($2-8^\circ\text{C}$). O local onde são armazenados e o veículo onde são transportados devem ter monitoramento contínuo de temperatura.

As condições de armazenamento e transporte do produto também não devem favorecer a ocorrência de hidrólise e oxidação dos lípides.

10.10 Validações

Considerando a susceptibilidade das vesículas à instabilidade, deve ser demonstrado que o processo produtivo não impacta a integridade dos lipossomos e não provoca mudanças na estrutura da bicamada, principalmente no caso de etapas com condições de execução que podem gerar estresse físico ou químico, como a liofilização e homogeneização em alta pressão.

Procedimentos realizados durante o controle de qualidade dos lipossomos como diluição e centrifugação podem induzir a liberação do fármaco ou comprometer a integridade da membrana, o que pode interferir nos resultados da análise. A fase estacionária das colunas utilizadas para separação do fármaco não encapsulado pode interagir com os lipossomos e liberar o fármaco. Portanto, durante a validação de métodos analíticos, deve ser demonstrado que tais procedimentos não interferem nos resultados.

10.11 Mudanças

Qualquer mudança que impacte os atributos de qualidade relacionados no **quadro 4**, como alterações na composição ou concentração dos componentes da formulação, no processo produtivo, parâmetros operacionais, fornecedores de matérias-primas ou mudanças no seu processo de síntese, devem ser feitas com extrema cautela, e se necessário, além dos testes físico-químicos devem ser feitos novos estudos para garantir que o desempenho do produto *in vivo* não foi alterado.

Alterações na razão dos lípides podem resultar em lipossomos com propriedades diferentes da estabelecida, alterando inclusive o comportamento *in vivo* do produto.

Mudanças na escala de produção geralmente envolvem alterações no processo produtivo, que também pode impactar o desempenho *in vivo*.

No caso de fármacos encapsulados pela técnica de gradiente iônico transmembrana, mudanças aparentemente pequenas como a troca de um contraíon (por exemplo de sulfato de amônio para fosfato de amônio), influenciam enormemente a estabilidade físico-química da formulação e a liberação do fármaco.

Tendo em vista a complexidade dos fatores que levam a um efetivo direcionamento do fármaco às células alvo, a análise de sistemas lipossomais com testes *in vitro* torna-se muitas vezes limitada, além de não levarem em consideração seu complexo processo de transporte. As interações com o meio biológico são o resultado de várias propriedades que estão sujeitas a modificações ao longo do tempo e com o acúmulo de pequenas alterações como trocas de equipamento, fornecedores, etc., que podem afetar a atividade biológica, captação/interação celular, ativação do sistema complemento e interações com componentes plasmáticos. Dessa forma, a utilização de testes *in vivo* como monitoramento periódico pode ser necessária.

10.12 Interface com estabelecimentos de saúde

Todos os medicamentos lipossomais injetáveis comercializados até o momento são de uso hospitalar (**quadro 2**). Os hospitais e estabelecimentos de saúde tornam-se parte importante da cadeia produtiva, principalmente no caso de produtos cujas apresentações exigem reconstituição antes do uso, especialmente as que possuem lipossomos em dispersão aquosa para encapsulamento “ativo” do fármaco antes do uso como é o caso do Marqibo e Myocet. O processo de reconstituição ou de preparo para administração no ambiente hospitalar envolve etapas críticas do processo. Tais etapas exigem um controle restrito de temperatura, tempo e agitação. Portanto, as instruções para sua execução devem ser detalhadas, precisas, e devidamente validadas. Além disso, devem estar

presentes na bula do medicamento. Devem ser mantidos registros de todas as etapas executadas, parâmetros operacionais, materiais e instrumentos utilizados, bem como a calibração e qualificação destes. O pessoal responsável pela execução das etapas deve ser devidamente treinado pelo fabricante.

Da mesma forma, os equipamentos utilizados para proporcionar estímulos externos, como os lipossomos cujo processo de liberação do fármaco depende de fontes externas de calor, luz ou ultrassom, devem ser calibrados e qualificados para este fim.

10.13 Paralelo entre o conteúdo do presente trabalho e dos documentos publicados pelo FDA e EMA

No âmbito regulatório, os documentos publicados pelo FDA em rascunho com recomendações gerais para registro de produtos lipossomais (*Guidance for industry – Liposome Drug Products - Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation*) e com recomendações específicas para produtos lipossomais IV desenvolvidos em relação a um produto de referência (anfotericina B, doxorubicina, daunorubicina e verteporfina), bem como o documento publicado pela EMA com requisitos gerais para registro de produtos lipossomais IV desenvolvidos em relação a um produto de referência (*Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product*) foram os únicos encontrados contendo recomendações referentes a produtos lipossomais.

Conforme consta no **quadro 4**, não há um consenso quanto aos testes necessários para caracterização do produto, uma vez que poucos estão presentes em todos os documentos publicados pela EMA e FDA (~27%). Cerca de 24% dos testes relacionados no **quadro 4** não constam em nenhum dos documentos publicados. É claro que deve-se levar em consideração os diferentes objetivos de cada um deles. No documento publicado pela EMA e nos rascunhos produto-específicos publicados pela FDA, o foco é sempre a comparação de um produto lipossomal em relação ao inovador (referência). No documento da EMA, apesar desse foco restrito nota-se a ausência de alguns testes essenciais como lamelaridade, e para produtos que utilizam a técnica de encapsulamento “ativo”, falta a determinação do gradiente iônico transmembrana e concentração dos íons responsáveis pelo gradiente. Quanto aos documentos publicados pelo FDA, não são contemplados itens como a avaliação da interação entre lipossomos e células, importante para qualquer formulação lipossomal injetável; densidade do revestimento polimérico na superfície lipossomal e estabilidade da ligação polímero-lípide, relevantes para lipossomos com revestimento polimérico.

O documento da FDA com recomendações gerais para produtos lipossomais, descreve os principais problemas de estabilidade de produtos lipossomais, mas não entra no mérito de como detectá-los. Contém observações com relação a mudanças, incluindo a necessidade de nova caracterização do produto, e se necessário testes *in vivo* para demonstrar que o produto pré e pós alteração são equivalentes. Menciona também a necessidade de identificar e avaliar os parâmetros críticos do processo produtivo.

Recomendações específicas quanto às validações, armazenamento e transporte, especificações e métodos analíticos para caracterização do produto não são abordadas em nenhum dos documentos.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de regulação envolve a tomada de decisões que requerem conhecimento. A habilidade de uma autoridade regulatória cumprir sua missão de proteger e promover a saúde da população está diretamente relacionada à sua capacidade de buscar esse conhecimento, que muitas vezes é dominado pela indústria farmacêutica, e utilizá-lo para a elaboração de legislações, guias, e recomendações, assim como para a avaliação de pedidos de registro, realização de inspeções sanitárias e acompanhamento dos produtos no mercado.

