

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO PILOTO E
DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA DE LIOFILIZAÇÃO DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA
CONTENDO CISPLATINA**

Belo Horizonte - MG
2013

CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO PILOTO E
DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA DE LIOFILIZAÇÃO DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA
CONTENDO CISPLATINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte - MG
2013

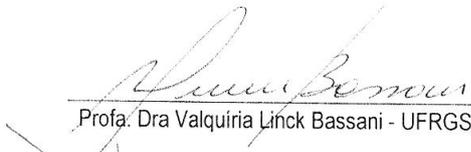
FOLHA DE APROVAÇÃO

CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI

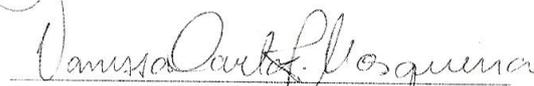
"OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO PILOTO E DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA DE LIOFILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PH-SENSÍVEIS E DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO CISPLATINA"

Tese, como requisito parcial para obter o título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e cinco de janeiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:



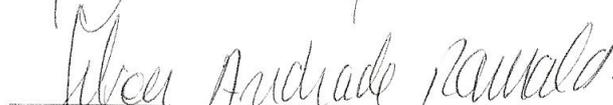
 Profa. Dra Valquíria Linck Bassani - UFRGS



 Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira - UFOP



 Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart - UFMG



 Prof. Dr. Gilson Andrade Ramaldes - UFMG



 Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - UFMG

COLABORADORES

- Profa. Dra. Josianne Nicácio da Silveira – Laboratório de Toxicologia Ocupacional – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG;
- Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo – Laboratório de Física Industrial – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP;
- Dra. Camila Figueiredo Borgognoni - Laboratório de Física Industrial – Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP;

*Dedico esta tese à minha mãe,
meu maior exemplo de perseverança.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proteger e dar serenidade, discernimento e paciência.

A minha família por todo o apoio e compreensão, por ser meu porto seguro.

À profa. Mônica pelas oportunidades, acolhida e orientação ao longo deste trabalho.

À Fernanda Boratto, aluna de iniciação científica, que me auxiliou nos experimentos. Agradeço pela sua doçura, companheirismo, dedicação e por sua contribuição imprescindível na realização deste trabalho.

Aos meus anfitriões Cláudio e Elaine, pela acolhida em São Paulo, pela companhia e por todo o desprendimento. Ao prof. Ronaldo Pitombo pela gentileza em disponibilizar o Laboratório de Física Industrial da USP para o desenvolvimento do estudo de liofilização.

À Dra. Camila Borgognoni por ter me auxiliado nos experimentos na USP, pela acolhida em São Paulo, pelo carinho e amizade.

À profa. Josianne Nicácio, sou grata especialmente pela solicitude na realização das análises de platina. Aos professores Lucas e Frézard, que participaram de praticamente todas as bancas examinadoras ao longo deste trabalho de doutorado. Muito obrigada pela contribuição científica. Aos professores Gilson, Vildete e Celeyda, agradeço pelos ensinamentos e pelo apoio.

À Patrícia Del Puppo e ao Paulo Cilas, professores voluntários da UFES, que deram suporte ao meu trabalho externo.

Aos amigos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES pela convivência e anuência na realização deste trabalho.

À Laís Palestino, por ter me escutado e me aconselhado.

À Paola, Danielle, Janaína, Germano, Grazielle, Daiana e Jonas pela amizade e convivência na minha dupla residência.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG, principalmente àqueles que trabalharam no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, de 2008 a 2012, pela amizade e convivência. Agradeço especialmente ao Álvaro, André, Délia, Diêgo, Eduardo, Elaine, Elton, Flaviana, Gisele, Guilherme, Juliana, Luciene, Marta, Sávvia e Samuel, por me confortar, escutar, aconselhar e incentivar ao longo deste trabalho.

À CAPES, FAPEMIG, FINEP e CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta realização.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José Alencar)

RESUMO

A encapsulação de cisplatina em lipossomas é uma estratégia para reduzir os efeitos adversos tóxicos e aumentar a biodisponibilidade deste fármaco antitumoral na região acometida pelo tumor. Para avaliação pré-clínica e clínica devem ser produzidos lipossomas com elevada eficiência de encapsulação, distribuição de diâmetro homogênea e uma boa estabilidade de armazenamento. Como a maioria das dispersões aquosas lipossomais são instáveis, é muito utilizada a liofilização na presença de crioprotetores para a obtenção de um produto comercial. O programa de liofilização deve ser desenvolvido de maneira racional baseado nas temperaturas críticas da formulação, e na estabilidade dos excipientes e do fármaco para que haja reprodutibilidade entre os lotes na produção em larga escala dos lipossomas. Este trabalho tem como objetivo avaliar os parâmetros do processo para a otimização da produção piloto e desenvolver um programa de liofilização de uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP). O método REV, com éter etílico como solvente orgânico, seguido de homogeneização sob alta pressão a 500 bar por 6 ciclos e a ultrafiltração, como método de purificação; e a concentração inicial de 0,5 mg/mL de CDDP foram os parâmetros escolhidos para a produção de SpHL-CDDP em escala piloto. Foram obtidos SpHL-CDDP com teor de encapsulação de 30,2 %, diâmetro médio de 94,6 nm, monodispersos e potencial zeta de 3,1 mV. A liofilização de SpHL-CDDP utilizando trealose na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p, feita após congelamento lento na razão de 1°C/min, foi realizada nas condições seguintes: secagem primária a -35°C e 100 mTorr, secagem secundária a +25°C e 100 mTorr e teve a duração de aproximadamente 27 horas, formando pastilhas brancas elegantes com teor de umidade residual de 2,81 %. Após a reidratação de SpHL-CDDP liofilizados, houve retenção de 87,5 % da cisplatina encapsulada e formação de vesículas de diâmetro médio de 302,2 nm, heterodispersas e potencial zeta de 4,4 mV.

Palavras-chave: cisplatina, lipossomas, produção piloto, liofilização, crioproteção

ABSTRACT

The CDDP entrapment into liposomes is an alternative to circumvent severe side effects and increase antitumor drug bioavailability in the tumor. For pre-clinical and clinical studies, the large scale production of liposomes with high encapsulation efficiency, homogeneous size distribution and a good storage stability is required. Since aqueous liposome dispersions are unstable, freeze-drying in the presence of cryoprotectants is widely used to obtain a commercial product. In order to design an optimum freeze-drying process, it must be developed at a rational manner. The critical temperatures of the formulation, the stability of the drug and the properties of the excipients must be investigated so that there is reproducibility between lots in large-scale production of liposomes. The aim of this work was to evaluate the process parameters for the optimization of pilot production and to develop a freeze-drying process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin (SpHL-CDDP). The REV method, using ethyl ether as organic solvent, followed by homogenization at 500 bar for 6 cycles and ultrafiltration as purification method, and the CDDP initial concentration of 0.5 mg/mL were the parameters chosen for the production of SpHL-CDDP in pilot scale. SpHL-CDDP presented a mean diameter of 94.6 nm, monodisperse size distribution, zeta potential of 3.1 mV and an encapsulation percentage of 30.2 %. The lyophilization of SpHL-CDDP, containing trehalose at the sugar:phospholipid (w/w) ratio of 2:1, was performed by slow freezing, primary drying at -35°C and 100 mTorr, secondary drying at 25°C and 100 mTorr. It lasted approximately 27 hours and produced a white and elegant cake which showed a residual moisture of 2.81 %. After reconstitution of freeze-dried SpHL-CDDP, the liposomes were able to retain 87.5 % of CDDP and resulted in vesicles of mean diameter of 302.2 nm, zeta potential of 4.4 mV and heterodisperse size distribution.

Keywords: cisplatin, liposomes, pilot production, freeze-drying, cryoprotection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da cisplatina.....	27
Figura 2 - Representação esquemática do lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa (2) envolvida por uma bicamada lipídica (1). A bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos fosfolípides. O nº3 representa o meio aquoso externo e nº 4, a superfície de ligação de modificadores estruturais.....	34
Figura 3 - Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas.....	35
Figura 4 - Representação esquemática dos lipossomas de circulação prolongada.....	36
Figura 5 - Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-mPEG ₂₀₀₀ (C).....	36
Figura 6 - Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.....	37
Figura 7 - Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado.....	41
Figura 8 - Exemplos de técnicas de microscopia que podem ser empregadas na análise morfológica de lipossomas de diferentes diâmetros.....	42
Figura 9 - Reação de oxidação da molécula de DOPE.....	45
Figura 10 - Estrutura química do lisofosfolípide 1-oleil 2-hidroxi glicero-3-fosfoetanolamina.....	46
Figura 11 - CDDP e seus produtos de hidrólise.....	47
Figura 12 - Estresses envolvidos no processo de liofilização.....	55
Figura 13 - Representação esquemática da estabilização de lipossomas durante a desidratação e reidratação, mostrando o espaçamento reduzido entre as porções polares dos lípides durante a desidratação e fusão, agregação e perda do fármaco encapsulado durante a reidratação.....	56
Figura 14 - Representação esquemática das teorias sobre o mecanismo de estabilização durante a desidratação e reidratação. A: Teoria de substituição da água. B: Teoria da vitrificação. Glicose é mostrada como exemplo do agente estabilizante.....	58
Figura 15 - Representação das etapas do método de evaporação em fase reversa.....	61
Figura 16 - Fluxograma da produção de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada.....	76
Figura 17 - Ilustração do homogeneizador de alta pressão de estágio único.....	78
Figura 18 - Ilustração do cassete de ultrafiltração Millipore Pellicon [®] XL 50 acoplado ao sistema de filtração de fluxo tangencial Labscale [®]	78
Figura 19 - Fluxograma das variáveis testadas na produção de SpHL-CDDP pelo método REV em pequena escala.....	80

Figura 20 - Representação esquemática do método de desidratação-reidratação de vesículas da preparação de SpHL-CDDP.....	83
Figura 21 - Curva de calibração para o doseamento da CDDP pelo método de CLAE....	89
Figura 22 - Curva de calibração para doseamento da platina pelo método de GF-AAS..	90
Figura 23 - Microscópio óptico acoplado ao liofilizador (A). Detalhe da objetiva do microscópio óptico e da câmara de liofilização (B).....	108
Figura 24 - Liofilizador microprocessado FTS <i>Systems</i>	109
Figura 25 - Fotografia ilustrativa do termopar inserido no produto.....	110
Figura 26 - Efeito do congelamento lento e dos diferentes crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão após o ciclo de congelamento/descongelamento.....	117
Figura 27 - Fotomicrografias de SpHL antes e após o ciclo de congelamento/descongelamento obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. SpHL sem crioprotetores antes (A) e após (B) o congelamento/descongelamento – razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C; SpHL com trealose após o congelamento na razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (C) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (D)	125
Figura 28 - Fotomicrografias de SpHL antes e após o ciclo de congelamento/descongelamento obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. SpHL HP-β-CD após o congelamento/descongelamento – razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (A) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (B); SpHL com glicose após o congelamento na razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (C) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (D)	126
Figura 29 - Imagem descritiva das mudanças do estado físico da amostra de SpHL submetida à liofilização: 1) Camada Congelada 2) Interface de sublimação 3) Camada seca (liofilizada) 4) Movimento de sublimação.....	128
Figura 30 - Fotomicrografias de uma gota de SpHL na ausência de crioprotetor. Temperaturas (A) 25°C; (B)-21°C; (C) -27°C e (D) -30°C. Determinação da Tc por microscopia óptica acoplada a liofilização. Aumento original x100.....	129
Figura 31 - Fotomicrografias de uma gota de SpHL contendo glicose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p). Temperaturas (A) 25°C; (B) -23°C; (C) -50°C e (D) -47°C. Determinação da Tc por microscopia óptica acoplada a liofilização. Aumento original x100.....	130
Figura 32 - Aspecto macroscópico de SpHL com diferentes crioprotetores. (A) SpHL antes da liofilização. Após a liofilização: (B) SpHL com sacarose; (C) SpHL com trealose; (D) SpHL com HP-β-CD e (E) SpHL com glicose.....	133
Figura 33 - Curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Duração da liofilização: aproximadamente 57 horas.....	136

Figura 34 - Curva de liofilização de SpHL, contendo trealose como crioprotetor, após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Duração da liofilização: aproximadamente 29 horas.....	137
Figura 35 - Curva de liofilização dos lipossomas brancos, contendo HP-β-CD como crioprotetor e após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Tempo de liofilização: aproximadamente 88,7 horas.....	138
Figura 36 - Imagens de SpHL liofilizados após congelamento lento. A: SpHL sem crioprotetor. B: SpHL com trealose. C: SpHL com HP-β-CD.....	139
Figura 37 - Curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento rápido (imersão em N ₂ líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 37 horas.....	141
Figura 38 - Curva de liofilização de SpHL contendo trealose, após congelamento rápido (imersão em N ₂ líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 30 horas.....	142
Figura 39 - Curva de liofilização de SpHL, contendo HP-β-CD, após congelamento rápido (imersão em N ₂ líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 56 horas.....	143
Figura 40 - Imagens de SpHL liofilizados após congelamento rápido. A: SpHL sem crioprotetor; B: SpHL com trealose; C: SpHL com HP-β-CD.....	144
Figura 41 - Curva de liofilização de SpHL-CDDP contendo trealose, após congelamento lento. Tempo de liofilização: aproximadamente 27 horas.....	146
Figura 42 - Imagens de SpHL-CDDP contendo trealose liofilizados após congelamento lento. A: Dispersão de SpHL-CDDP com trealose antes da liofilização; B: SpHL-CDDP com trealose liofilizado.....	147
Figura 43 - SpHL-CDDP armazenados a 25°C sob distintas condições de umidade relativa. (A) 8,23 %, (B) 32,50 %, (C) 55,00 %, (D) 75,10 % e (E) 90,00 %	150
Figura 44 - Fotomicrografias de SpHL liofilizado, sem crioprotetor, e após congelamento lento, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de (A) 250 vezes, (B) 500 vezes, (C) 1000 vezes e (D) 2500 vezes, respectivamente.....	152
Figura 45 - Fotomicrografias de SpHL-CDDP liofilizados, com trealose após congelamento lento, e obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de (A) 250 vezes, (B) 500 vezes, (C) 1000 vezes e (D) 2500 vezes, respectivamente.....	153

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas durante a produção em escala industrial.....	64
Quadro 2 - Aspectos do processo de produção de SpHL preparados com diferentes solventes orgânicos.....	91
Quadro 3 - Relação das soluções de crioprotetores empregados no preparo dos lipossomas	106
Quadro 4 - Umidade relativa de equilíbrio de soluções salinas saturadas a 25°C.....	111
Quadro 5 - Composição da solução para contraste utilizada na microscopia eletrônica de transmissão.....	114
Quadro 6 - Comparação do efeito do congelamento sobre o diâmetro médio das vesículas de SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP.....	121
Tabela 1 - Estudos de transposição de escala para a produção de lipossomas.....	67
Tabela 2 - Solventes utilizados na etapa de emulsificação da preparação de SpHL pelo método REV.....	81
Tabela 3 - Programa de temperatura e fluxo de gás para a determinação da Pt.....	85
Tabela 4 - Características físico-químicas de SpHL preparados com diferentes solventes orgânicos.....	92
Tabela 5 - Influência das diferentes concentrações de CDDP sobre o diâmetro das vesículas e teor de encapsulação de SpHL-CDDP preparados pelo método REV.....	93
Tabela 6 - Caracterização físico-química de SpHL obtidos com uso de diferentes solventes orgânicos.....	94
Tabela 7 - Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos com uso de diferentes solventes orgânicos.....	95
Tabela 8 - Caracterização de SpHL-CDDP produzidos pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração do volume do lote.....	96
Tabela 9 - Caracterização de SpHL-CDDP produzidos método REV em escala piloto (método 2) com alteração do solvente.....	97
Tabela 10 - Caracterização de SpHL-CDDP obtida pelo método DRV.....	99
Tabela 11 - Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL.....	116
Tabela 12 - Efeito do congelamento rápido (a -80 °C) sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL.....	117
Tabela 13 - Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG.....	118
Tabela 14 - Efeito do congelamento lento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG.....	119