O diagrama de causa e efeito (Ishikawa) é útil para elucidar as causas de eventos específicos. A utilização de ferramentas como essa pode ser uma grande aliada no processo regulatório, pois além de auxiliar a resolução de problemas, permite uma análise sistemática sobre um determinado tópico, seja ele um problema a ser avaliado ou não.

Essa ferramenta permite uma exploração mais aprofundada das questões relacionadas a problemas identificados em produtos e processos regulados, bem como processos de trabalho, o que levará a uma resolução mais robusta do problema.

Por permitir análises sistemáticas sobre um determinado evento, possibilita um maior conhecimento deste, e estimula a busca por informações mais aprofundadas e específicas acerca do tema, o que direciona os esforços regulatórios e os torna mais racionais.

É importante frisar que o grupo de medicamentos nanotecnológicos é altamente diverso, contendo desde lipossomos e nanomateriais baseados em polímeros e carbono até implantes em tecidos. Assim, é inviável a publicação de um guia geral que contemple os medicamentos nanotecnológicos como uma categoria, uma vez que isso poderia levar a lacunas na avaliação da qualidade, segurança e eficácia de todos esses produtos. Dessa forma, as autoridades regulatórias vêm adotando até o momento uma abordagem caso a caso, até que guias mais específicos sejam publicados.

A fabricação de produtos lipossomais não é trivial, e não pode de forma alguma ser desvinculada do entendimento da complexidade da função de seus componentes, da interação entre eles e da forma com que estes se comportam no organismo.

É importante lembrar que com a evolução das formulações lipossomais, conforme mostrado na **figura 2**, a tendência para um futuro próximo é de que essa categoria de produtos se torne cada vez mais diversa e complexa, possivelmente apresentando novas propriedades que irão requerer testes adicionais mais adequados. Assim é necessário que as autoridades regulatórias acompanhem as novas tecnologias e metodologias de avaliação da qualidade dos produtos lipossomais, a fim de que possam avaliar e intervir de maneira eficaz nos riscos decorrentes da produção de medicamentos lipossomais.

12. CONCLUSÃO

Com relação à qualidade de produtos lipossomais injetáveis, os documentos com finalidade regulatória até então publicados pela FDA e EMA não contemplam todos os itens passíveis de avaliação, além de não abordarem questões relacionadas aos métodos analíticos para avaliação de seus atributos de qualidade. Por se tratar de produtos nanotecnológicos de alta complexidade, faltam ainda guias contendo requisitos específicos e testes farmacopeicos para lipossomos. Considerando as especificidades inerentes à fabricação dos lipossomos e dado o número crescente de formulações que potencialmente podem chegar ao mercado, é urgente o estabelecimento de requisitos que abarquem esses produtos, bem como os já comercializados.

Uma revisão extensa da literatura e entrevistas com especialistas na área, aliadas a uma sistematização do conhecimento na forma de diagramas de causa e efeito (diagramas de Ishikawa) permitiu proporcionar conhecimento para a atuação regulatória e embasar o desenvolvimento de regulamentações ou guias contendo requisitos específicos para produtos lipossomais injetáveis.

Como principais contribuições dessa dissertação, destacamos:

- A identificação de atributos de qualidade de produtos lipossomais injetáveis não abordados nos documentos publicados, bem como itens relevantes de BPF;
- Uma avaliação crítica dos métodos analíticos utilizados na caracterização de alguns dos principais atributos de qualidade dos produtos lipossomais injetáveis;
- A identificação da necessidade de estabelecer requisitos que englobem todas as especificidades de formulações lipossomais injetáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 58, n. 15, p.1688-1713, 2006.

ADLER-MOORE, J.; PROFFITT, R.T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, vol.49, n. 1, p.21-30, 2002.

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI). Cartilha sobre nanotecnologia. Brasília, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - Anvisa (Brasil). Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 nov. 1998, Seção 1, p.18.

_____. Resolução – RDC nº 48, de 6 de outubro de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 out. 2009, Seção 1, p. 60.

_____. Resolução – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 abr. 2010, Seção 1, p. 97.

_____. Portaria nº 1.358, de 20 de agosto de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 ago. 2014a, Seção 1, p. 44.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 out. 2014b, Seção 1, p. 660.

ALEXIOU, C. et al. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, vol.60, n. 23, p.6641-6648, 2000.

ALMGREN, M.; EDWARDS, K. ; KARLSSON, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 174, n. 1, p.3-21, 2000.

ALONSO, J. M. et al. Effect of the osmotic conditions on the value of zeta potential of DMPC multilamellar liposomes. **Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects**, vol. 95, n. 1, p.11-14, 1995.

ANDERSON, W. et al. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 405, p. 322-330, 2013.

ANGELOVA M. I.; TSONEVA, I. Interactions of DNA with giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 101, n. 1, p. 123–137, 1999.

ANGST, M. S.; DROVER, D. R. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoaM (TM) - A sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. **Clinical Pharmacokinetics**, vol. 45, n. 12, p.1153 - 1176, 2006.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, vol. 13, n. 1, p.238-252, 1965.

BANNO, B. et al. The Functional Roles of Poly(Ethylene Glycol)-Lipid and Lysolipid in the Drug Retention and Release from Lysolipid-Containing Thermosensitive Liposomes *In vitro* and *In Vivo*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 99, n. 5, p.2295-2308, 2010.

BARALDO, K. et al. Sphingosine-Based Liposome as DNA Vector for Intramuscular Gene Delivery. **Pharmaceutical Research**, vol. 19, n. 8, 2002.

BARENHOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, vol. 6, n. 1, p.66-77, 2001.

_____. Doxil®-The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, vol.160, n. 2, p.117-134, 2012.

BETAGERI, G.V.; PARSONS, D.L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 81, n. 2-3, p.235-241, 1992.

BHATTACHARYA, S.; MAZUMDER, B. Virosomes: a novel strategy for drug delivery and targeting: virosomes present novel drug-delivery vehicles with distinct advantages over liposomes. **Biopharm International**, vol. 24, n. 1, p. S9, 2011.

BIENVENUE, A. et al. Kinetics of phospholipid transfer between liposomes (neutral or negatively charged) and high-density lipoproteins: a spin-label study of early events. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 835, n. 3, p.557-566, 1985.

BIGBY, M. Newer Antifungal Agents. **Journal of the American Academy of Dermatology**, vol. 49, n. 2, p.357, 2003.

BONTÉ, F.; JULIANO, F. Interactions of liposomes with serum proteins. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 40, n. 2-4, p. 359-372, 1986.

BORMAN, S. Combinatorial chemistry. **Chemical & Engineering News**, vol. 76, n. 14, p. 47-67, 1998.

BOROWIK, T. et al. Combined Effect of Surface Electrostatic Charge and Poly (ethyl glycol) on the Association of Liposomes with Colon Carcinoma Cells. **Journal of Liposome Research**, vol. 15, n. 3-4, p. 199-213, 2005.

BRANDL, M. M. et al. Liposome preparation using high-pressure homogenizers. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome Technology**, vol. I. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. p. 49-65.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. **Diário oficial da União**, Brasília, 27 jan. 1999, Seção 1, p. 21.

BRGLES, M. et al. Liposome fusogenicity and entrapment efficiency of antigen determine the Th1/Th2 bias of antigen-specific immune response. **Vaccine**, vol. 27, n. 40, p.5435-5442, 2009.

BUMILLER, M. Focus on Microscopy & Microtechnology. New ISO Standards for Zeta Potential Analysis. Disponível em: < [http://www.labmate-online.com/ articles/microscopy-](http://www.labmate-online.com/articles/microscopy-)

and-microtechniques/4/mark_bumiller/new_iso_Standards_for_zeta_potential_analysis/1170/>. Acesso em: 04 out. 2014.

BUYENS, K. et al. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: Stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. **Journal of Controlled Release**, vol.158, n. 3, p.362-369, 2012.

CARACCIOLO, G. et al. Effect of membrane charge density on the protein corona of cationic liposomes: Interplay between cationic charge and surface area. **Applied Physics Letters**, vol. 99, n. 3, 2011.

CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 18, n. 1, p. 26-30, 2007.

CEH, B.; LASIC, D. D. A Rigorous Theory of Remote Loading of Drugs into Liposomes: Transmembrane Potential and Induced pH-Gradient Loading and Leakage of Liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 185, n. 1, p. 9-18, 1997.

CEVC, G.; RICHARDSEN, H. Lipid vesicles and membrane fusion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 38, n. 3, p.207-232, 1999.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, vol. 103, n. 13, p.4930-4934, 2006.

CHANAN-KHAN, A. et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): possible role in hypersensitivity reactions. **Annals of Oncology**, vol. 14, n.9, p. 1430-1437, 2003.

CHANG, H.; YEH, M. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, vol.7, p.49-60, 2012.

CHARROIS, G. J. R.; ALLEN, T. M. Rate of biodistribution of STEALTHR liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1609, n. 1, p.102-108, 2003.

_____. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, vol. 1663, n. 1-2, p.167-177, 2004.

CHEN, C. et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, vol. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CHOW, C. Y.; HEATH, T.D. Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acids. **Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes**, vol. 1239, n. 2, p.168-176, 1995.

CHIU, G.N.C.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D. Selective protein interactions with phosphatidylserine containing liposomes alter the steric stabilization properties of poly(ethylene glycol). **BBA - Biomembranes**, vol. 1510, n. 1, p.56-69, 2001.

CLINICALTRIALS.GOV. Phase I and Pharmacokinetic Study of Mitoxantrone Hydrochloride Liposome Injection. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02043756?term=liposome&rank=7>>. Acesso em: 16 mai 2015a.

CLINICALTRIALS.GOV. Intravesical Liposomes for Ulcerative Cystitis. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01083979?term=liposome&rank=20>>. Acesso em: 16 mai 2015b.

CLINICALTRIALS.GOV. Evaluation of Liposomal Curcumin in Healthy Volunteers. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01403545?term=liposome&rank=25>>. Acesso em: 16 mai 2015c.

CROMMELIN, D. J. A.; ZUIDAM, N. J. Hydrolysis of phospholipids in liposomes and stability-indicating analytical techniques. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome Technology: Liposome Preparations and Related Techniques**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007. p. 285-294.

CULLIS, P. R. et al. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes**, vol. 1331, n. 2, p. 187-211, 1997.

DAEMEN, T. et al. Virosomes for antigen and DNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 57, n. 3, p.451-463, 2005.

DAN, N. Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell–liposome electrostatic interactions. **BBA - Biomembranes**, vol. 1564, n. 2, p.343-348, 2002.

DANDAMUDI, S; CAMPBELL, R. Development and characterization of magnetic cationic liposomes for targeting tumor microvasculature. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, vol. 1768, n. 3, p.427-438, 2007.

DANHIER, F.; PRÉAT, V.; FERON, O. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, vol. 148, n. 2, p.135-146, 2010.

DE JONG, W. H., BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International journal of nanomedicine**, vol. 3, n. 2, p.133-49, 2008.

DECUZZI, P et al. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. **Journal of Controlled Release**, vol. 141, n. 3, p.320-327, 2010.

DERYCKE, A.S.L.; WITTE, P. A. M. Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 56, n.1, p. 17-30, 2004.

DRUMMOND, D. C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological Reviews**, vol.51, n. 4, p.691-743, 1999.

_____. Pharmacokinetics and In Vivo Drug Release Rates in Liposomal Nanocarrier Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 97, n. 11, p.4696-4740, 2008.

DU PLESSIS, J. et al. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 127, n. 2, p.273-278, 1996.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, vol.9, n. 9-10, p.1521-1532, 2013.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, vol. 68, n. 5, p.1432-1441, 2006.

ENGEL, A. et al. Freeze drying of liposomes with free and membrane-bound cryoprotectants - the background of protection and damaging processes. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 107, n. 2, p. 99-110, 1994.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. London, 2013.

_____. Innovation Task Force. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/generalcontent000334.jsp>>. Acesso em: 10 jun. 2014a.

_____. First International Workshop on Nanomedicine. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2010/09/WC500096201.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014b.

EVJEN, T. J. et al. Physicochemical Characterization of liposomes after ultrasound exposure Mechanisms of drug release. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 78-9, p.118-122, 2013.

FAIRHURST, D. An Overview of the Zeta Potential - Part 2: Measurement. **American Pharmaceutical Review**, abr. 2013.

FENSKE, D. B.; CULLIS, P. R. Liposomal nanomedicines. **Expert Opinion in Drug Delivery**, vol. 5, n. 1, p. 25-44, 2008.

FENSKE, D. B.; CHONN, A.; CULLIS, P. R. Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field. **Toxicologic Pathology**, vol. 36, n. 1, p.21-29, 2008.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, vol. 5, n. 3, p.161-171, 2005.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, vol. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FOMINA, N.; SANKARANARAYANAN, J.; ALMUTAIRI, A. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 64, n. 11, p.1005-1020, 2012.

FORADADA, M. et al. Chemical degradation of liposomes by serum components detected by NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 104, n. 2, p.133-148, 2000.