Tabela 15 - Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL-CDDP.....	120
Tabela 16 - Efeito do congelamento rápido sobre a retenção da CDDP em SpHL-CDDP.....	120
Tabela 17 - Relação das temperaturas críticas de SpHL para o processo de liofilização.....	131
Tabela 18 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento lento.....	136
Tabela 19 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo trealose como crioprotetor e após congelamento lento.....	137
Tabela 20 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo HP- β -CD como crioprotetor e após congelamento lento.....	138
Tabela 21 - Caracterização físico-química de SpHL liofilizados/reidratados após congelamento lento.....	140
Tabela 22 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento rápido.....	141
Tabela 23 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo trealose, após congelamento rápido.....	142
Tabela 24 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo HP- β -CD, após congelamento rápido.....	143
Tabela 25 - Caracterização físico-química de SpHL liofilizados/reidratados após congelamento rápido.....	145
Tabela 26 - Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL-CDDP contendo trealose, após congelamento lento.....	146
Tabela 27 - Caracterização físico-química de SpHL-CDDP contendo trealose.....	148
Tabela 28 - Absorção de umidade e teor de retenção de CDDP em SpHL-CDDP contendo trealose sob diferentes condições de armazenamento.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/O	água em óleo
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDDP	cisplatina
CHEMS	hemisuccinato de colestera
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
d.p.	desvio padrão
DAD	detector de arranjo de díodos
<i>Dew point</i>	Temperatura do ponto de orvalho
DOPE	dióleilfosfatidiletanolamina
DRV	desidratação/reidratação das vesículas
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	diestearoilfosfatidiletanolamina-metoxipoli(etileno)glicol ₂₀₀₀
ϵ	constante dielétrica
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDM	Microscopia acoplada à liofilização (<i>freeze-drying microscopy</i>)
GF-AAS	Espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite
GUV	lipossomas unilamelares gigantes
HAP	Homogeneização sob alta pressão
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano-sulfônico
HP- β -CD	hidroxipropil-beta-ciclodextrina
i.p.	índice de polidispersão
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	intravenoso
kDa	quilodáton
Lip- HP- β -CD	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos contendo hidroxipropil-beta-ciclodextrina
Lip-glicose	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos contendo glicose
Lip-S/Criop	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos sem crioprotetor

Lip-sacarose	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos contendo sacarose
Lip-trealose	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos contendo trealose
LUV	lipossomas unilamelares grandes
L_{α}	Fase lamelar fluida
L_{β}	Fase lamelar gel
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MLV	lipossomas multilamelares
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/p	relação peso por peso
p/v	relação peso por volume
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
PE	fosfatidiletanolamina
PEG	polietilenoglicol
REV	evaporação em fase reversa
SFM	sistema fagocitário mononuclear
SpHL	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos (sem CDDP)
SpHL sem PEG	lipossomas pH-sensíveis brancos sem o polímero DSPE-mPEG ₂₀₀₀
SpHL-CDDP	lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina
SUV	lipossomas unilamelares pequenos
TE	Teor de encapsulação
$T_{\mu c}$	Temperatura de microcolapso
T_c	Temperatura de colapso
T_{eu}	Temperatura eutética
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_g'	Temperatura de transição vítrea do crioconcentrado máximo
T_m	Temperatura de transição de fase
USP	Farmacopéia Americana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Câncer.....	26
2.2	Tratamento do câncer.....	27
2.2.1	Cisplatina.....	27
2.2.2	Inconvenientes da utilização da CDDP.....	29
2.3	Sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos.....	30
2.3.1	CDDP em sistemas nanoestruturados.....	30
2.4	Lipossomas.....	33
2.4.1	Definição.....	33
2.4.2	Classificação.....	33
2.5	Propriedades físicas, físico-químicas e químicas dos lipossomas.....	38
2.5.1	Transição de fase dos lípides.....	38
2.5.2	Diâmetro das vesículas.....	39
2.5.3	Potencial zeta.....	40
2.5.4	Morfologia dos lipossomas.....	41
2.5.5	Teor e eficiência de encapsulação.....	43
2.6	Estabilidade dos lipossomas e do fármaco encapsulado.....	44
2.6.1	Estabilidade física.....	44
2.6.2	Estabilidade química.....	45
2.6.3	Hidrólise da CDDP.....	46
2.7	Liofilização.....	47
2.7.1	Parâmetros do processo de liofilização.....	49
2.7.2	Temperaturas críticas do processo de liofilização.....	51
2.7.3	Otimização do processo de liofilização.....	53
2.8	Crioproteção.....	54
2.9	Métodos de preparação de lipossomas.....	60
2.9.1	Método da evaporação em fase reversa.....	60
2.9.2	Método da desidratação-reidratação.....	61
2.10	Produção em escala piloto.....	62
3	OBJETIVOS.....	69
3.1	Objetivos específicos.....	69

CAPÍTULO 1 - Otimização da produção de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina.....	70
1 INTRODUÇÃO.....	72
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1 Material.....	74
2.1.1 Reagentes.....	74
2.1.2 Equipamentos.....	74
2.2 Métodos.....	75
2.2.1 Métodos de preparação de lipossomas.....	75
2.2.2 Produção de lipossomas pelo método REV em pequena escala (método 1) com alteração dos solventes utilizados.....	79
2.2.3 Produção de lipossomas pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração do solvente e da concentração do fármaco.....	82
2.2.4 Preparação de lipossomas pelo método de DRV.....	82
2.3 Métodos de caracterização dos lipossomas.....	84
2.3.1 Determinação do diâmetro e do potencial zeta das vesículas.....	84
2.3.2 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP.....	84
2.4 Análise estatística.....	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP.....	89
3.1.1 Método CLAE.....	89
3.1.2 Método GF-AAS.....	90
3.2 Produção de SpHL e SpHL-CDDP pelo método REV.....	90
3.2.1 Produção de SpHL pelo método REV em pequena escala (método 1) com alterações dos solventes utilizados.....	90
3.2.2 Produção de SpHL-CDDP pelo método REV em pequena escala (método 1) com alterações da concentração do fármaco.....	92
3.2.3 Produção de SpHL e SpHL-CDDP pelo método REV, em pequena escala (método 1), com variação do solvente da formulação.....	94
3.2.4 Escalonamento da produção de SpHL-CDDP pelo método REV (método 2)	96
3.2.5 Produção de SpHL-CDDP pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração dos solventes e da concentração do fármaco.....	97
3.3 Preparação de lipossomas pelo método de DRV.....	98

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento do programa de liofilização de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina.....	100
1 INTRODUÇÃO.....	102
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
2.1 Material.....	104
2.1.1 Reagentes.....	104
2.1.2 Equipamentos.....	104
2.2 Métodos.....	105
2.2.1 Preparação de lipossomas para o estudo de congelamento-descongelamento e da liofilização.....	105
2.2.2 Utilização de substâncias crioprotetoras.....	105
2.2.3 Estudo da etapa de congelamento.....	106
2.2.4 Determinação da temperatura de colapso.....	107
2.2.5 Liofilização dos lipossomas.....	109
2.2.6 Determinação da absorção de umidade em SpHL-CDDP após armazenamento em diferentes condições de umidade.....	111
2.2.7 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	111
2.3 Análise estatística.....	114
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1 Desenvolvimento de um programa de liofilização – Estudo da etapa de congelamento.....	116
3.1.1 Efeito do congelamento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL.....	116
3.1.2 Efeito do congelamento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG.....	118
3.1.3 Efeito do congelamento sobre as características físico-químicas de SpHL-CDDP.....	119
3.2 Comparação do comportamento de SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP frente às diferentes temperaturas e razões de congelamento.....	121
3.3 Análises microscópicas de SpHL.....	125
3.4 Determinação das temperaturas críticas para o desenvolvimento do processo de liofilização.....	127
3.4.1 Determinação da temperatura de cristalização da água e temperatura de colapso das formulações de SpHL contendo diferentes crioprotetores.....	127
3.5 Desenvolvimento do programa de liofilização de SpHL.....	132
3.5.1 Liofilização de SpHL contendo crioprotetores, após congelamento lento.....	133

3.5.2 Liofilização de SpHL contendo crioprotetores, após congelamento rápido.....	140
3.5.3 Liofilização de SpHL-CDDP.....	145
3.6 Análises por microscopia eletrônica de varredura de SpHL e SpHL-CDDP.....	152
CONCLUSÃO.....	155
PERSPECTIVAS.....	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	160

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cisplatina (CDDP) é um dos fármacos mais efetivos e potentes da terapia antitumoral, sendo utilizada como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos (KONDAGUNTA *et al.*, 2005), porém apresenta alguns inconvenientes, tais como: os efeitos adversos graves, o desenvolvimento de resistência ao fármaco, a rápida inativação, além de incompatibilidades farmacotécnicas durante sua administração (MONTI *et al.*, 2005). Uma forma de reduzir os efeitos colaterais e tóxicos, assim como aumentar o índice terapêutico da CDDP, é a sua encapsulação em lipossomas (VELINOVA *et al.*, 2004).

Os lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas (LASIC, 1998). Estes sistemas foram sugeridos para a utilização na terapia do câncer por Gregoriadis e colaboradores, em 1974. Lipossomas podem ser usados no tratamento do câncer devido a sua capacidade de atravessar os poros da neovascularização malformada que irriga a região tumoral (FERRARI, 2005). Além disto, eles são capazes de diminuir a captação pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) através da utilização de polímeros hidrofílicos acoplados a sua superfície. Lipossomas podem também agir na região tumoral após um direcionamento ativo, no qual ligantes específicos são inseridos na superfície lipossomal (TRAN *et al.*, 2009; TORCHILIN, 2009). Estas estratégias minimizam a degradação do fármaco e a inativação após a administração, bem como aumentam a sua biodisponibilidade e a fração deste que é liberada na região patológica, aumentando deste modo a eficácia e/ou diminuindo a sua toxicidade.

O extenso interesse no uso de lipossomas como carreadores de fármacos exige procedimentos que atendam aos padrões farmacêuticos quanto à preparação e caracterização das vesículas. Procedimentos tecnológicos aceitáveis devem ser reproduzíveis em larga escala e economicamente viáveis (VEMURI; RHODES, 1995). Além disto, para serem empregados como carreadores de fármacos, também é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável, pois podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante o armazenamento. A estabilidade dos lipossomas sob a forma líquida é reduzida devido aos fenômenos de agregação e/ou fusão e devido ao fato dos fosfolípidos, constituintes das vesículas, sofrerem hidrólise e oxidação em meio aquoso. Estes fenômenos de instabilidade das vesículas podem ocasionar o extravasamento do material encapsulado. A liofilização na presença de agentes crioprotetores é uma alternativa à obtenção de um sistema de liberação de fármacos mais estável (CHOW *et al.*, 1995; VEMURI;

RHODES, 1995; MOHAMMED *et al.*, 2006). Formulações liofilizadas têm a vantagem de uma melhor estabilidade e também proporcionam uma facilidade de manuseio no transporte e no armazenamento.

Uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada de cisplatina (SpHL-CDDP) foi desenvolvida em escala laboratorial, pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a Mônica Cristina de Oliveira, mediante o emprego do método de evaporação em fase reversa (REV), seguido de extrusão e ultracentrifugação (VIEIRA, 2003). Estudos de biodistribuição mostraram que após a administração de SpHL-CDDP, por via endovenosa, a CDDP atingiu uma concentração aproximadamente 2 vezes maior em tumores sólidos de camundongos do que após a administração de CDDP livre (CARVALHO-JUNIOR *et al.*, 2007; JUNIOR *et al.*, 2007). O uso de SpHL-CDDP também mostrou menor acumulação de CDDP nos rins e maior sobrevida dos camundongos com carcinomatose peritoneal em relação à CDDP livre, após sua administração por via intraperitoneal. Além disso, SpHL-CDDP foi capaz de diminuir a toxicidade na medula óssea, após administração intraperitoneal (LEITE *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2011; MARONI *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012).

Diante destes resultados, foi iniciada a pesquisa da viabilidade da transposição de escala e da produção desta formulação sob as formas líquida e liofilizada para posterior avaliação em testes clínicos. Um processo de produção piloto de SpHL-CDDP, constituído pelas etapas sucessivas de evaporação em fase reversa (REV), homogeneização sob alta pressão e ultrafiltração foi desenvolvido. Contudo, fez-se necessária a otimização dos parâmetros de produção visando o aumento do teor de encapsulação. SpHL-CDDP, armazenados sob a forma líquida e liofilizada, apresentaram manutenção do diâmetro das vesículas e do potencial zeta, durante 135 dias de armazenamento e a forma liofilizada (contendo trealose como substância crioprotetora) foi mais eficiente na retenção da CDDP encapsulada do que a forma líquida (GIUBERTI *et al.*, 2011).

O extravasamento do soluto e a viabilidade da liofilização são os principais desafios para a estabilidade de armazenamento de formulações lipossomais (WIEBER; SELZER; KREUTER, 2012). Embora nas últimas décadas o interesse nos lipossomas como sistema de liberação de fármacos para uma grande variedade de moléculas e em diferentes áreas de aplicação tenha crescido exponencialmente, apenas algumas formulações foram aprovadas pelas agências de regulação de medicamentos para aplicações parenterais. Além disso, o número de estudos clínicos é esparso em relação à quantidade de trabalhos na área. Produtos comercializados atualmente incluem os lipossomas liofilizados de anfotericina B (Ambisome®) e algumas formulações contendo doxorubicina (Doxil®, EUA = Caelyx®,

Europa; e Myocet®). No setor de vacinas, poucas formulações lipossomais (Epaxal® ou Inflexal V®) estão sendo comercializadas.

O delineamento de um processo de liofilização é frequentemente abordado por um método empírico de "tentativa e erro". Conseqüentemente, as liofilizações de uso comercial não são, na maioria das vezes, nem robustas nem eficientes. A estabilidade do fármaco durante a liofilização e armazenamento, e a duração do ciclo são as duas principais considerações a serem feitas na otimização deste processo. Para tanto, deve-se conhecer as propriedades críticas da formulação e aplicá-las no delineamento do programa de liofilização. Estas propriedades incluem a temperatura de colapso da formulação, a estabilidade do fármaco e as propriedades dos excipientes (TANG; PIKAL, 2004). O programa de liofilização empregado deve ser otimizado, bem como o estudo do emprego dos crioprotetores, a fim de se obter lipossomas após o processo de liofilização/reidratação, com uma população de vesículas exclusivamente ≤ 500 nm, diâmetro tal que permite o extravasamento das partículas em tecidos com permeabilidade vascular aumentada, condição frequentemente presente no caso de tumores (LASIC, 1998; YUAN *et al.*, 1995).

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é uma doença que pode acometer órgãos e tecidos de diferentes origens histológicas, se manifestar com diferentes comportamentos biológicos e que tem em comum o crescimento desordenado das células do organismo. As características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si variam de acordo com o tipo de célula acometida, sua velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecidos e órgãos distantes, originando as metástases. O surgimento do câncer ocorre através da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido à alteração do seu DNA. As causas do câncer são variadas e estão associadas à participação de vírus, à ação de substâncias químicas do meio ambiente ou da alimentação, ou ainda à influência de agentes físicos, tal como a radiação. A célula cancerosa prolifera-se desordenadamente, perde a capacidade de aderência, invade os tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos e espalha-se pelo organismo, estabelecendo-se em locais distantes de sua origem, onde produz os tumores secundários (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Uma característica marcante dos tecidos tumorais é o fato do pH extracelular (pH_e) ser mais ácido que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular (pH_i) de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o pH_e substancialmente reduzido no tumor quando comparado com o tecido normal, promove um gradiente de pH celular diferente nestes dois tecidos. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar o baixo pH_e nos tecidos tumorais é o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da célula cancerosa (STUBBS *et al.*, 1999).

O câncer é a segunda maior causa de morte nos países industrializados depois das doenças cardiovasculares, onde uma em cada quatro pessoas adquire a doença e uma em cada cinco morre (FONTES *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito deste aumento vai incidir em países de baixa e média rendas. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da

pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Para o sexo masculino, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto, e glândula tireoide, para o sexo feminino (INCA, 2011).