FORIER, K. et al. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. **Journal of Controlled Release**, vol. 190, p.607-617, 2014.

FRANZEN, U.; ØSTERGAARD, J. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol.1267, p.32-44, 2012.

FREZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quimica Nova**, vol. 28, n. 3, p.511- 518, 2005.

FRITZE, A. et al. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1758, n. 10, p. 1633-1640, 2006.

FRÖHLICH, M.; BRECHT, V.; PESCHKA-SÜSS, R. Parameters influencing the determination of liposome lamellarity by ³¹P-NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 109, n. 1, p.103-112, 2001.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: Impact on cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.45, n. 4, p.388-398, 2012.

GARBUZENKO, O. et al. Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. **Langmuir**, vol. 21, n. 6, p. 2560-2568, 2005.

GARBUZENKO, O.; BARENHOLZ, Y.; PRIEV, A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. **Chemistry And Physics Of Lipids**, vol. 135, n. 2, p.117-129, 2005.

GARIDEL, P.; LASCH, J. Mixed Vesicles and Mixed Micelles: Formation, Thermodynamic Stability, and Pharmaceutical Aspects. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome preparation and related techniques (vol. I)**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007, p. 209-235.

GOMEZ-HENS, A.; FERNANDEZ-ROMERO, J. M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 25, n. 2, p.167-178, 2006.

GRASSIAN RESEARCH GROUP AT THE UNIVERSITY OF IOWA DEPARTMENT OF CHEMISTRY. Light Scattering Measurements of Particles in Solution. Disponível em: <<http://chem.uiowa.edu/grassian-research-group/light-scattering-measurements-particles-solution>>. Acesso em: 12 set. 2014.

GRAF, R. et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 18, n. 3, p. 301-313, 2000.

GREGORIADIS, G., DAVIS, C. Stability of liposomes *in vivo* and *in vitro* is promoted by their cholesterol content in the presence of blood cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 90, p. 1287–1293, 1979.

GRIT, M. et al. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 50, n. 1, p.1-6, 1989.

GRIT, M.; CROMMELIN, D.J.A. The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. **Chemistry And Physics Of Lipids**, vol. 62, n. 2, p.113-122, 1992.

_____. The effect of surface charge on the hydrolysis kinetics of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, vol.1167, n. 1, p.49-55, 1993.

_____. Chemical stability of liposomes" implications for their physical stability. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 64, n. 1-3, p.3-18, 1993a.

GUBERNATOR, J. et al. The encapsulation of idarubicin within liposomes using the novel EDTA ion gradient method ensures improved drug retention *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, vol. 146, n. 1, p.68-75, 2010.

HACKLEY, V.; CLOGSTON, J. D. NIST - NCL Joint Assay Protocol, PCC-1 Version 1.1. Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using BatchMode Dynamic Light Scattering. **National Institute of Standards and Technology**, p. 3-22, 2010.

HACKLEY, Vincent. **Liposome's Project**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <marcela.castro@Anvisa.gov.br> em 24 jan. 2015.

HARASHIMA, H. et al. Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats. **Pharmaceutical Research**, vol. 13, n. 11, p. 1704-1709, 1996.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, vol.24, n. 23, p.4283-4300, 2003.

HOET, P. et al. Do Nanomedicines Require Novel Safety Assessments to Ensure their Safety for Long-Term Human Use?. **Drug Safety**, vol. 32, n. 8, p.625-636, 2009.

HOOGEVEST, P.; LEIGH, M.; FAHR, A. Liposomes as Intravenous Solubilizers for Poorly Water-soluble Drugs. In: DOUROUMIS, D.;FAHR, A.(Eds.). **Drug delivery strategies for poorly water soluble drugs**.United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.,2013. p. 37-60.

HORIBA SCIENTIFIC. A GUIDEBOOK TO PARTICLE SIZE ANALYSIS. Disponível em: < https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf>. Acesso em: 10 set. 2014.

HOROWITZ, A.T.; BARENHOLZ, Y.; GABIZON, A.A. *In vitro* cytotoxicity of liposome-encapsulated doxorubicin: Dependence on liposome composition and drug release. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1109, n. 2, p.203-209, 1992.

HOSSANN, M. et al. Size of thermosensitive liposomes influences content release.

Journal of Controlled Release, vol. 147, n. 3, p.436-443, 2010.

HUANG, S. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery**

Reviews, vol. 60, n. 10, p.1167-1176, 2008.

HUNT, C. A. Liposomes disposition in vivo V. Liposome stability in plasma and implications for drug carrier function. **BBA - General Subjects**, vol. 719, n. 3, p.450-463, 1982.

HUPFELD, S. et al. Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field- flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol.163, n. 2, p.141-147, 2010.

HUTH, U. S.; SCHUBERT, R.; PESCHKA-SUSS, R. Spectral Imaging for the Investigation of the Intracellular Fate of Liposomes. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome Technology- Entrapment of drugs and other materials into liposomes (vol. II)**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007, p. 341-372.

IMMORDINO, M. L. et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. **Journal of Controlled Release**, vol. 100, n. 3, p.331-346, 2004.

INSTITUTE FOR INNOVATION AND IMPROVEMENT. Cause and effect (fishbone). Disponível em: < http://www.institute.nhs.uk/quality_and_service_improvement_tools/quality_and_service_improvement_tools/cause_and_effect.html>. Acesso em: 15 mai 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE- ICH. **Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances-Q6a**. 1999. 19p.

_____. **Pharmaceutical development- Q8 (R2)**. 2009. 11p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Standards catalogue. ISO 13320:2009. Particle size analysis -- Laser diffraction methods. Disponível em: <

http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=44929 >. Acesso em: 04 out. 2014.

ISHIDA, T. et al. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: Effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. **Journal of Controlled Release**, vol. 105, n. 3, p.305-317, 2005.

IZUTSU, K.I.; YOMOTA, C.; KAWANISHI, T. Stabilization of Liposomes in Frozen Solutions Through Control of Osmotic Flow and Internal Solution Freezing by Trehalose. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, vol. 100, n. 7, p.2935-2944, 2011.

JENSEN, G. M. et al. Process Development and Quality Control of Injectable Liposomal Therapeutics. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome Technology- Liposome preparation and related techniques (vol. I)**. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007, p. 297-309.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, vol.1, n.1, p.801-832, 2008.

JOHNSTON, M. J. W. et al. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1758, p. 55-64, 2006.

JONES, M. N. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 54, p. 93-128, 1995.

JONGE, J. et al. Inulin sugar glasses preserve the structural integrity and biological activity of influenza virosomes during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 32, n. 1, p. 33-44, 2007.

JULIANO, R. L.; STAMP, D. Interactions of drugs with lipid membranes. Characteristics of liposomes containing polar or non-polar antitumor drugs. **BBA - General Subjects**, vol. 586, n. 1, p.137-145, 1979.

KAMPS, J. A. A. M.; SCHERPHOF, G. L. Liposomes in Biological systems. In: TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. (Eds.). **Liposomes, a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2003. p. 267-288.

KARANTH, H.; MURTHY, R. S. R. pH-sensitive liposomes: principle and application in cancer therapy. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, vol. 59, n. 4, p.469-483, 2007.

KAZI, K. M. et al. Niosome: A future of targeted drug delivery systems. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, vol. 1, n. 4, 374-380, 2010.

KELLY, R. N.; ETZLER, F. M. What is wrong with laser diffraction? A Critical Review of Current Laser Diffraction Methods for Particle Size Analysis. Disponível em: <http://www.donner-tech.com/whats_wrong_with_ld.pdf>. Acesso em: 14 set. 2014.

KIM, R. J. et al. Skin toxicity associated with pegylated liposomal doxorubicin (40 mg/m²) in the treatment of gynecologic cancers. **Gynecologic oncology**, vol. 97, n. 2, p.374-378, 2005.

KIRBY, C.; CLARKE, J.; GREGORIADIS, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical Journal**, vol. 186, n. 2, p.591-598, 1980.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Nature Biotechnology**, vol. 2, p. 979-984, 1984.

KNEIDL, B. et al. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 9, p.4387-4398, 2014.

KOUDELKA, S. et al. Lyophilised Liposome-Based Formulations of alpha-Tocopheryl Succinate: Preparation and Physico-Chemical Characterisation. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 99, n. 5, p.2434-43, 2010.

KOMATSU, H.; OKADA, S. Ethanol-induced aggregation and fusion of small phosphatidylcholine liposome: participation of interdigitated membrane formation in their processes. **BBA - Biomembranes**, vol. 1235, n. 2, p. 270-280, 1995.

KUNISAWA, J.; NAKAGAWA, S.; MAYUMI, T. Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes: application to vaccine development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 52, n. 3, p. 177-186, 2001.

KWON, I. K. et al. Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. **Journal of Controlled Release**, vol. 164, n. 2, p.108-114, 2012.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, vol. 46, n. 5, p.244-282, 2007.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v.16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LASIC, D.D.; PAPAHDJOPOULOS, D. Liposomes in medicine. In: _____. **Medical applications of liposomes**. The Netherlands: Elsevier Science B. V Elsevier Science B. V, 1998. p.1-8.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, vol. 125, p. 75-84, 2015.

LETTIERO, B. et al. Complement system and the brain: Selected pathologies and avenues toward engineering of neurological nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, vol. 161, n. 2, p. 283-289, 2012.

LEVCHENKO, T.S. et al. Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 240, n. 1-2, p. 95-102, 2002.

LI, W. Lipid formulation: successful stories and prospective future. **Trends In Bio/Pharmaceutical Industry**, p. 31-35, 2006.

LI, S.D. ; HUANG, L. Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. **Journal of Controlled Release**, vol. 145, n. 3, p.178-181, 2010.

LIAN, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 90, n. 6, p.667-680, 2001.

LÖVESTAM, G. et al. Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes. **Joint Research Center (JRC) Reference Reports of the European Commission**, p. 5-36, 2010.

MAHERANI, B. et al. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine. **Food Chemistry**, vol.134, n. 2, p.632-640, 2012.

MAKINO, K.; SHIBATA, A. Surface properties of liposomes depending on their composition. In: LIU, A. L. (Ed.). **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, vol. 4. London: Academic Press, 2006. p.49-74.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zeta Potential. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/>>. Acesso em: 11 set. 2014a.

_____. A Basic Guide to Particle Characterization. Disponível em:<[http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization\(2\)_1962085150.pdf](http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization(2)_1962085150.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2014b.

_____. Introdução e aplicação do potencial zeta. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/support/events-and-training/webinars/W100830-Introduction-to-Zeta-Potential.aspx>>. Acesso em: 11 set. 2014c

_____. Technical Note: Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Disponível em: <<http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/dls.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2014d.

_____. Materials Talks.FAQ: How important are refractive index & absorption for nanoparticles? Disponível em: < <http://www.materials-talks.com/blog/2014/08/05/faq-how-important-are-refractive-index-absorption-for-nanoparticles/>>. Acesso em: 15 set. 2014e.

_____. Application note: The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes. Disponível em: < <http://www.atomikateknik.com/pdf/The%20use%20of%20zeta%20potential%20measurements%20to%20study%20sterically%20stabilized%20liposomes%20-%20ZS3000HS.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2014f.

_____. Zetasizer nano series. Disponível em: < file: ///C:/Documents%20and%20 Settings / User/Meus%20documentos/Downloads/Cat%C3%A1logo%20Zetasizer%20Nano%20%20M alvern.pdf>. Acesso em 10 abr. 2015a.

_____. Whitepaper - Dynamic light scattering - common terms defined. Disponível em: < http://www.malvern.com/en/pdf/ secure/WP111214DLSTermsDefined.pdf>. Acesso em 10 abr. 2015b.

MANGILI, G. et al. Prevention strategies in palmar–plantar erythrodysesthesia onset: The role of regional cooling. **Gynecologic Oncology**, vol. 108, n. 2, p.332-335, 2008.

MARSDEN, HR ; TOMATSU, I ; KROS, A. Model systems for membrane fusion. **Chemical Society Reviews**, vol. 40, n. 3, p.1572-1585, 2011.

MARTENS, S.; MCMAHON, H.T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 9, n. 7, p.543-556, 2008.

MAYER, L. et al. Influence of Vesicle Size, Lipid Composition, and Drug-to-Lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. **Cancer Research**, vol. 49, n. 21, p.5922-5930, 1989.

MAZAK, K.; KOKOSI, J.; NOSZAL, B. Lipophilicity of zwitterions and related species: A new insight. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 44, n. 1-2, p.68-73, 2011.

MAZAK, K.; NOSZAL, B. Zwitterions Can Be Predominant in Membrane Penetration of Drugs: Experimental Proof. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 55, n. 15, p.6942-6947, 2012.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H. P.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, vol.3, n. 2, p. 169-180, 2008.

MEERS, P. Enzyme-activated targeting of liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 53, n. 3, p.265-272, 2001.

MEHTA, J. Do variations in molecular structure affect the clinical efficacy and safety of lipid-based amphotericin B preparations? **Leukemia Research**, vol. 21, n. 3, p.183-188, 1997.