2.2 Tratamento do câncer

Existem três principais tipos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, nos casos em que não apresentam metástase. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficácia do tratamento. Entretanto, na ocorrência de metástase, faz-se necessária uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70 % dos casos, com a quimioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.2.1 Cisplatina

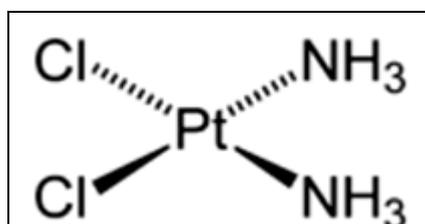


Figura 1 - Fórmula estrutural da cisplatina.

A cis-diaminodicloroplatina (II) (CDDP) é um complexo inorgânico divalente, hidrossolúvel, que contém platina (Figura 1). CDDP e outros fármacos relacionados, como a carboplatina, formam fortes intermediários eletrofílicos que atuam via substituição nucleofílica na formação de ligações cruzadas no DNA. O mecanismo de ação da CDDP envolve a entrada na célula, onde o íon cloreto se dissocia e gera um complexo que reage com a água. A substituição do cloreto por água fornece uma molécula carregada positivamente (a espécie ativada da droga) a qual, a seguir, reage com ácidos nucleicos (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003).

A interação da CDDP com o DNA é através da ligação aos átomos N7 dos anéis

imidazólicos de guanosina e adenosina. Três diferentes tipos de ligações podem ser formadas com as bases púricas do DNA: monoadutos, ligações cruzadas intracadeia e ligações cruzadas intercadeia. Os monoadutos são os primeiros a serem formados pela perda de uma molécula de água da espécie, entretanto, 90% dos monoadutos reagem para formar ligações cruzadas, sendo quase todas do tipo intracadeia. As ligações cruzadas promovem a contorção da estrutura do DNA, o que pode ser responsável pela citotoxicidade por bloquear mecanismos de reparação, transcrição e replicação do DNA e favorecer a iniciação do processo de apoptose. A CDDP também é capaz de promover a ativação das caspases apoptóticas pela ativação da via do estresse do retículo endoplasmático (RABIK; DOLAN, 2007).

Considerado um dos fármacos mais efetivos e potentes na terapia antitumoral, a CDDP é frequentemente utilizada como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (KONDAGUNTA *et al.*, 2005; MUGGIA;FOJO, 2004; SHIRAZI *et al.*, 1996; LE CHEVALIER *et al.*, 1994; GUILLOT *et al.*, 1992; KRIEGER *et al.*, 2010; HIRAI *et al.*, 2010).

A CDDP é geralmente administrada por via intravenosa (IV) e é disponibilizada comercialmente como solução injetável na concentração de 1 mg/mL. Os esquemas típicos de administração intravenosa de CDDP, como agente único a adultos ou crianças, são: 50-100 mg/m² como infusão IV a cada 3 ou 4 semanas; ou infusão IV de 15-20 mg/m² por dia durante 5 dias consecutivos, a ser repetido a cada 3 ou 4 semanas (MARTINDALE, 2005).

A CDDP também tem sido administrada por via intraperitoneal com a finalidade de se atingir níveis tumorídeos do fármaco localmente, ao mesmo tempo em que os efeitos colaterais sistêmicos são minimizados (TAMURA *et al.*, 2002). Grande parte dos estudos da eficácia da administração intraperitoneal tem utilizado agentes quimioterápicos para o tratamento da carcinomatose peritoneal e do câncer ovariano. Como 50 % dos pacientes com doenças malignas gastrointestinais e ginecológicas, apresentam carcinomatose peritoneal logo após cirurgia local, há um grande interesse em utilizar esta via de administração (PHILLIPS *et al.*, 2002). A razão para a terapia intraperitoneal em câncer ovariano é porque o peritônio recebe exposição sustentada de altas concentrações dos agentes antitumorais, enquanto tecidos saudáveis, como a medula óssea, são relativamente poupados (ARMSTRONG *et al.*, 2006).

Armstrong e colaboradores (2006) conduziram um estudo no qual foi realizada a administração loco-regional de CDDP na cavidade abdominal de pacientes com carcinoma ovariano estágio III ou carcinomatose peritoneal primária, que levou a uma redução de 25%

de mortalidade se comparada à administração intravenosa. Embora grande parte dos fármacos administrados por esta via sejam rapidamente depurados do fluido peritoneal, esta forma de administração pode atingir picos de concentrações mais elevadas neste fluido quando comparadas com o mesmo fármaco administrado por via IV (PHILLIPS *et al.*, 2002).

A maioria dos fármacos antitumorais são moléculas hidrossolúveis pequenas, como a CDDP, que são absorvidas rapidamente através dos capilares e atingem a circulação sanguínea. Isto dificulta a manutenção de uma concentração adequada do fármaco na cavidade intraperitoneal por longos períodos. Como as partículas corpusculares são captadas lentamente pelo sistema linfático sem serem absorvidas pelos capilares, ficando retidas na cavidade peritoneal, o tratamento da carcinomatose peritoneal é uma aplicação potencial dos lipossomas contendo agentes antitumorais (KUMAGAI *et al.*, 1996).

2.2.2 Inconvenientes da utilização da CDDP

A CDDP apresenta como inconvenientes na sua utilização: os efeitos adversos graves, o desenvolvimento de resistência ao fármaco e sua rápida inativação devido à complexação com o plasma e proteínas teciduais, além de incompatibilidades farmacotécnicas durante sua administração. Os efeitos tóxicos deste fármaco, em animais e humanos, incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e mielossupressão. Contudo seu principal efeito adverso dose-limitante é a nefrotoxicidade (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003). Os efeitos nefrotóxicos da CDDP são cumulativos e aumentam com a dose e duração do tratamento (MARTINDALE, 2005).

A resistência à CDDP parece envolver uma combinação de mecanismos incluindo diminuição do transporte do fármaco, aumento da detoxificação celular devido à glutatona e metalotioneínas, e aumento na capacidade de reparo celular, bem como alterações nas vias de apoptose celular (MONTI *et al.*, 2005). Como exemplos de incompatibilidades da CDDP com outros fármacos ou constituintes da formulação podemos citar: (i) sua precipitação em presença de etoposídeo dissolvido em solução de NaCl 0,9 % (p/v); (ii) precipitação em presença de tiotepa dissolvida em solução de glicose a 5 % (p/v) e (iii) degradação da CDDP decorrente de sua interação com trometamol, um excipiente utilizado na formulação de 5-Fluorouracila (TRISSEL; MARTINEZ, 1996; FOURNIER *et al.* 1992).

Existem duas estratégias para aumentar a segurança da utilização deste fármaco: 1) o desenvolvimento de fármacos análogos, como a carboplatina e a oxaliplatina e 2) o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas alvo-específicas.

2.3 Sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos

A associação de fármacos já em uso a um sistema transportador, visando direcionar o fármaco para a célula alvo e evitar os locais indesejáveis onde o fármaco exerce toxicidade, oferece um ganho de tempo na fase de desenvolvimento de um produto porque usa um fármaco já caracterizado do ponto de vista farmacológico (FRÉZARD *et al.*, 2005). O direcionamento de fármacos por meio de sistemas carreadores tem sido amplamente estudado. A nanotecnologia, uma área do conhecimento científico de caráter multidisciplinar, que envolve a criação e utilização de materiais, instrumentos e sistemas em uma escala nanométrica, está associada à tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos. A oncologia representa o campo da medicina no qual a nanotecnologia tem feito as maiores contribuições. Nos últimos 15 anos, nanossistemas ocuparam um importante nicho no tratamento do câncer, e os lipossomas de doxorubicina foram o primeiro sistema nanoestruturado disponível comercialmente (SAKAMOTO *et al.*, 2010).

2.3.1 CDDP em sistemas nanoestruturados

Inúmeras pesquisas científicas têm utilizado nanossistemas para a veiculação da CDDP, entre as quais são destacadas as nanopartículas (XU *et al.*, 2006); microesferas (KUMAGAI *et al.*, 1996), micelas poliméricas (NISHIYAMA *et al.*, 2003) e lipossomas (BOULIKAS, 2004; STATHOPOULOS *et al.*, 2006; JÚNIOR *et al.*, 2007).

Xu e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas de CDDP constituídas de caprolactona/polietilenoglicol ou caprolactona/polimetacrilato, com eficiência de encapsulação de aproximadamente 90 %. Estas nanopartículas foram testadas em células de adenocarcinoma de ovário SKOV-3, as quais são células resistentes à CDDP, dentre outros fármacos. As nanopartículas de CDDP foram capazes de ser internalizadas pelas células e mostraram uma elevada eficácia antitumoral.

Microesferas constituídas de copolímeros de ácido lático-ácido glicólico foram desenvolvidas para a encapsulação de CDDP (CDDP-PLGA), apresentando diâmetro de

aproximadamente 100 µm e teor de encapsulação de 5 % (KUMAGAI *et al.*, 1996). CDDP-PLGA foram administradas por via intraperitoneal em ratas com carcinomatose peritoneal e mostraram ser mais efetivas quanto à sobrevivência dos animais do que a solução de CDDP. Além disso, a preparação liberou o fármaco lentamente por um longo período de tempo na cavidade peritoneal.

Micelas poliméricas constituídas por polietilenoglicol-ácido poliglutâmico e CDDP foram investigadas quanto à capacidade de constituírem um sistema de liberação de fármacos tumor-específico. As micelas poliméricas apresentaram um diâmetro de 28 nm, com distribuição muito homogênea e teor de encapsulação de 39 %. As micelas contendo CDDP apresentaram elevada estabilidade em água, mesmo em soluções muito diluídas. Entretanto, em soluções ricas em íons cloreto, estas se dissociam acompanhadas de liberação da CDDP (NISHIYAMA *et al.*, 2003).

A formação de lipossomas constituídos por lípidos carregados negativamente podem permitir a interação eletrostática com as espécies aquosas da CDDP, carregadas positivamente. A cinética de liberação de lipossomas de CDDP constituídos por dioleilfosfatidilcolina:dioleilfosfatidilserina (DOPC/DOPS) é temperatura-dependente, ocorrendo perda de 75 % do conteúdo com uma meia-vida de 6,5 h a 37°C (VELINOVA *et al.*, 2004).

Uma formulação de lipossomas de CDDP, Lipoplatin®, foi desenvolvida com a finalidade de reduzir a toxicidade sistêmica da CDDP e direcioná-la aos sítios tumorais. Esta formulação é constituída por dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000, com diâmetro vesicular médio de 110 nm. Lipoplatin® mostrou-se menos tóxica que a CDDP livre em ratos após administração por via intravenosa e intraperitoneal (BOULIKAS, 2004).

Em estudos clínicos de fase I-II conduzidos em pacientes portadores de câncer de pâncreas e refratários ao tratamento com gencitabina, Lipoplatin® foi associado com gencitabina para avaliação de eficácia e toxicidade. O avanço detectado foi a menor toxicidade observada, atribuída ao uso de Lipoplatin® (STATHOPOULOS *et al.*, 2006). Em um estudo clínico de fase III realizado em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, o perfil farmacocinético do Lipoplatin®, em combinação com 5-fluorouracil, apresentou um *clearance* maior e uma meia-vida menor do que a CDDP livre, o que confirma a observação clínica de toxicidade reduzida, especialmente nefrotoxicidade (JEHN *et al.*, 2007).

Outra formulação de CDDP lipossomal, denominada SPI-077 é constituída por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina associada à metoxipolietilenoglicol 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀), razão molar 51:44:5, respectivamente. SPI-077 foi delineada a fim de “direcionar a CDDP” às células tumorais através do retardo da excreção renal e aumento do tempo de circulação, para reduzir a toxicidade ocasionada pela CDDP na sua forma livre e evitar os procedimentos profiláticos como hidratação e utilização de anti-eméticos. Entretanto, reações graves de hipersensibilidade aos componentes da formulação fizeram necessária a profilaxia com corticosteróides e anti-histamínicos (NEWMAN *et al.*, 1999). Com relação aos estudos pré-clínicos de eficácia antitumoral realizado em camundongos, Newman e colaboradores (1999) mostraram que SPI-077 exibiu atividade superior à CDDP livre. Entretanto, os estudos clínicos de fase I e II em pacientes portadores de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço avançado demonstraram ineficácia desta formulação, sendo esse fato atribuído à baixa biodisponibilidade e a lenta cinética de liberação da CDDP a partir dos lipossomas (HARRINGTON *et al.*, 2001).

Woo e colaboradores (2008) desenvolveram uma formulação de lipossomas termosensíveis de CDDP, composta por dipalmitoilfosfatidilcolina/estearoil-hidroxi-glicerofosfocolina/diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada a metoxi-polietilenoglicol (DPPC/MSPC/mDSPE-PEG2000; razão molar igual a 90:10:4, respectivamente), no qual o lisofosfolípide (MSPC) facilita a rápida liberação do fármaco, ocorrendo num intervalo de tempo igual a segundos. Quando esta formulação foi incubada a 42 °C, 100 % da CDDP foi liberada da formulação em 30 minutos.

Estudos realizados por Júnior e colaboradores (2007) demonstraram que os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP) apresentam uma maior atividade citotóxica sobre a linhagem celular A549 (células cancerosas de pulmão humano) do que a CDDP livre. Além disto, esta formulação exibiu a mesma eficiência em células sensíveis e em células resistentes à CDDP, o que sugere que esta formulação pode burlar os mecanismos de resistência oferecidos pelas células à penetração do fármaco. Estudos de biodistribuição mostraram que após a administração de SpHL-CDDP, por via IV, a CDDP atingiu uma concentração aproximadamente 2 vezes maior em tumores sólidos de camundongos do que após a administração de CDDP livre (CARVALHO-JUNIOR, 2007, JUNIOR *et al.*, 2007). O uso de SpHL-CDDP também mostrou menor acumulação de CDDP nos rins e maior sobrevida dos camundongos com carcinomatose peritoneal em relação à CDDP livre, após sua administração por via intraperitoneal. Além disto, SpHL-CDDP foi

capaz de diminuir a toxicidade na medula óssea, após administração intraperitoneal (LEITE *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2011; MARONI *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012).

2.4 Lipossomas

2.4.1 Definição

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Estas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso (Figura 2). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípidos. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar. Estes sistemas lipídicos foram descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas. A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70. Entretanto, as primeiras formulações de lipossomas estudadas não produziram os resultados esperados, devido principalmente à instabilidade das vesículas, ao baixo teor de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração. Sua utilização foi viabilizada após o entendimento das características de estabilidade e de interações desta forma farmacêutica (LASIC, 1998).

2.4.2 Classificação

As propriedades químicas e físico-químicas dos lipossomas variam de acordo com sua composição lipídica, diâmetro vesicular, lamelaridade, carga superficial e método de preparação.

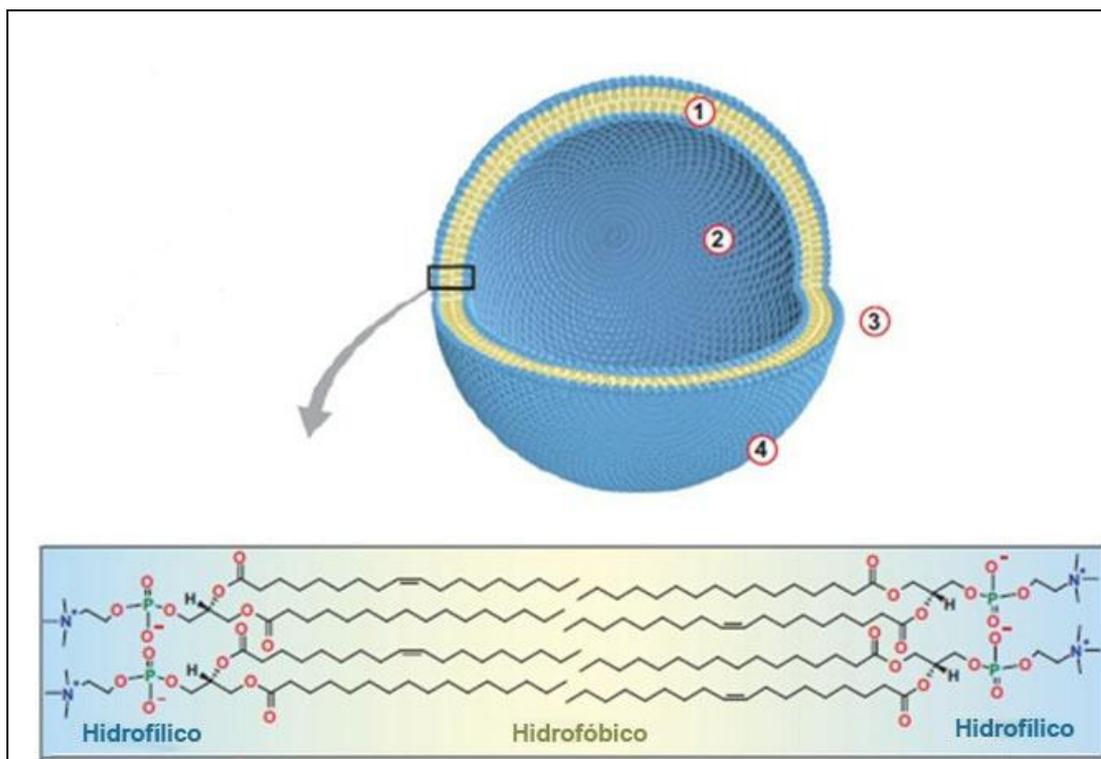


Figura 2 - Representação esquemática do lipossoma demonstrando uma cavidade aquosa (2) envolvida por uma bicamada lipídica (1). A bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos fosfolípides. O n^o3 representa o meio aquoso externo e n^o4, a superfície de ligação de modificadores estruturais.

2.4.2.1 Lipossomas unilamelares e multilamelares

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV) e (iii) vesículas multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares, formadas por uma bicamada única, são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-50 nm e LUV, quando são maiores que 100 nm (Figura 3). Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro compreendido entre 100-1000 nm (NEW, 1990; SAHOO, 2003).

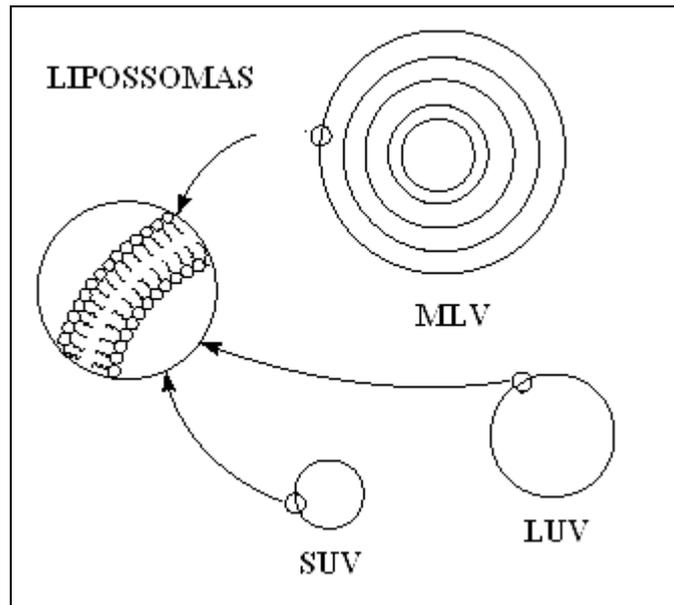


Figura 3 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).

2.4.2.2 Lipossomas convencionais e de circulação prolongada

Na evolução do seu emprego como carreadores de fármacos, algumas alterações foram realizadas na estrutura básica dos lipossomas, as quais possibilitaram maior aplicação terapêutica devido às modificações das características de interação com os sistemas biológicos. Os lipossomas convencionais, quando administrados por via endovenosa, sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo no fígado, baço e medula óssea. Foi observado que a incorporação, na membrana dos lipossomas, de lípides acoplados a polímeros de etilenoglicol (PEGs), altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante o impedimento da captura pelos macrófagos e o prolongamento de sua presença na corrente sanguínea. Estes lipossomas, denominados lipossomas de circulação prolongada (Figura 4), permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2007). Concentrações de 5-10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de massa molecular compreendida entre 1000-2000 Da conferem excelente estabilidade físico-química, além da propriedade de circulação prolongada às formulações (ULRICH, 2002).

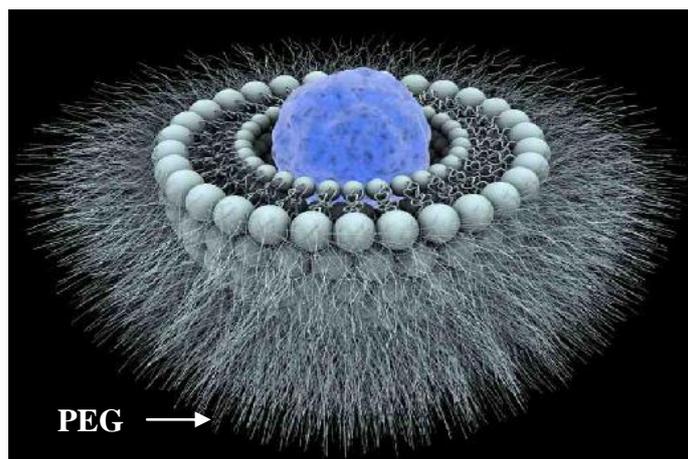


Figura 4 – Representação esquemática dos lipossomas de circulação prolongada.

Antes do advento das formulações com polímeros hidrofílicos acoplados aos fosfolípides, foram utilizados lipossomas pequenos, com membrana rígida e neutros, como tentativa de redução da ação do SFM sobre os lipossomas. Entretanto, este tipo de lipossoma tem sérias desvantagens como sistema de liberação de fármacos, que incluem: pequeno volume interno de encapsulação, aumento do diâmetro das vesículas durante armazenamento, poucas substâncias disponíveis para este tipo de formulação e perfil farmacocinético dose-dependente (PAPAHADJOPOULOS; GABIZON, 1995).

2.4.2.3 Lipossomas pH-sensíveis

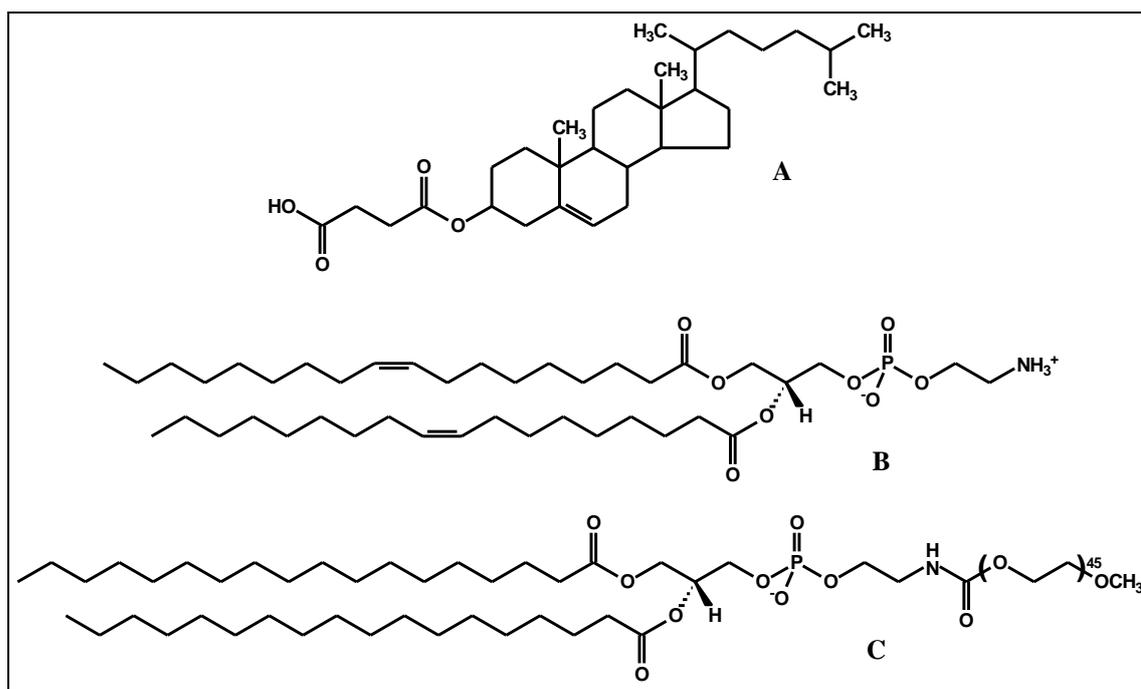


Figura 5 – Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (C).

O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos enfermos (tumores, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967), além do fato de que alguns tipos de vírus desenvolveram estratégias para aproveitar-se da acidificação do meio do lúmen endossomal para infectar células (SIMÕES *et al.*, 2004). Estes lipossomas exibem transições de fases, características dos seus constituintes fosfolípidicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido e são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4).

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas (SIEGEL, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico encontram-se sob a forma ionizada (Figura 5).

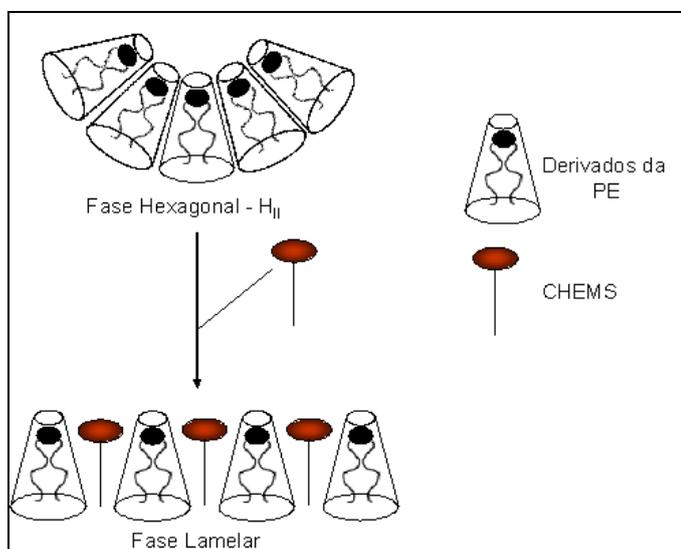


Figura 6 – Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.

Estes estabilizantes são capazes de inserir-se entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides, favorecem a organização lamelar (Figura 6), possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um

meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

2.5 Propriedades físicas, físico-químicas e químicas dos lipossomas

As propriedades e aplicações dos lipossomas dependem das características físicas e físico-químicas de suas membranas. A bicamada lipídica constitui uma estrutura dinâmica passível de sofrer deformações, de abrir e fechar os poros, de sofrer fusões e permitir o deslocamento lateral de seu material estrutural. A fluidez da bicamada é delineada por diferentes tipos de movimentos moleculares, como difusão lateral, difusão rotacional, movimento flip-flop e flexão das cadeias hidrocarbonadas. O comprimento das cadeias hidrocarbonadas bem como seu grau de insaturação influenciam a fluidez. A temperatura também é um fator importante a ser considerado. De forma geral, a fluidez da membrana aumenta com o aumento da quantidade de duplas ligações. Assim, determinadas bicamadas com alto grau de insaturação nas cadeias hidrocarbonadas podem apresentar alta fluidez mesmo em temperaturas reduzidas (NEW, 1990).

2.5.1 Transição de fase dos lípides

As bicamadas lipídicas (lamelas) apresentam transições de fase que estão relacionadas com a temperatura e a pressão externa. Uma transição de fase é caracterizada pela mudança conformacional das cadeias hidrocarbonadas. Os grupos metileno podem assumir diferentes conformações devido às rotações das ligações carbono-carbono resultantes de variações de temperatura e pressão. A temperatura efetiva de transição de fase depende de vários fatores: tamanho das cadeias hidrocarbonadas, grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas, natureza do grupo polar dos fosfolípides, grau de hidratação do grupo polar do fosfolípide, composição da formulação e força iônica do meio (NEW, 1990).

A fluidez da bicamada, quando constituída de um único tipo de lípide, depende da temperatura de transição de fase do estado gel (sólido) para o estado líquido-cristalino (fluido) (T_m). Quando a temperatura do meio é igual à T_m , as cadeias hidrocarbonadas dos lípides passam do estado ordenado (sólido) para o estado fluido no qual estas se encontram desordenadas e têm grande liberdade de movimento. Portanto, de acordo com a T_m , as

membranas lipossomais de diferentes composições podem exibir diferentes níveis de fluidez sob as mesmas condições de temperatura. A permeabilidade da bicamada depende da fluidez da membrana e da natureza do soluto encapsulado. A taxa de permeabilidade mais elevada ocorre na T_m e é menor no estado gel em comparação com o estado fluido (FRÉZARD, 1999). Um componente lipídico importante, muito utilizado na composição dos lipossomas, é o colesterol. Este aumenta a rigidez das membranas no estado líquido-cristalino e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado gel (ULRICH, 2002).

2.5.2 Diâmetro das vesículas

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para garantia da estabilidade desta forma farmacêutica. Muitos estudos utilizam lipossomas unilamelares com distribuição homogênea e diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm. Esta faixa é um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro), a estabilidade dos lipossomas (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200 nm) e capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro) (LASIC, 1998).

São utilizadas diferentes técnicas para análise do diâmetro dos lipossomas e sua distribuição. Dentre estas estão compreendidas técnicas de espalhamento da luz (BERGER *et al.*, 2001; CASALS *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006) e microscopia, como microscopia de criofatura (BERGER *et al.*, 2001) e microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Uma técnica bastante empregada é denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento dinâmico da luz (*Quasielastic Light Scattering*). A técnica de PCS consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes espalhem a luz. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento browniano das partículas, de modo que a intensidade da luz espalhada por estas forme um padrão de movimento. Por meio da dispersão da luz, torna-se possível determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de movimentarem mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (HASKELL *et al.*, 1998). Esta técnica permite a medida de partículas cujos diâmetros estejam compreendidos na faixa de 1 a 5000 nm (MALVERN INSTRUMENTS, 1996a).

2.5.3 Potencial zeta

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a sua estabilidade (CASALS *et al.*, 2003).

A presença de uma carga superficial em partículas suspensas num líquido afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula, ou seja, na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão. O efeito resultante é um acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. Estes íons levam a formação de uma “camada elétrica” que reveste a partícula, e a camada é dividida em duas partes (Figura 7): uma camada interna, onde os íons estão fortemente ligados à partícula, e uma camada externa, onde os íons se difundem e estão ligados fracamente. A camada externa representa uma barreira de proteção dentro da qual a partícula e os íons formam uma entidade com relativa estabilidade iônica. Quando a partícula difunde no líquido, sob ação de uma diferença de potencial, os íons contidos dentro dessa barreira difundem juntamente com a partícula, fato que não ocorre com os íons externos à barreira. O potencial que existe nesta barreira é denominado de potencial eletrocinético, mais conhecido como potencial zeta.

Potencial zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada externa. A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão considerando que, se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo de potencial zeta, elas irão repelir umas às outras evitando a agregação. De forma geral, a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis é considerada como sendo o valor de potencial zeta de ± 30 mV, sendo considerados ótimos os valores de ± 60 mV, para a estabilização eletrostática. Logo, a agregação de partículas ocorre menos frequentemente em partículas carregadas devido à repulsão eletrostática. Entretanto, esta regra não pode ser rigorosamente aplicada para sistemas que contêm estabilizantes estéricos, os quais diminuem o valor numérico do potencial zeta devido à mudança do plano de cisalhamento da partícula (HEURTAULT *et al.*, 2003).

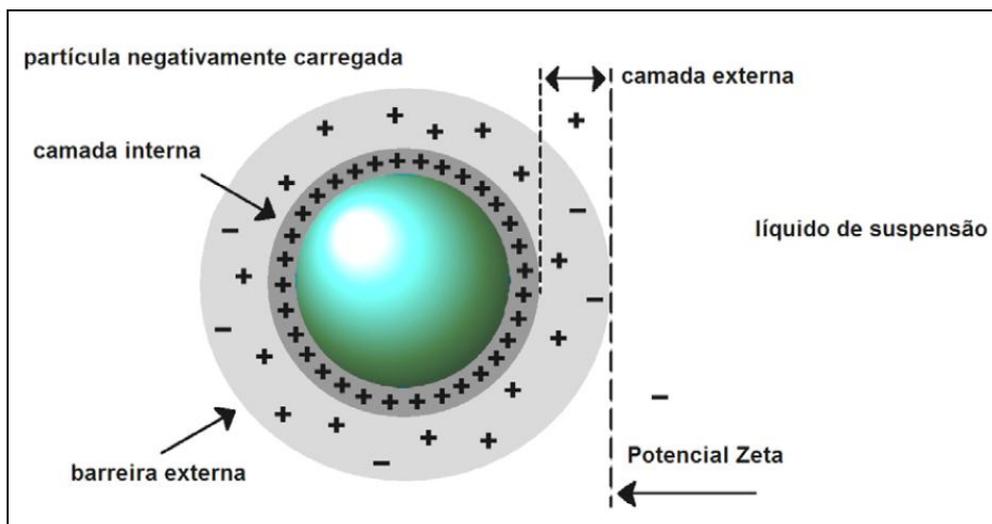


Figura 7 – Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado (Adaptado de MALVERN INSTRUMENTS, 1996a).