MEULENAER, B.; VAN DER MEEREN, P.; VANDERDEELEN, J. Electrophoresis of liposomes. In: SOMASUNDARAN, P. (Ed.). **Encyclopedia of surface and colloid science**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. p. 2372-2384.

MIRJANIAN, D. et al. Splaying of Aliphatic Tails Plays a Central Role in Barrier Crossing During Liposome Fusion. **Journal of Physical Chemistry B**, vol. 114, n. 34, p.11061-11068, 2010.

MOGHIMI, S. M.; HAMAD, I. Liposome-mediated triggering of complement cascade. **Journal of Liposome Research**, vol. 18, n. 3, p. 195-209, 2008.

MOGHIMI, S. M. et al. Material properties in complement activation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 63, n. 12, p. 1000-1007, 2011.

MOGHIMI, S.M.; PATEL, H. M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system – The concept of tissue specificity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 32, n. 1-2, p. 45–60, 1998.

MOOG, R. et al. Effect of nucleoside analogues and oligonucleotides on hydrolysis of liposomal phospholipids. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 206, n. 1-2, p.43-53, 2000.

MORTON, L. A.; SALUDES, J. P.; YIN, H. Constant pressure-controlled extrusion method for the preparation of Nano-sized lipid vesicles. **Journal of visualized experiments : JoVE**, vol. 64, n. 4151, 2012.

MOSER, C. et al. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. **Expert Review of Vaccines**, vol. 12, n. 7, p. 779, 2013.

MURO, S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, vol. 164, n. 2, p.125-137, 2012.

MYHRA, S.; RIVIERE, J. C. Techniques and methods for nanoscale analysis of single particles and ensembles of particles. In:____. **Characterization of nanostructures**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2013. p. 135-166.

NACKA, F. et al. Physical and chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 20, n. 3, p.257-266, 2001.

NAKAMURA, K. et al. Designing a novel in vitro drug-release-testing method for liposomes prepared by pH-gradient method. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 430, n. 1-2, p. 381-387, 2012.

NANOSIGHT. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Disponível em: <<http://www.nanosight.com/technology/nanoparticle-tracking-analysis-nta>>. Acesso em: 15 set. 2014.

NAPOTNIK, T. B. et al. Cytotoxicity and uptake of archaeosomes prepared from Aeropyrum pernix lipids. **Human & Experimental Toxicology**, vol. 32, n. 9, p. 950-959, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). Standard reference materials. Certificate SRM 1980 – Positive electrophoretic mobility. Disponível em: <https://www-s.nist.gov/srmors/view_cert.cfm?srm=1980>. Acesso em: 04 out. 2014a.

_____. Standard reference materials. Certificate SRM 1963a - Nominal 100 nm Diameter Polystyrene Spheres. Disponível em: < https://www-s.nist.gov/srmors/view_cert.cfm?srm=1963a>. Acesso em: 04 out. 2014b.

_____. Standard reference materials. Certificate SRM 1964 - Nominal 60 nm Diameter Polystyrene Spheres. Disponível em: < https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=1964>. Acesso em: 04 out. 2014c.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U.S. National Library of Medicine. Label: Visudyne-verteporfin injection, powder, lyophilized, for solution. Atualizado em 02/14. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=952f4c80-50b1-4308-9ee6-311ffefb13df>>. Acesso em: 16 mai. 2014a.

_____. Label: Abelcet- Amphotericin b, dimyristoylphosphatidyl choline, dl- and dimyristoylphosphatidylglycerol, dl- injection. Atualizado em 12/13. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=5587db37-f21a-4a39-a319-e1077032ced9>>. Acesso em: 16 mai. 2014b.

_____. Label: Doxil- doxorubicin hydrochloride injection, suspension, liposomal. Atualizado em 05/14. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=21d9c619-7e94-49e2-ac41-31e9ea96554a>> Acesso em: 01 jun. 2014c.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. What's so special about nanoscale? Disponível em: <http://www.nano.gov/nanotech-101/special>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

NEW, R. R. C. Influence of liposome characteristics on their properties and fate. In: PHILIPPOT, J. R.; SCHUBER, F. (Eds.). **Liposomes as tools in basic research and industry**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1995, p. 3-20.

NGUYEN, T. T. T. N. et al. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS. **International Journal Of Pharmaceutics**, vol. 449, n. 1-2, p.95-102, 2013.

NISHIYA, T.; LAM, R. T. Interaction of stearylamine-liposomes with erythrocyte ghosts: analysis of membrane lipid mixing and aqueous contents mixing, and the effect of carboxymethyl chitin on the interaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 4, n. 1, p. 55-63, 1995.

NOBUTO, H. et al. Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. **International Journal of Cancer**, vol. 109, n. 4, p.627-635, 2004.

O'BRIEN, M. et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Annals of Oncology**, vol. 15, n. 3, p.440-449, 2004.

OPANASOPIT, P; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Factors affecting drug and gene delivery: Effects of interaction with blood components. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Vol.19, n. 3, p.191-233, 2002.

OWEN, R. L.; STRASTERS, J. K.; BREYER, E.D. Lipid vesicles in capillary electrophoretic techniques: Characterization of structural properties and associated membrane-molecule interactions. **Electrophoresis**, vol. 26, n. 4-5, p.735-751, 2005.

PAPAHADJOPOULOS, D. et al. Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 311, n. 3, p. 330–348, 1973.

PARNHAM, M. J.; WETZIG, H. Toxicity screening of liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 64, n. 1-3, p.263-274, 1993.

PARR, M. J. et al. Factors influencing the retention and chemical stability of poly (ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1195, n. 1, p. 21-30, 1994.

PARTICLE TECHNOLOGY LABS. Problems in particle size: laser diffraction observations. Disponível em: < file:///C:/Documents%20and%20Settings/User/Meus%20documentos/Downloads/problems_in_particle_size%20(3).pdf> Acesso em: 14 set. 2014.

_____. The language of particle size. Disponível em: <file:///C:/ Documents % 20 and % 20 Settings/User/Meus%20documentos/Downloads/the%20language%20of%20particle%20size%20(2).pdf>. Acesso em: 10 abr. 2015.

PETRAK, K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. **Drug Discovery Today**, vol.10, n. 23-24, p.1667-1673, 2005.

PINHEIRO, M. et al. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. **Nanomedicine**, vol. 6, n. 8, p.1413-1416, 2011.

PINZON-DAZA, M. et al. Nanoparticle- and Liposome-carried Drugs: New Strategies for Active Targeting and Drug Delivery Across Blood-brain Barrier. **Current Drug Metabolism**, vol. 14, n. 6, p.625-640, 2013.

POOLE JR., C.P.; OWENS, F. J. Biological materials: Biological nanostructures. In:____ **Introduction to Nanotechnology**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003. p. 324-329.