A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Para a determinação do potencial zeta dos lipossomas utiliza-se um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra. Neste, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências. As frequências são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas (MALVERN INSTRUMENTS, 1996b).

2.5.4 Morfologia dos lipossomas

A morfologia dos lipossomas pode ser avaliada por diferentes técnicas de microscopia (Figura 8). Dentre estas técnicas, podem-se destacar as microscópicas de luz (polarização, fluorescência, confocal) ou eletrônica (microscopia eletrônica de transmissão, MET; crio-MET; microscopia de criofatura; e a microscopia eletrônica de varredura ambiental – MEV-ambiental) (DE ROSA *et al.*, 2008, KLANG *et al.*, 2013).

O emprego da técnica de MET possibilita a análise morfológica dos lipossomas. As análises realizadas por MET objetivam a caracterização destes nanossistemas mediante a avaliação de parâmetros como lamelaridade e diâmetro, bem como a observação de alterações relacionadas aos fenômenos de agregação e fusão das partículas (KUNTSCHE *et al.*, 2011).

A principal vantagem relacionada ao emprego de MET é sua elevada resolução que possibilita a análise de detalhes estruturais de lipossomas. Além disto, é um método relativamente rápido para visualização de vesículas (BIBI *et al.*, 2011). A técnica de MET apresenta a vantagem de possibilitar a visualização e a avaliação das partículas individualmente. Considerando-se o limite de resolução por MET como cerca de 0,2 nm (BIBI *et al.*, 2011), no caso de lipossomas LUV cujo diâmetro médio encontra-se em torno de 50-200 nm, pode-se analisar a lamelaridade destas vesículas, cuja bicamada apresenta espessura de cerca de 5 nm.

Entretanto, na análise de lipossomas por MET, o processo de desidratação durante o preparo da amostra pode causar o encolhimento da partícula e distorção no tamanho e o pré-tratamento da amostra com corantes específicos pode gerar artefatos e causar alterações na estrutura original vesicular. As manchas dos próprios corantes podem também levar à formação de franjas claras e escuras que podem ser interpretadas como estruturas lamelares na amostra a ser analisada. Além disto, o alto vácuo e o bombardeamento de elétrons, característicos em MET, também podem causar alterações na morfologia dos lipossomas (BIBI *et al.*, 2011).

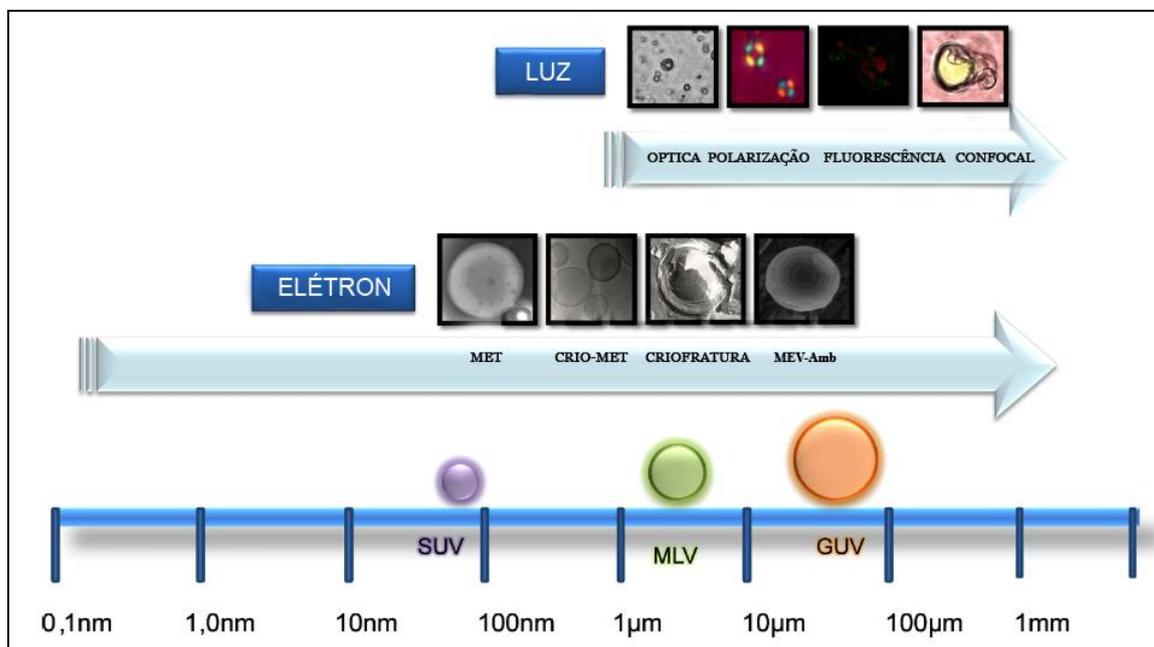


Figura 8 – Exemplos de técnicas de microscopia que podem ser empregadas na análise morfológica de lipossomas de diferentes diâmetros (Adaptado de BIBI *et al.*, 2011).

A MEV-ambiental é uma técnica de microscopia eletrônica que permite a observação de amostras hidratadas em seu estado natural. De modo conveniente, esta técnica não requer o recobrimento das amostras com uma camada condutora, como geralmente faz-se necessário em análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) convencionais (KLANG *et al.*, 2013).

A análise de lipossomas por MEV não é comumente empregada. Entretanto, pós de lipossomas liofilizados podem ser visualizados por esta técnica para obter informações do diâmetro da vesícula no líofilo (PEER *et al.*, 2003). O uso de microscópios modernos (*Field-emission gun scanning electron microscope* - FEG-SEM) os quais utilizam elétrons de baixa energia, que permitem manter a resolução de 1,4 nm mesmo na faixa de 1 keV (KLANG *et al.*, 2013).

2.5.5 Teor e eficiência de encapsulação

O teor e a eficiência de encapsulação de uma substância em lipossomas são dois parâmetros importantes que devem ser considerados na escolha do método de preparação, sobretudo quando se procura desenvolver uma formulação farmacêutica. Estes parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana. É importante a obtenção de altos teores de encapsulação, particularmente quando o fármaco possui doses elevadas ou quando não é possível o reaproveitamento do fármaco não encapsulado. A relação fármaco/lípide também deverá ser maximizada, visto que determina a quantidade de lípide a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lípide veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (SWARBRICK; BOYLAN, 1994; FRÉZARD *et al.*, 2005).

Aumentar o volume encapsulado nos lipossomas é uma medida importante para aumentar a razão fármaco/lípide. Eficientes métodos que buscam melhorar essa razão incluem o método de desidratação/reidratação (DRV) e o método de evaporação em fase reversa (REV). Em outros casos, a encapsulação pode ser feita em temperaturas elevadas para aumentar a solubilidade do fármaco a ser encapsulado (BARENHOLZ, 2003).

2.6 Estabilidade dos lipossomas e do fármaco encapsulado

Para funcionar efetivamente como um carreador de fármacos, é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável. Estes podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante o armazenamento. As mudanças físicas podem ocorrer nas vesículas fosfolipídicas, incluindo agregação e fusão. Já as mudanças químicas incluem hidrólise das ligações éster dos fosfolípides em dispersões aquosas de lipossomas e oxidação dos fosfolípides que contêm ácidos graxos insaturados, bem como a oxidação do colesterol. Todas estas transformações podem causar a perda do material encapsulado (CHOW; HEATH, 1995). As instabilidades físicas também podem ser provocadas durante as transições de fase dos lípides; entretanto, a inclusão de colesterol ou derivados nas bicamadas pode reduzir ou erradicar estes fenômenos de transição (McMULLEN *et al.*, 1993).

2.6.1 Estabilidade física

A estabilidade física de lipossomas pode ser entendida como um tipo de estabilidade coloidal. Um dos aspectos mais importantes desta estabilidade é a mudança do tamanho das partículas e de sua distribuição. No caso de lipossomas, agregação e fusão são as principais fontes de instabilidade. Agregação de lipossomas neutros é causada por interações de Van der Waals, e tende a ser mais pronunciada em vesículas grandes. Embora fatores como resíduos de solventes e traços de resíduos metálicos possam potencializar este processo, a formação de agregados de lipossomas é um fenômeno natural e inevitável para membranas sem carga. A maneira mais simples de contornar esta situação é utilizar lípides carregados na formulação (NEW, 1990; SCHNITZER *et al.*, 2007; MOSCA *et al.*, 2011).

A fusão dos lipossomas corresponde à reorganização da membrana com relocação das moléculas lipídicas entre as bicamadas lipídicas adjacentes, que corresponde a formação de novas estruturas coloidais. É um processo irreversível e a estrutura original dos lipossomas é definitivamente perdida (HEURTAULT, 2003). Casals e colaboradores (2003) afirmam que a presença de 25 % de lípides carregados confere uma suficiente estabilidade eletrostática que evita a agregação e fusão de vesículas por um período de 3 meses, a 4° C. Outra forma de aumentar a estabilidade dos lipossomas é revesti-los com polímeros hidrofílicos não-iônicos, como o PEG, o que leva ao aparecimento da repulsão de hidratação caracterizada pela presença de uma barreira estérica que impede a aproximação das vesículas (ULRICH, 2002).

2.6.2 Estabilidade química

Muitas dispersões de fosfolípides contêm lípidos insaturados (cadeias acila) como parte de sua estrutura molecular. Os lípidos insaturados sofrem degradação oxidativa ou peroxidação lipídica. Estas reações podem ocorrer durante a preparação, o armazenamento ou no momento do uso. A peroxidação é um processo complexo envolvendo reações radiculares que resultam na formação de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos (Figura 9). Esta degradação oxidativa acontece rapidamente se os lípidos insaturados não forem protegidos durante a preparação e o armazenamento. Devem ser protegidos pela manutenção em atmosfera de gás inerte, como nitrogênio ou argônio; pela remoção de metais pesados (adição de agentes quelantes, como por exemplo, o EDTA) ou pela adição de antioxidantes, como alfa-tocoferol ou butilhidroxitolueno (VAN WINDEN *et al.*, 1998; SCHNITZER *et al.*, 2007; MOSCA *et al.*, 2011).

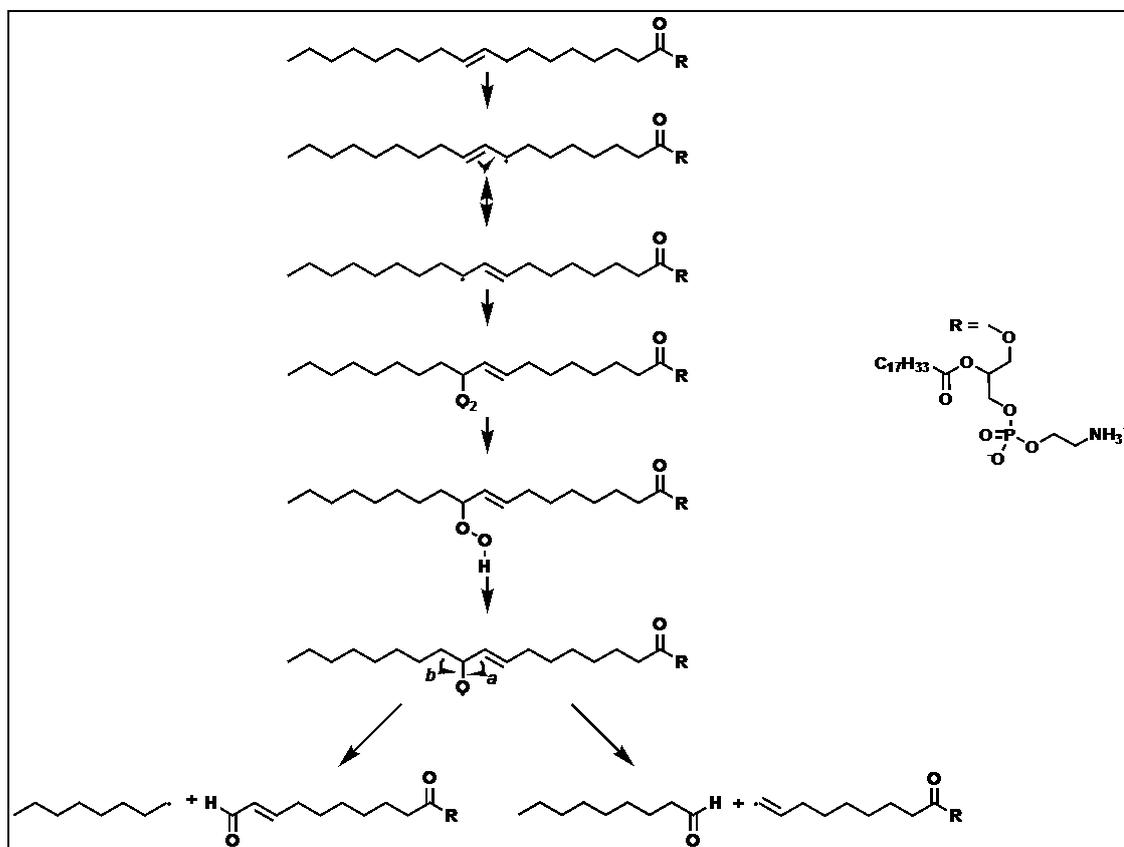


Figura 9 – Reação de oxidação da molécula de DOPE.

A hidrólise das ligações ésteres, resultando na formação de ácidos graxos livres, lisofosfolípides e glicerofosfocompostos, pode influenciar a estabilidade de longo prazo dos lipossomas (Figura 10). A hidrólise pode ser catalisada por ácidos ou bases, e devido à relativa estabilidade dos fosfoésteres quando comparado aos carbonil-ésteres, este processo é iniciado tanto na posição 2 do grupo acila quanto na posição 1, resultando na formação de ácidos graxos livres e lisofosfolípides, que eventualmente são hidrolisados a ácidos graxos e fosfogliceróis. Estes produtos de reação podem alterar a rigidez da bicamada lipossomal, a retenção do material encapsulado e o diâmetro das vesículas e, portanto, devem ser mantidos em níveis mínimos (VEMURI; RHODES, 1995). Foi demonstrado que, em lipossomas, aumentos acima de 10 % (concentração molar) dos produtos de hidrólise levam a uma permeabilidade aumentada da bicamada lipídica e à desestabilização do sistema. Além disto, os ácidos graxos livres contribuem com o processo pelo aumento da fusão das vesículas ou auxiliam na formação de micelas, dependendo da composição (RABINOVICH-GUILLAT *et al.*, 2005).

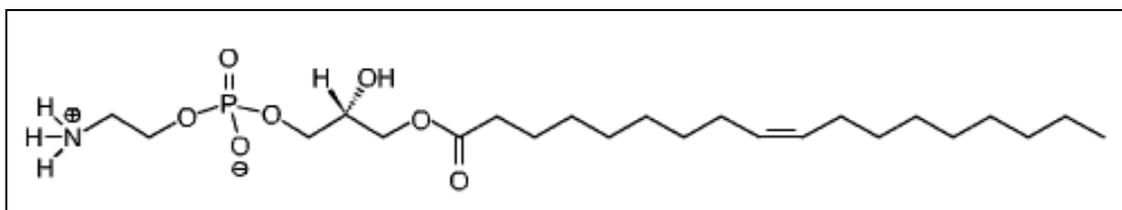


Figura 10 – Estrutura química do lisofosfolípide 1-oleil 2-hidroxi glicero-3-fosfoetanolamina.

2.6.3 Hidrólise da CDDP

Em solução aquosa, os átomos de cloro da CDDP são facilmente substituídos por ligantes “aquo” (Figura 11), originando espécies mais reativas. Parte destes ligantes podem ser desprotonados a “hidroxo” ligantes, que ocasiona uma diminuição da reatividade do complexo (JAKUPEC *et al.*, 2003). Visando a manutenção da integridade da molécula do fármaco, a solução de CDDP deve conter, no mínimo, NaCl 0,2 % p/v (THOMPSON, 2006).

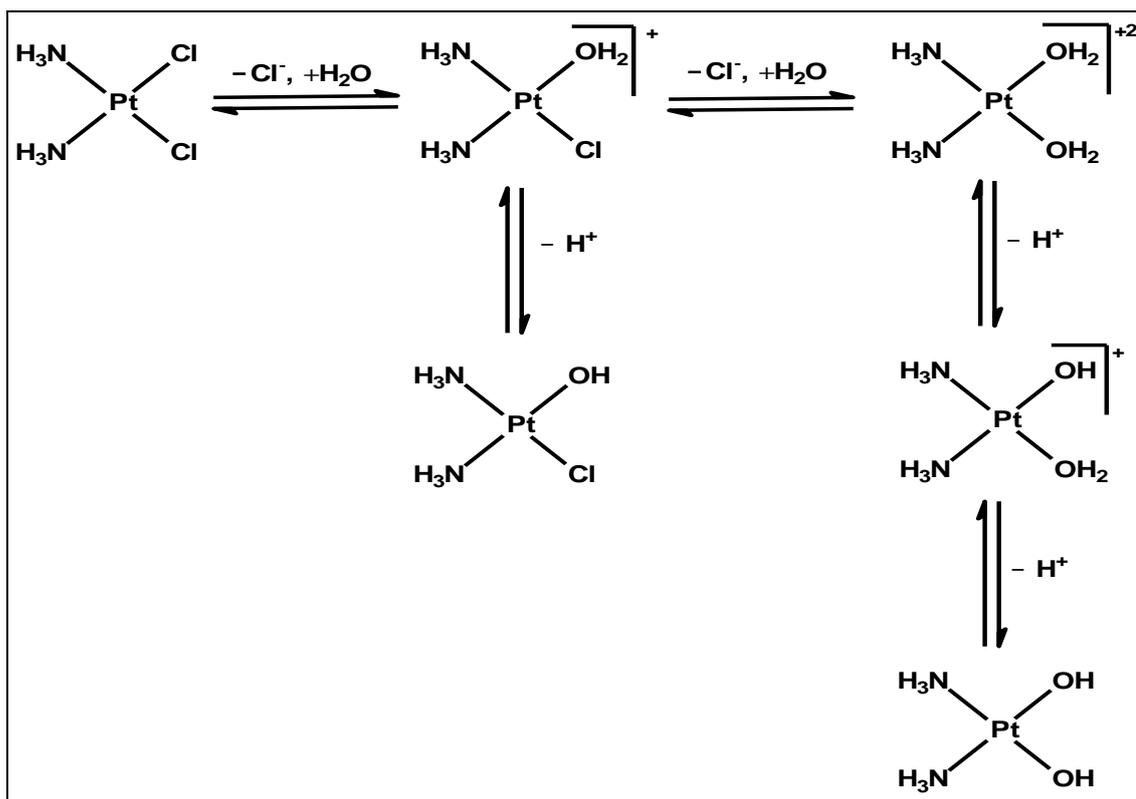


Figura 11 – CDDP e seus produtos de hidrólise.

2.7 Liofilização

Com o objetivo de aumentar a estabilidade física e química dos lipossomas, o processo de liofilização tem sido utilizado, aumentando desta forma a vida de prateleira das formulações lipossomais (YANG *et al.*, 2006). Em relação à estabilidade desta forma farmacêutica, a utilização de uma dispersão aquosa como um produto comercial é questionável. Em contraste, uma preparação “seca” para ser hidratada imediatamente antes da sua utilização pode evitar muitos problemas associados à dispersão lipossomal líquida. O processo pode ser aplicado sobre os lípidos ou sobre os lipossomas propriamente ditos (PAYNE *et al.*, 1986). Os nanossistemas liofilizados devem apresentar características, tais como: a) preservação das propriedades físicas e químicas primárias do produto (aparência elegante do pó liofilizado; tempo de reconstituição curto; ausência ou presença mínima de alterações do diâmetro, da distribuição das vesículas, da atividade e do teor do fármaco encapsulado); b) teor de umidade aceitável e c) estabilidade de armazenamento (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

Poucas tecnologias de secagem estão disponíveis para a estabilização de lipossomas, a saber: liofilização, *spray-drying*, *spray-freeze-drying* e fluido supercrítico. As três últimas

técnicas citadas são também utilizadas para conferir propriedades funcionais, como tamanho de partícula bem definido e densidade da partícula, nas formulações secas de lipossomas (INGVARSSON *et al.*, 2011; SKALKO-BASNET *et al.*, 2000; BI *et al.*, 2008; KOMPELLA *et al.*, 2001).

A liofilização é a técnica mais usada na secagem de dispersões lipossomais, consistindo em um complexo processo de secagem empregado na conversão de soluções e/ou dispersões de produtos lábeis em sólidos com estabilidade adequada para o armazenamento e distribuição (FRANKS, 1998). O processo de liofilização envolve três estágios: congelamento, secagem primária e secagem secundária (MOHAMMED *et al.*, 2006; AULTON, 2005). A fase do congelamento é uma etapa de resfriamento na qual a maioria do solvente é separada dos lipossomas e adjuvantes, resultando na formação de gelo. A secagem primária é iniciada quando a pressão da câmara do liofilizador é reduzida e a temperatura da prateleira do liofilizador é aumentada para fornecer uma quantidade suficiente de calor para a sublimação da água da dispersão lipossomal. Durante a secagem secundária, a água é desessorvida da formulação congelada a uma temperatura mais elevada e baixa pressão. (TANG; PIKAL, 2004).

Formulações liofilizadas geralmente são formulações complexas, contendo a substância ativa e excipientes (adjuvantes). Por exemplo, uma formulação lipossomal liofilizada pode conter fosfolípides, crioprotetores, agentes de volume, tampões, isotonzantes, além da substância ativa. O estado físico do excipiente é crítico na determinação de sua funcionalidade. A desejada "função específica no estado sólido" do excipiente dá-se por uma complexa interação das condições do processo e da composição do produto. Enquanto agentes de volume, como o manitol e a glicina, são desejados em sua forma cristalina, tampões e estabilizantes são preferidos em suas formas amorfas (SUNDARAMURTHI; SURYANARAYANAN, 2012).

A natureza cristalina do manitol, associada a sua elevada temperatura eutética (T_{eu}) (-1,5°C), permitem que a secagem primária seja realizada em temperaturas mais altas e levam a um eficiente ciclo de liofilização. Além disto, o manitol está presente totalmente na forma cristalina no líofilo final, o que leva a teores de umidade residual muito baixos (SUNDARAMURTHI; SURYANARAYANAN 2012). A presença de substâncias tamponantes no estado amorfo inibem a precipitação destes sais durante o congelamento e conduzem o processo de crioconcentração bem acima do limite de solubilidade, evitando mudanças bruscas de pH (FRANKS, 1998). A forma amorfa é preferida aos estabilizantes

crioprotetores devido às propriedades de formação de uma matriz vítrea nas quais vesículas lipossomais estão firmemente inseridas no liófilo (STARK *et al.*, 2010).

Enquanto o estado físico dos solutos, no estado congelado, influencia as condições de secagem primária e secundária, o estado físico no produto liofilizado (liófilo) pode influenciar a estabilidade de prateleira e o desempenho do produto. Se o soluto cristaliza como um hidrato na solução congelada, não está garantida a sua conservação no estado cristalino no liófilo. Durante a secagem, o hidrato pode ser desidratado gerando uma forma semicristalina ou amorfa. A existência de uma substância ativa na forma cristalina no liófilo pode aumentar a estabilidade química. Entretanto, espera-se que um tempo de reconstituição (perfil de dissolução) maior da substância ativa na forma cristalina do que na forma amorfa (SUNDARAMURTHI; SURYANARAYANAN 2012). De modo geral, a cristalização de formas amorfas pode aumentar a estabilidade durante o armazenamento, mas a solubilidade pode ser comprometida (LIU, 2006).

2.7.1 Parâmetros do processo de liofilização

Apesar de a liofilização aumentar o tempo de prateleira dos produtos lipossomais, os estresses impostos durante as etapas do processo podem levar à ruptura da estrutura das vesículas. O congelamento pode induzir a fatores de estresse, como o aumento da concentração de lipossomas, que pode resultar em agregação e fusão; ruptura da estrutura lipossomal, devido à interface líquido-gelo; e separação de fases, resultando em segregação dos lipossomas e dos estabilizantes. Estes fatores de estresse podem ser diminuídos, em grande parte, pela otimização dos parâmetros do processo de liofilização como taxa de congelamento, temperatura de congelamento e tempo do processo (TANG;PIKAL, 2004).

A etapa de congelamento tem grande importância na liofilização, pois esta etapa define a morfologia dos cristais de gelo e sua distribuição de tamanho, o que influencia em muitos parâmetros críticos da liofilização. Por exemplo, o método de congelamento tem sido relacionado à agregação de proteínas, taxa de secagem primária, taxa de secagem secundária, extensão da cristalização do produto e área superficial do produto liofilizado (SEARLES *et al.*, 2001a).

A taxa de congelamento rápido geralmente resulta na formação de cristais de gelo finos e em uma estrutura altamente ordenada, que podem reduzir a ruptura da estrutura da bicamada lipídica. Entretanto, leva a uma velocidade de sublimação relativamente lenta durante a secagem primária (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Geralmente, o congelamento

rápido é conduzido pela submersão das amostras em nitrogênio líquido e a criocongelamento é diminuída, e deste modo, o crioprotetor é uniformemente disperso durante a liofilização.

Em contraste, o congelamento lento produz cristais de gelo maiores que são deletérios para a integridade da membrana, resultando em uma estrutura desordenada e área superficial reduzida do líófilo, mas com uma velocidade de sublimação relativa alta durante a secagem primária (CHEN *et al.*, 2010). Uma taxa de congelamento lento pode ser benéfica por evitar o extravasamento do material encapsulado dos lipossomas durante o processo de liofilização devido à redução da pressão osmótica causada pela geração de criocongelado. Em uma razão de congelamento lento, a água pode difundir lentamente através da membrana até atingir um equilíbrio entre o compartimento aquoso interno e o meio aquoso externo quando a solução aquosa externa se transforma num criocongelado. Portanto, a formação de cristais de gelo no compartimento aquoso interno é reduzida (VAN WINDEN *et al.*, 1997).

A temperatura de congelamento na primeira etapa da liofilização influencia, em combinação com a taxa de resfriamento, na taxa de nucleação do gelo, crescimento do cristal e na morfologia do líófilo, que por sua vez afeta a taxa de sublimação. A etapa de congelamento é uma etapa crítica porque influencia o tamanho do cristal de gelo e, conseqüentemente, as etapas de secagem subsequentes. Na secagem primária, o tamanho do cristal de gelo tem que ser grande para obter o tempo de sublimação mais curto possível. Porém para a secagem secundária, os cristais de gelo devem ser menores para oferecer uma área superficial específica grande da matriz seca a fim de melhorar a dessorção da água não congelada a partir da superfície porosa da matriz amorfa (KASPER; FRIESS, 2011).

Com o interesse de eliminar a heterogeneidade durante o crescimento dos cristais de gelo, Ceares e colaboradores (2001b), sugeriram a incorporação de um tratamento térmico (*annealing*) durante o processo de congelamento da amostra. O *annealing* é um passo do processo em que a amostra é mantida em uma temperatura específica, abaixo da temperatura de equilíbrio do congelamento, por um período de tempo definido (SEARLES *et al.*, 2001b; ABDELWAHED *et al.*, 2006).

A temperatura de *annealing* deve estar situada entre a temperatura de transição vítrea da solução concentrada máxima (T_g') da fase amorfa e a temperatura eutética (T_{eu}) do agente de volume para proporcionar uma elevada taxa de cristalização e garantir a cristalização completa (TANG; PIKAL, 2004). O *annealing* em temperaturas abaixo da T_g' leva ao crescimento dos cristais de gelo, maximiza a cristalização da água que foi aprisionada na matriz vítrea durante a etapa de congelamento. O tratamento de *annealing* logo após a etapa

de resfriamento, durante algumas horas, feito por aquecimento do produto geralmente confere uma certa homogeneidade na distribuição de tamanho dos cristais de gelo. Quando o tratamento térmico é capaz de uniformizar o tamanho dos cristais de gelo, o *annealing* conduz a uma secagem primária com tempo reduzido e um líofilo de fácil reidratação (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

2.7.2 Temperaturas críticas do processo de liofilização

A estrutura hexagonal do gelo é de grande importância na liofilização de formulações farmacêuticas, já que a maioria dos solutos não pode se inserir na estrutura densa formada pelo gelo na forma hexagonal. Consequentemente, a concentração dos solutos da formulação é aumentada na região intersticial dos cristais de gelo, o que é denominado de “crioconcentração”. A concentração total dos solutos aumenta rapidamente em função apenas da temperatura e é independente da concentração inicial. Durante o resfriamento, a solução aumentará para uma concentração crítica, acima da qual a solução concentrada atingirá o congelamento eutético ou a vitrificação.

Uma mistura eutética é formada pela simples cristalização dos solutos na solução crioconcentrada. Por exemplo, manitol, NaCl e tampão fosfato cristalizam em consequência do congelamento. A menor temperatura na qual o soluto mantém-se dissolvido é a *Teu* (KASPER; FRIESS, 2011). O comportamento de fases é extremamente diferente para compostos poliidroxilados, como a sacarose, que não cristaliza completamente durante o resfriamento de uma solução. Neste caso, a água continua a congelar abaixo da *Teu* e a solução torna-se cada vez mais supersaturada e viscosa. O aumento da viscosidade desacelera a cristalização da água até que a uma temperatura característica não ocorra mais o congelamento e este fenômeno é denominado vitrificação. A temperatura de transição vítrea da solução concentrada máxima (crioconcentrado) é convencionalmente designada como Tg' . Tg' depende da composição da solução, mas é independente da concentração inicial (KASPER; FRIESS, 2011).

Um fator de caracterização importante no processo de liofilização é Tg' do produto. Durante a liofilização, a temperatura do produto não deverá ultrapassar a Tg' , pois de outro modo, a água presente no material apresentará viscosidade suficiente para desencadear reações físicas e químicas. Sob temperaturas abaixo da Tg' , a matriz do soluto assemelha-se a um vidro, comportando-se como um sólido amorfo. Em uma liofilização, se a temperatura de congelamento ultrapassar a Tg' , a solução amorfa concentrada ficará menos viscosa,

ocorrendo o colapso do produto. A temperatura de colapso macroscópico da formulação (T_c) é a temperatura acima da qual o produto liofilizado perde sua estrutura macroscópica e colapsa durante a liofilização. T_c é usualmente 2°C maior do que a T_g' , que frequentemente é associada à T_g' para substâncias amorfas, ou à T_{eu} para substâncias cristalinas. Para a produção de um produto liofilizado aceitável, deve-se liofilizar a amostra em uma temperatura abaixo da T_c (TANG; PIKAL, 2004).

A contração ou colapso do líófilo pode comprometer os atributos de qualidade do produto como, por exemplo, a estabilidade física, o conteúdo de umidade residual e o tempo de reconstituição (YANG *et al.*, 2010). Um aumento na temperatura do produto acima da temperatura de colapso resulta em um “fluxo viscoso” e conseqüentemente, na perda da estrutura porosa. Esse líófilo é frequentemente rejeitado devido à falta de elegância. Portanto, o efeito econômico de colapso excessivo pode ser a rejeição de todo o lote do produto. Além disto, o produto colapsado tem menor área superficial e conseqüentemente, uma secagem secundária mais lenta, que resulta em elevado teor de umidade residual e em aumento do tempo de reconstituição. Ainda, o alto teor de umidade residual decorrente do colapso pode afetar a estabilidade do produto (PATEL; DOEN; PIKAL, 2010).

A temperatura crítica da formulação pode ser determinada tanto por microscopia acoplada à liofilização (FDM) ou por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e esta temperatura é denominada como T_c , na FDM ou T_g' , nos experimentos de DSC. Entretanto, tem sido relatado na literatura que a T_g' não é necessariamente representativa do processo de sublimação em um frasco durante a liofilização. Neste contexto, a FDM tem se tornado o método de escolha para medidas de temperatura crítica (MEISTER *et al.*, 2009).