PORNATTANANANGKUL, D. et al. Stimuli-Responsive Liposome Fusion Mediated by Gold Nanoparticles. **Acs Nano**, vol. 4, n. 4, p.1935-1942, 2010.

POZZI, D. et al. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio–nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. **Nanoscale**, vol.6, n. 5, p.2782-2792, 2014.

PRESANT, C. A. et al. Design of liposome clinical trials. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome Technology**, vol. II. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. p. 307-317.

PURI, A. et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, vol.26, n. 6, p.523-580, 2009.

QIAN, S.; LI, C.; ZUO, Z. Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded liposomes. **Current Drug Metabolism**, vol.13, n. 4, p.372-395, 2012.

QIN, G. et al. Partially polymerized liposomes: stable against leakage yet capable of instantaneous release for remote controlled drug delivery. **Nanotechnology**, vol.22, n. 15, 2011.

RANGELOV, S.; MOMEKOVA, D.; ALMGREN, M. Structural characterization of lipid- based colloidal dispersions using cryogenic transmission electron microscopy. In: Méndez-Vilas, A; Díaz, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajoz: FORMATEX, 2010. p.1724-1734.

RICA, R.; AILI, D.; STEVENS, M. M. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 64, n. 11, p. 967-978, 2012.

RISBO, J. et al. Phase behavior and permeability properties of phospholipid bilayers containing a short-chain phospholipid permeability enhancer. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, vol. 1329, n. 1, p.85-96, 1997.

RUENRAROENGSAK, P. et al. **Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities**. **Journal of Controlled Release**, vol.141, n. 3, p.265-276, 2010.

RUOZI, B. et al. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 25, n. 1, p.81-89, 2005.

SABÍN, J. et al. On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the colloidal stability of liposomes. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, vol. 21, n. 24, p.10968-75, 2005.

SADZUKA, Y. et al. Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 238, n.1-2, p. 171–180, 2002.

SAETERN, A. M. et al. Camptothecin-catalyzed phospholipid hydrolysis in liposomes. **International Journal Of Pharmaceutics**, vol. 288, n. 1, p.73-80, 2005.

SAKAI-KATO, K. et al. Size separation and size determination of liposomes. **Journal of Separation Science**, vol. 34, n. 20, p. 2861–2865, 2011.

SANDSTROM, M. C.; JOHANSSON, E.; EDWARDS, K. Structure of mixed micelles formed in peg-lipid/lipid dispersions. **Langmuir**, vol. 23, n. 8, p. 4192-4198, 2007.

SCHROEDER, A. et al. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 162, n. 1-2, p.1-16, 2009.

SCHWENDENER, R. S. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, vol. 2, n. 6, p. 159-182, 2014.

SENIOR, J.; GREGORIADIS, G. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: The effect of the phospholipid and cholesterol components. **Life Sciences**, vol.30, n. 24, p.2123-2136, 1982.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.154, n. 2, p.123-140, 1997.

SHUM, P.; KIM, J.; THOMPSON, D. H. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Review**, vol. 53, p. 273-284, 2001.

SLINGERLAND, M. et al. Bioequivalence of Liposome-Entrapped Paclitaxel Easy-To- Use (LEP-ETU) Formulation and Paclitaxel in Polyethoxylated Castor Oil: A Randomized, Two-Period Crossover Study in Patients With Advanced Cancer. **Clinical Therapeutics**, vol.35, n. 12, p.1946-1954, 2013.

SRIWONGSITANONT, S.; UENO, M. Physicochemical Properties of PEG-Grafted Liposomes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 50, n. 9, p. 1238-1244, 2002.

STARK, B.; PABST, G.; PRASSL, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 41, n. 3-4, p. 546–555, 2010.

STERNBERG, B. et al. Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity *in vivo*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, vol. 1375, n. 1-2, p.23-35, 1998.

SU, W. et al. PEG/RGD-modified magnetic polymeric liposomes for controlled drug release and tumor cell targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 426, n. 1-2, p.170-181, 2012.

SUZUKI, R. et al. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin– PEG-liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 346, n. 1-2, p. 143–150, 2008.

SWAROOP KUMAR, K. S. L. V. V. S. N. Stability of liposomes. **PHARMANEST : An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, vol. 2, n. 4, p. 301-307, 2011.

SZEBENI, J. et al. Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic peg liposomes:experimental and clinical studies. **Journal of Liposome Research**, vol. 12, n. 1-2, p. 165-172, 2002.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity. **Toxicology**, vol. 216, n.2-3, p. 106-121, 2005.

SZEBENI, J. et al. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, vol.8, n. 2, p.176-184, 2012.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. Nanoparticulate drug delivery systems: an overview. In: **Nanoparticulate drug delivery systems**. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 1-32.

TAYLOR, K.M.G. et al. Drug entrapment and release from multilamellar and reverse- phase evaporation liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 58, n. 1, p.49-55, 1990.

TOLENTINO, L.F. et al. Fatal fat embolism following amphotericin B lipid complex injection. **Experimental and Molecular Pathology**, vol. 77, n.3, p.246-248, 2004.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Science**, vol. 11, n. 2, p. S81-S91, 2000.

_____. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews: Drug Discovery**, vol. 4, n. 2, p.145-160, 2005.

TSUKAGOSHI, K.; OKUMURA, Y.; NAKAJIMA, R. Migration behavior of dyestuff- containing liposomes in capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, vol. 813, n. 2, p.402-407, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP 38-NF 33). Vol 2. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention; 2014:1553-1554.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation** (Draft Guidance). Rockville, 2002.

_____. **Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance**. Rockville, 2004a.

_____. Pharmaceutical CGMPs for the 21st century - A risk-based approach. Final Report. Rockville, 2004b.

_____. Nanotechnology Task Force Disponível em: <[http://www.fda.gov/ Science Research/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm2006658.htm](http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm2006658.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2014a.

_____. Draft Guidance on Amphotericin B. Disponível em: <[http://www.fda.gov/ downloads /Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM384094.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM384094.pdf)>. Acesso em: 13 jun. 2014b.

_____. Draft Guidance on Daunorubicin Citrate. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM406256.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2014c.

_____. Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM199635.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2014d

_____. Draft Guidance on Verteporfin. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM384173.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2014e.

VAN BALEN, G. P. et al. Liposome/Water Lipophilicity: Methods, Information Content, and Pharmaceutical Applications. **Medicinal Research Reviews**, vol. 24, n. 3, p.299-324, 2004.

VAN DER MEEL, R. et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. **Journal of Controlled Release**, vol. 195, p.72-85, 2014.

VAN WINDEN, E. C. A.; CROMMELIN, D. J. A. Long-term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 43, n. 3, p.295-307, 1997.