A temperatura de nucleação (T_n) é determinada usando a primeira imagem gravada ilustrando uma estrutura congelada da amostra. A temperatura de microcolapso ou colapso parcial ($T_{\mu c}$) é definida como a temperatura na qual ocorre uma perda local da estrutura e corresponde ao início do evento. Na $T_{\mu c}$, as primeiras lacunas ou fissuras são visíveis e estão adjacentes à interface de sublimação. A extensão da perda estrutural na camada seca continua a crescer com o aumento da temperatura resultando em perda total da estrutura, ou seja, nenhuma conexão entre a camada seca e a interface de sublimação pode ser determinada. A temperatura do início do colapso total é definida como T_c . Vale ressaltar que a diferença de temperatura da transição do microcolapso para o colapso total é geralmente menor que 1°C (PATEL; DOEN; PIKAL, 2010; MEISTER *et al.*, 2009).

Dentre as três etapas da liofilização, a secagem primária é a etapa mais longa e, portanto, a otimização desta etapa é o foco da indústria (PATEL; DOEN; PIKAL, 2010).

Portanto, é necessário determinar o fim da secagem primária para dar continuidade ao processo. Frequentemente, o ponto final da secagem primária é determinado por termopares, porém frascos contendo sensores de temperatura não são representativos de todo o lote. Uma técnica bastante utilizada, baseada na composição do gás presente na câmara do liofilizador, é o monitor do ponto de orvalho ou temperatura de orvalho (*Dew point*), que consiste num sensor eletrônico de umidade (PATEL; DOEN; PIKAL, 2010).

A temperatura de orvalho é a temperatura na qual uma dada mistura de ar-vapor de água é saturada, isto é, a temperatura na qual a pressão parcial real do vapor de água corresponde ao valor de pressão de saturação. Como é a temperatura na qual ocorre condensação do vapor de água existente no ar, ela representa a temperatura mínima que a mistura pode sofrer de resfriamento sem haver a condensação de umidade, o chamado orvalho (PATEL; DOEN; PIKAL, 2010).

2.7.3 Otimização do processo de liofilização

A pressão da câmara e a temperatura da placa (ou prateleira) têm sido bem estudadas como os principais fatores do processo de liofilização que podem melhorar a razão de sublimação. Entretanto, estes fatores devem ser bem ajustados a fim de evitar o sobreaquecimento do produto e seu colapso (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

A secagem primária é conduzida sob pressão reduzida para beneficiar a taxa de sublimação do gelo. A pressão da câmara influencia tanto na transferência de calor quanto de massa e é um importante parâmetro para o planejamento do processo de liofilização. A pressão da câmara deve estar abaixo da pressão de vapor do gelo para permitir uma elevada taxa de sublimação (TANG;PIKAL, 2004).

A taxa de sublimação é proporcional à diferença de pressão entre a pressão de vapor do gelo e a pressão parcial da água na câmara, sendo essa diferença a força motriz para a sublimação do gelo. Tem sido relatado que uma pressão da câmara moderada (100-150 mTorr) concede uma transferência de calor homogênea entre os frascos. Portanto, uma pressão ótima na câmara é um compromisso entre uma taxa de sublimação alta e uma transferência homogênea de calor (TANG;PIKAL, 2004).

O condensador é uma peça indispensável para a retirada de água do produto em uma liofilização. Com a formação de vapor de água, há um aumento da pressão na câmara de secagem, o que paralisaria a sublimação. O condensador é responsável pela captura do vapor d'água do sistema para que a sublimação de todo o cristal de gelo presente no produto ocorra

e a condição de não equilíbrio do sistema se mantenha. Ao sublimarem, as moléculas de água utilizam calor latente de sublimação, de forma que a temperatura do produto congelado reduzirá ainda mais. Caso não haja fornecimento de calor ao sistema, a pressão de vapor da água no produto se iguala à pressão parcial do vapor de água na câmara, fazendo com que o sistema entre em equilíbrio e que a sublimação cesse. Para que isto não ocorra, durante a liofilização, o fornecimento de calor ao sistema é feito através da placa do liofilizador (TANG; PIKAL, 2004).

A temperatura do produto durante a secagem primária é geralmente de 5 a 40°C menor do que a temperatura da placa. Em uma pressão da câmara e temperatura da placa constantes, a temperatura do produto muda ao longo do processo, frequentemente aumentando 1 a 3°C do início até o final da secagem primária. A temperatura do produto pode ser medida por diversos métodos, incluindo termopares.

O colapso pode ser evitado usando um excesso de agente de volume (ex.: manitol ou glicina). A formulação com um agente crioprotetor (amorfo) e um agente de volume (cristalino) terá uma temperatura de colapso mais próxima da temperatura eutética do agente de volume, (Te glicina ou manitol aproximadamente -3°C), que é comumente muito maior do que a Tg' de muitos estabilizantes (Tg' da sacarose e trealose: aproximadamente -34°C) (TANG; PIKAL, 2004).

Além das variáveis do processo, os parâmetros de formulação tais como os tipos de crioprotetores e a composição lipídica da bicamada podem ser ainda mais críticos para a preservação da estabilidade dos lipossomas durante o processo de secagem, bem como durante o armazenamento.

2.8 Crioproteção

A liofilização gera vários estresses tanto na etapa de congelamento quanto na etapa de secagem (Figura 12), que frequentemente levam ao aumento significativo do tamanho das partículas devido à aglomeração destas. O congelamento é considerada a etapa mais agressiva ao sistema, mas substâncias crioprotetoras podem evitar estes danos. O estudo de congelamento-descongelamento é curto e rápido quando comparado ao processo de liofilização e, portanto, pode ser usado como um pré-teste para a seleção do tipo e concentração do crioprotetor a ser usado na liofilização. Este estudo é baseado no princípio de

que se o adjuvante não puder proteger os lipossomas durante o congelamento, tampouco este será efetivo nas outras etapas da liofilização (DATE *et al.*, 2010).

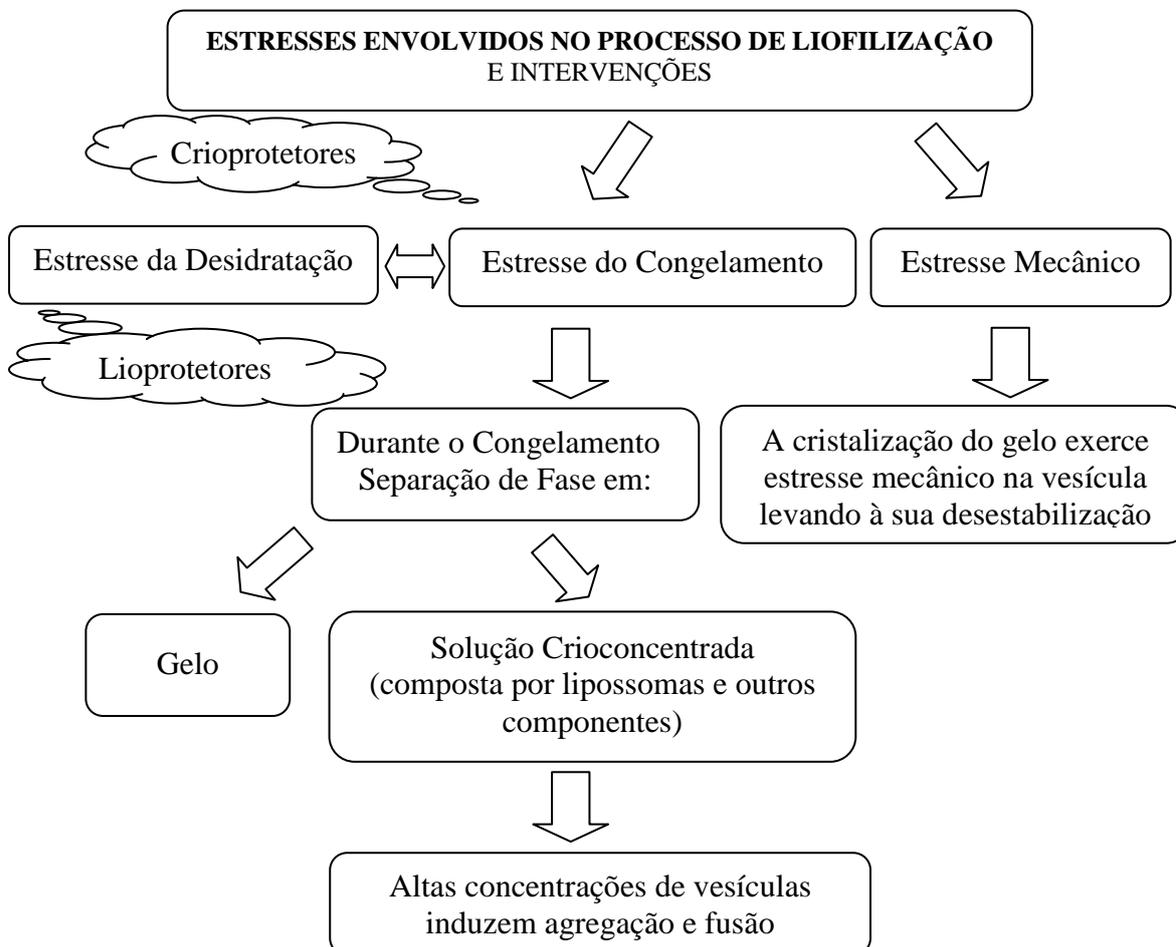


Figura 12 – Estresses envolvidos no processo de liofilização (Adaptado de Date *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente, a liofilização é bastante utilizada para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. Entretanto, tanto o congelamento quanto a secagem podem induzir a danos, resultando no aparecimento de fenômenos relacionados à agregação e/ou fusão das vesículas. Os lipossomas podem ter seu diâmetro alterado durante a liofilização e/ou durante a subsequente reidratação se estabilizantes apropriados não forem empregados (MOHAMMED *et al.*, 2006). Assim sendo, para promover estabilidade física durante o processo de liofilização, agentes crioprotetores como açúcares (por exemplo: sacarose, trealose e lactose) e seus derivados são utilizados. Aminoácidos também têm sido estudados quanto a sua capacidade crioprotetora (MOHAMMED *et al.*, 2007).

A partir da observação da capacidade de muitos organismos sobreviverem à completa desidratação, em estado de anidrobiose, os pesquisadores chegaram à descoberta de que esta sobrevivência é possibilitada pela presença de grande quantidade de dissacarídeos (particularmente sacarose e trealose) sintetizados durante o processo de perda de água. Se dispersões aquosas de lipossomas forem desidratadas na ausência de substâncias crioprotetoras, pode ocorrer a fusão dos lipossomas, a formação de agregados e a perda do material encapsulado durante a reidratação (Figura 13). Atualmente, o mecanismo exato dos carboidratos para a estabilização dos sistemas durante a liofilização continua a ser uma questão de debate. Entretanto, no campo da liofilização de lipossomas, duas hipóteses foram propostas: o modelo de reposição da água e o modelo da vitrificação. Estas teorias não são mutuamente exclusivas e ambas podem contribuir para o aumento da estabilidade durante a desidratação e armazenamento dos lipossomas (CHEN *et al.*, 2010; INGVARSSON *et al.*, 2011).

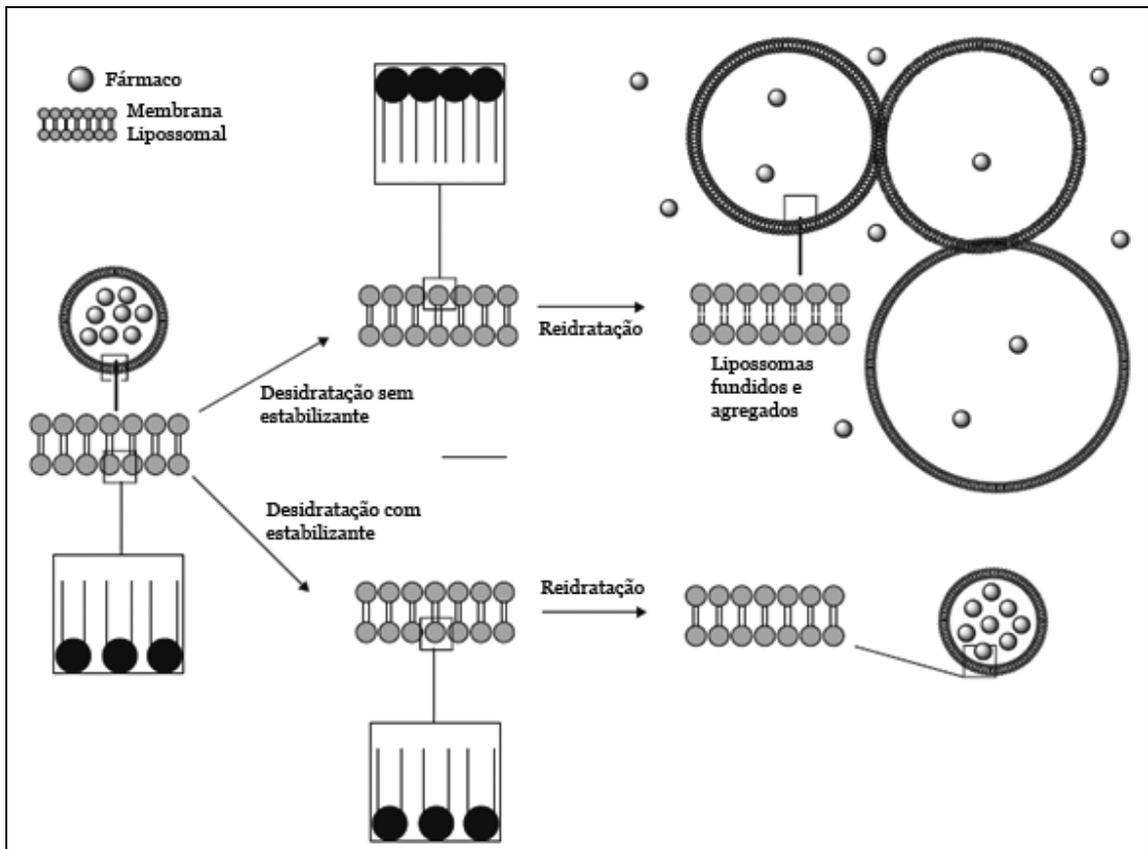


Figura 13 – Representação esquemática da estabilização de lipossomas durante a desidratação e reidratação, mostrando o espaçamento reduzido entre as porções polares dos lípidos durante a desidratação e fusão, agregação e perda do fármaco encapsulado durante a reidratação (Adaptado de INGVARSSON *et al.*, 2011).

A hipótese de substituição da água foi proposta por Crowe e colaboradores (1998), e nesta os carboidratos mantêm o espaçamento entre as porções polares dos fosfolípides e reduzem as interações de van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas destes (Figura 14). Estas interações entre os açúcares e os fosfolípides permitem a manutenção do estado físico das membranas no estado seco de forma similar à existente no estado hidratado. Deste modo, os carboidratos reduzem as interações entre a água e os fosfolípides e assim, substituem a água. As múltiplas ligações de hidrogênio entre os carboidratos e os lípides são formadas na superfície da bicamada e os carboidratos podem interagir com até 3 lípides simultaneamente. Tem sido proposto que estas interações açúcares/fosfolípides resultam na diminuição da temperatura de transição gel/líquido-cristalino do fosfolípide (T_m) no seu estado desidratado. Desta forma, esta transição de fase não ocorre durante o processo de desidratação/reidratação, evitando a perda do material encapsulado (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e de DSC demonstraram que a redução da temperatura da transição de fase gel/líquido-cristalino depende da razão de massa de açúcar:lípide.

A escolha do crioprotetor deve ser feita cuidadosamente a fim de que este promova uma efetiva estabilização do sistema. A razão crioprotetor/fosfolípide necessária dependerá tanto da formulação lipossomal quanto do tipo de crioprotetor usado. Dissacarídeos como sacarose, lactose e trealose são efetivos como crioprotetores e uma proteção ótima pode ser atingida quando presentes na concentração de 2 g açúcar/g de fosfolípide (MOHAMMED *et al.*, 2006).