VICOONE, J.; PESSIN, J. E. SNARE-mediated fusion of liposomes. In: VANCURA, A. (Ed.). **Membrane Trafficking**. Totowa: Humana Press, 2008. p. 241-251.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. **Journal of Drug Delivery**, vol. 2011, 9p., 2011.

WANG, J. et al. Photo-Sensitive Liposomes: Chemistry and Application in Drug Delivery. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, vol. 10, n. 2, p. 172-181, 2010.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: acritical review. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 58, n. 1, p. 1-12, 1990.

WASHINGTON UNIVERSITY IN ST. LOUIS- School of Engineering&Applied Science. Dynamic Light Scattering (DLS). Disponível em: <<http://www.nano.wustl.edu/doc/Instrument%20Manuals%20and%20Protocols/DLS%20Final.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2014.

WOJEWODZKA, J.; PAZDZIOR, G.; LANGNER, M. Method to evaluate the effect of liposome lipid composition on its interaction with the erythrocyte plasma membrane. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 135, p.181-187, 2005.

WOODLE, M. C. LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. **BBA - Reviews on Biomembranes**, vol. 1113, n. 2, p.171-199, 1992.

WU, J.; ZHAO, X.; LEE, R. J. Lipid-based nanoparticulate drug delivery systems. In: THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y.(Eds.). **Nanoparticulate drug delivery systems**. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 89-98.

XIA, Y.Q.; SUN, J. B.; LIANG, DH. Aggregation, Fusion, and Leakage of Liposomes Induced by Peptides. **Langmuir**, vol. 30, n. 25, p.7334-7342, 2014.

XU, X.; BURGESS, D. J.; KHAN, M. A. A two-stage reverse dialysis *in vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 426, n. 1-2, p.211-218, 2012.

_____. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 423, n. 2, p.543-553, 2012a.

YADAV A. V. et al. Stability Aspects of Liposomes. **Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education**, vol. 45, n. 4, p. 402-413, 2011.

YAMAUCHI, M. et al. Release of Drugs from Liposomes Varies with Particle Size. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 30, n. 5, p.963-966, 2007.

YANG, L.; ALEXANDRIDIS, P. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, vol. 5, n. 1-2, p.132-143, 2000.

YANG, Q. et al. Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 11, n. 4, p. 1250-1258, 2014.

YAROSLAVOV, A. A. et al. Liposome Fusion Rates Depend upon the Conformation of Polycation Catalysts. **Journal of The American Chemical Society**, vol. 133, n. 9, p.2881-2883, 2011.

ZASADZINSKI, J. A. Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, vol.16, n. 3, p.203-214, 2011.

ZHANG, J. A. A; PAWELCHAK, J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions Part 1: Lipid hydrolysis. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, vol. 50, n. 3, p.357-364, 2000.

ZHANG, J. A. et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 270, n. 1-2, p.93-107, 2004.

ZHENG, X. et al. Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 366, n. 1-2, p.211-217, 2009.

ZHIGALTSEVA, I. V. et al. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: A comparative study of drug loading and retention. **Journal of Controlled Release**, vol. 104, n. 1, p. 103-111, 2005.

ZUCKER, D. et al. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, vol. 139, n. 1, p.73-80, 2009.

ZUIDAM, N. J.; CROMMELIN, D. J. A. Chemical hydrolysis of phospholipids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 84, n. 9, p. 1113–1119, 1995.

ZUIDAM, N. J. et al. Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis - the role of lysophospholipids and fatty-acids. **Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes**, vol. 1240, n. 1, p.101-110, 1995.

ZUIDAM, N. J. et al. Lamellarity of cationic liposomes and mode of preparation of lipoplexes affect transfection efficiency. **Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes**, vol. 1419, n. 2, p.207-220, 1999.

ZUIDAM, N. J. et al. Stability, storage and sterilization of liposomes. In: TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. (Eds.). **Liposomes, a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2003. p.149-164.

ZUIDAM, N. J.; DE VRUEH, R.; CROMMELIN, D. J. A. Characterization of liposomes. In: TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. (Eds.). **Liposomes, a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2003. p.31-77

ANEXOS

ANEXO 1

Perguntas enviadas aos especialistas na área de lipossomos para avaliação e contribuição relacionadas aos diagramas de eficácia e toxicidade:

Com relação aos diagramas de eficácia e toxicidade, e considerando apenas formulações lipossomais injetáveis:

1) Você concorda que todos os itens descritos em ambos os diagramas contribuem respectivamente para a eficácia e toxicidade de um produto lipossomal injetável? Em caso negativo, por favor justifique.

2) Você concorda que cada “causa” está corretamente relacionada ao respectivo “efeito”? Se não, por favor justifique. (ex.: no diagrama de eficácia: “tamanho da partícula” é uma das “causas” para “eficiência de direcionamento”, que por sua vez é uma das “causas” para “biodistribuição adequada dos lipossomos”, que por sua vez é uma das causas para “concentração e tempo de permanência adequados do fármaco no local alvo”).

3) Considerando apenas as “causas raiz” e excluindo aquelas relacionadas ao processo produtivo, armazenamento e estabilidade, você acha que todos os demais devem ser avaliados em cada lote comercial? Se não, por favor justifique.

4) Você adicionaria alguma outra “causa” aos diagramas?

ANEXO 2

Perguntas enviadas aos especialistas na área de lipossomos para avaliação e contribuição relacionadas ao diagrama de estabilidade:

Com relação ao diagrama de estabilidade, e considerando apenas formulações lipossomais injetáveis:

- 1) Baseado na sua experiência, considerando formulações lipossomais aquosas, você concorda que todas as causas de problemas de estabilidade descritas no diagrama podem potencialmente ocorrer durante o período de armazenamento do produto final? Se não, por favor justifique.
- 2) Além do período de armazenamento do produto final, você acha que os problemas descritos no diagrama (hidrólise, oxidação, agregação, fusão, liberação precoce do fármaco) podem potencialmente ocorrer durante as etapas produtivas, durante o armazenamento intermediário do produto (entre etapas produtivas) ou durante o período pós-reconstituição do produto (no caso de formulações liofilizadas)?
- 3) Para formulações aquosas lipossomais, você considera que há outras causas não descritas no diagrama? Se sim, quais?
- 4) Você considera que os problemas descritos no diagrama (hidrólise, oxidação, agregação, fusão, liberação precoce do fármaco) e as respectivas causas também são aplicáveis para formulações liofilizadas? Se sim, quais?
- 5) Com relação às formulações liofilizadas (lipossomos com ou sem o fármaco encapsulado), você considera que há outras causas não descritas no diagrama? Se sim, quais?