Outro mecanismo de proteção é baseado no modelo da vitrificação (Figura 14 B). De acordo com este modelo, a manutenção da integridade da membrana lipídica na presença de açúcares está associada com a formação de uma matriz vítrea dos açúcares à temperatura ambiente. Esta matriz vítrea é amorfa, termodinamicamente instável e caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade molecular. A formação desta matriz vítrea evita a fusão da membrana lipídica, sendo isto importante para a manutenção do diâmetro das vesículas e a retenção do conteúdo encapsulado (CACELA; HINCHA, 2006; VAN WINDEN *et al.*, 1997; RICKER *et al.*, 2003). A matriz vítrea também protege as bicamadas lipídicas dos danos causados pelos cristais de gelo e inibe as mudanças conformacionais associadas às transições de fase dos lípides. Estas propriedades são altamente dependentes das habilidades do excipiente em formar a matriz vítrea, que é refletida pela T_g . Acima desta temperatura, a mobilidade das moléculas aumenta e a viscosidade diminui, levando à ruptura da matriz. Koster e colaboradores (1994) notaram que a T_g deve ser maior que a T_m nos filmes lipídicos

completamente hidratados para que os estabilizantes sejam eficazes na depressão da T_m dos lipossomas. Em misturas de trealose e lípides no estado seco, por exemplo, pode-se observar duas populações distintas de açúcar: uma interage diretamente com porções polares do fosfolípide (ocupando o lugar da água) e a outra população forma a matriz vítrea (CROWE *et al.*, 1987).

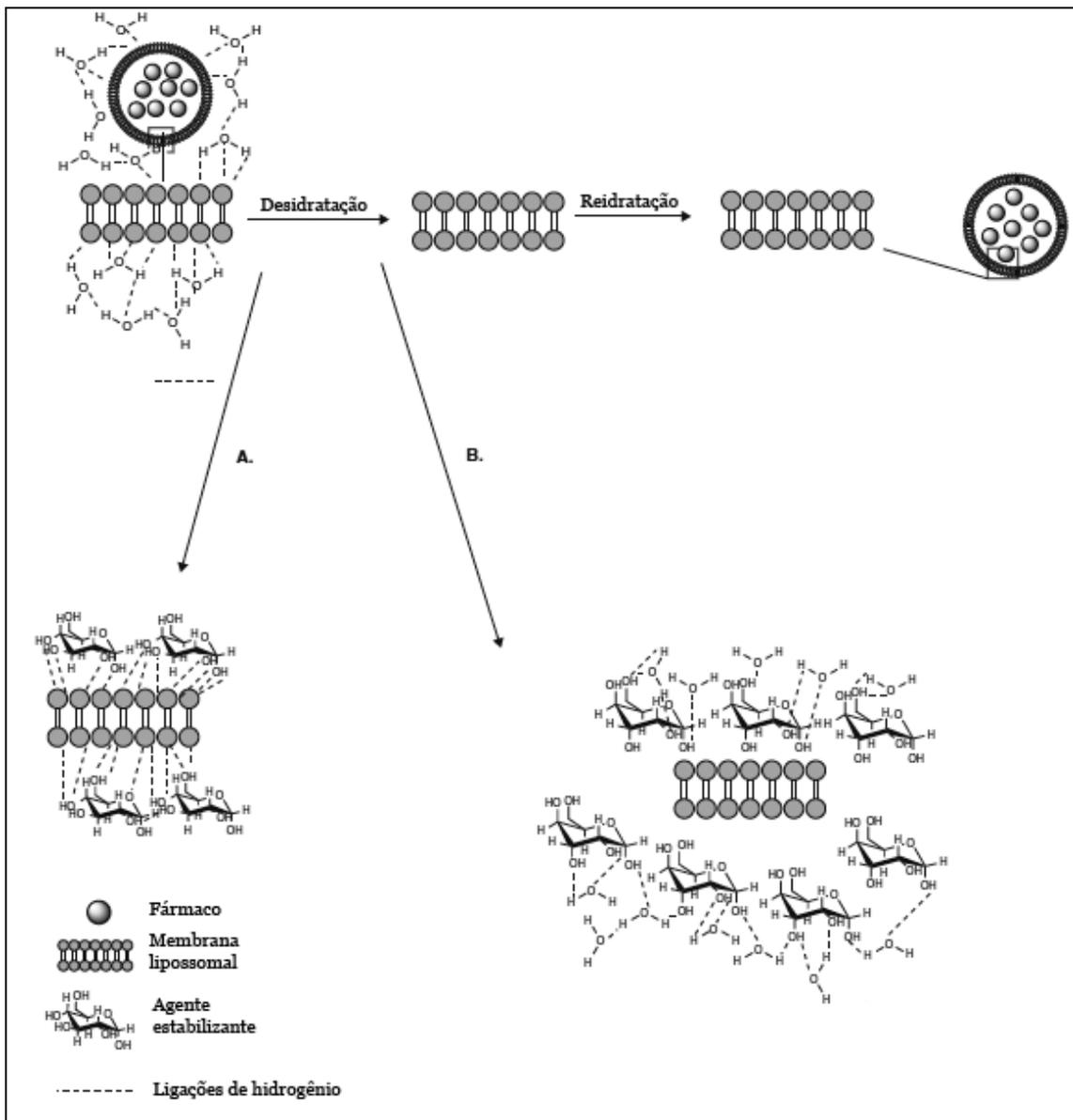


Figura 14 – Representação esquemática das teorias sobre o mecanismo de estabilização durante a desidratação e reidratação. A: Teoria de substituição da água. B: Teoria da vitrificação. Glicose é mostrada como exemplo do agente estabilizante. (Adaptado de INGVARSSON *et al.*, 2011).

De acordo com métodos calorimétricos e de difração de raios X, cerca de 18-24 moléculas de água, dependendo se os lípides estão estabilizados em vesículas grandes ou pequenas, contribuem para a espessura da bicamada e, portanto, para a barreira de permeabilidade. Luzardo e colaboradores (2000) descreveram a estrutura de hidratação da interface da bicamada lipídica, como sendo composta por 3 ou 4 moléculas de água, que são deslocadas por sacarose ou trealose de forma coligativa (isto é, por efeito osmótico); 7 moléculas de água fortemente ligadas às carbonilas que são deslocadas apenas por trealose; 7 moléculas de água muito fortemente ligadas aos fosfatos que podem ser substituídos por sacarose ou trealose se a desidratação for extremamente drástica, como no caso da liofilização. Os mecanismos de ação da sacarose e da trealose são diferentes, provavelmente devido à estereoquímica do grupos hidroxila nas posições equatorial e axial. Entretanto, sob condições drásticas, nas quais a água é completamente removida, os dois açúcares atuam de maneira semelhante.

Estudos feitos por Glavas-Dodov e colaboradores (2005) demonstraram que lipossomas de 5-fluorouracila (5-FU), liofilizados na ausência de substância crioprotetora, resultaram em aumento do diâmetro da partícula e em significativo extravasamento do fármaco encapsulado. Pela adição de sacarose como crioprotetor da formulação (razão crioprotetor:fosfolípide 1,3:1 p/p), não houve alteração do diâmetro médio dos lipossomas e a retenção da 5-FU encapsulada foi de aproximadamente 80 %, após o processo de liofilização/reidratação.

Lee e colaboradores (2009) estudaram o efeito de crioprotetores (sacarose, lactose, manitol e polietilenoglicol₂₀₀₀) sobre a redispersibilidade de nanosuspensões de naproxeno em função da taxa de resfriamento. Foram usadas concentrações de 5-40 % (p/p) de crioprotetores. Em geral, as concentrações mais elevadas de crioprotetores (25-40 %) e a taxa de congelamento mais rápida (nitrogênio líquido) formaram nanopartículas mais facilmente redispersíveis.

A hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) foi comparada com a sacarose e a trealose, quanto à sua capacidade lioprotetora, em um estudo de liofilização e secagem por atomização (*spray-drying*) de lipossomas peguizados contendo fosfato sódico de prednisolona. Em contraste aos dissacarídeos, HP- β -CD estabiliza a bicamada lipídica durante a secagem por ambos os métodos, quando presente na razão crioprotetor:fosfolípide 6:1 (p/p). Não houve alteração no diâmetro das vesículas e em sua distribuição após a reidratação das formulações

contendo HP- β -CD, como lioprotetor. Os processos de secagem resultaram em um extravasamento mínimo do fármaco (VAN DEN HOVEN *et al.*, 2012).

2.9 Métodos de preparação de lipossomas

A preparação de lipossomas envolve várias etapas como i) hidratação dos lípides levando à formação das vesículas, ii) a encapsulação do fármaco e iii) calibração das vesículas. Em alguns casos, as 3 etapas estão interligadas no processo produtivo. A remoção do fármaco não encapsulado é desejável, pois o fármaco livre poderá interferir na toxicidade e na estabilidade da formulação (VAN WINDEN *et al.*, 1998).

Os métodos para a produção de lipossomas incluem, dentre outros, o método de hidratação do filme lipídico (Bangham), injeção de solvente orgânico, evaporação em fase reversa (REV), método de desidratação-reidratação de vesículas (DRV) e congelamento-descongelamento (VAN WINDEN *et al.*, 1998; MEURE *et al.*, 2008). Para a redução do diâmetro das vesículas, métodos comumente utilizados incluem a sonicação, extrusão, microfluidização e homogeneização sob alta pressão (ULRICH, 2002). Métodos aplicados na remoção do material não encapsulado incluem a ultracentrifugação, cromatografia por exclusão de tamanho, diálise e ultrafiltração (EDWARDS, 2006).

2.9.1 Método da evaporação em fase reversa

Uma tentativa para resolver a reduzida encapsulação de substâncias hidrofílicas pelo método de hidratação do filme lipídico (Bangham), proposto em 1978 por Szoka e Papahadjopoulos, foi o método de evaporação em fase reversa para a produção de lipossomas unilamelares grandes. Nesta metodologia, os seguintes passos são seguidos, como ilustrado na figura 15:

1. Os fosfolípides são dissolvidos em solvente orgânico.
2. Uma porção aquosa é adicionada, ocorrendo a formação de duas fases. A tendência dos fosfolípides é a deposição na interface água/solvente orgânico, pelas interações de polaridade das extremidades polares com a água e pelas interações de apolaridade entre as cadeias hidrocarbonadas e o solvente orgânico.

3. A mistura é submetida à sonicação. Ocorre a formação de micelas reversas, em que gotículas de água são cercadas pelos fosfolípides; a mistura torna-se transparente ou opalescente, com aspecto homogêneo.
4. O solvente orgânico é evaporado e as micelas reversas se concentram.
5. Com a eliminação total do solvente orgânico, muitas micelas colapsam e ocorre a formação de um organogel de alta viscosidade.
6. Na etapa final, sob agitação, os lipossomas são formados e o sistema ganha o aspecto de um líquido leitoso.

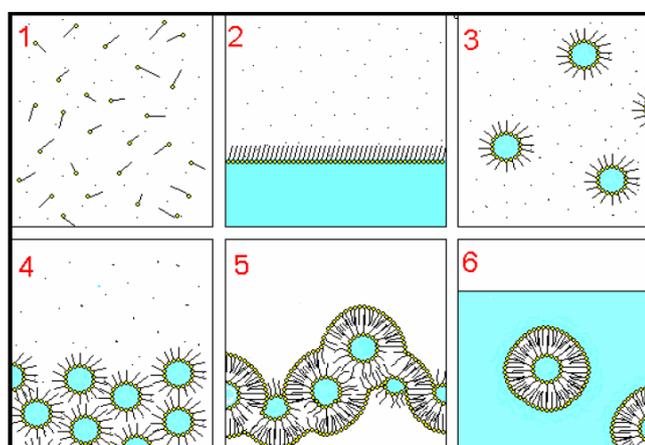


Figura 15 – Representação das etapas do método de evaporação em fase reversa.

Neste processo, substâncias hidrofílicas a serem encapsuladas nos lipossomas podem estar presentes na porção aquosa adicionada na etapa 2. É possível reter 30-45 % da fase aquosa dentro das vesículas (MEURE *et al.*, 2008).

2.9.2. Método da desidratação-reidratação (DRV)

Outro método aplicado à encapsulação de fármacos hidrofílicos é o método da desidratação-reidratação (DRV). Os lípides ou os lipossomas são liofilizados e em sequência, são reidratados com um pequeno volume de meio aquoso, levando à formação das vesículas. O fármaco a ser encapsulado pode estar presente tanto no líofilo quanto no meio de reidratação. Devido à alta concentração lipídica, uma alta porcentagem de volume é encapsulado e portanto, uma alta eficiência de encapsulação do fármaco é obtida (GREGORIADIS *et al.*, 1990; CASALS *et al.*, 1996).

2.10 Produção em escala piloto

Lotes em escala laboratorial são produzidos com a finalidade de pesquisa e início do estágio do desenvolvimento industrial, para dar suporte ao desenvolvimento da formulação e do acondicionamento, ou a estudos pré-clínicos e clínicos, e podem ser de tamanhos bem reduzidos, como por exemplo 100 a 1000 vezes menores que a produção em escala industrial (EMEA, 2001). À medida que os testes pré-clínicos e clínicos são realizados, o tamanho dos lotes de medicamentos são aumentados gradualmente (SKELLY, 2007).

O escalonamento é geralmente compreendido como a transferência do processo de fabricação da etapa de bancada para etapa de lote-piloto, e desta para lote industrial. Também pode ser visto como procedimento para aplicar o mesmo processo a diferentes volumes ou tamanhos de lotes, utilizando o mesmo princípio de funcionamento do equipamento (MORETTO; CALIXTO, 2009). Segundo a Instrução Normativa N°2 da ANVISA, de 30/03/2009, lote piloto é um lote de produto farmacêutico produzido por um processo representativo e reprodutivo de um lote de produção em escala industrial. O lote piloto pode ser produzido em equipamento industrial ou equipamento de capacidade reduzida e com o mesmo desenho e princípio de funcionamento do equipamento utilizado na produção do lote industrial.

Os lotes-piloto podem ser usados no processo de desenvolvimento ou de otimização, para dar suporte aos estudos de estabilidade ou também às avaliações pré-clínicas e clínicas, cujos tamanhos são estabelecidos por uma quantidade mínima equivalente a 10 % do lote industrial previsto, ou à quantidade equivalente à capacidade mínima do equipamento industrial a ser utilizado, ou a 100000 unidades de formas farmacêuticas sólidas, o que for maior (ANVISA, 2009).

Embora sejam promissoras as aplicações dos lipossomas como veículos para a liberação controlada de fármacos, o desenvolvimento de produtos lipossomais ainda é deficiente devido à carência de métodos de produção que sejam aplicáveis na indústria, atendendo às exigências de esterilidade, estabilidade e possibilidade de escalonamento, além da necessidade de serem reprodutíveis, simples e econômicos (WAGNER *et al.*, 2002). Após quase 5 décadas de pesquisa, alguns produtos farmacêuticos sob a forma lipossomal são efetivamente utilizadas no mercado, dentre eles estão DaunoXome®, Doxil®, Caelyx®, AmBisome® e Myocet® (TORCHILIN, 2007).

A produção de lipossomas ocorre em 3 etapas: a formação das vesículas lipídicas, a calibração do diâmetro e a purificação (remoção do material não encapsulado) dos lipossomas. A formação das vesículas lipídicas envolve a formação de uma estrutura lipídica intermediária e posterior hidratação desta estrutura. Os principais métodos escalonáveis nesta etapa são: evaporação do solvente sob pressão reduzida, atomização por *spray-drying*, desidratação-reidratação, microfluidização e injeção de etanol. A calibração do diâmetro dos lipossomas em grande escala é feita principalmente por processos mecânicos como o uso de extrusores de alta pressão, de microfluidizadores ou de homogeneizadores de alta pressão (BRANDL, 1998). Para a purificação dos lipossomas, poucos métodos são facilmente escalonados sem causar uma considerável perturbação na estrutura da vesícula. A separação pode ser feita em resina de troca iônica, por diálise e por ultrafiltração (VAN WINDEN *et al.*, 1998; AMSELEM *et al.*, 1990; VEMURI;RHODES, 1994).

O escalonamento de lipossomas depende dos seguintes fatores críticos: o desenvolvimento de um processo eficiente e adequado para a produção de lipossomas estéreis e livres de pirogênios em escala industrial; altos e reprodutíveis níveis de encapsulação do fármaco, com uma quantidade mínima de fármaco livre (não encapsulado) presente no produto final; e ainda, que a formulação dos lipossomas seja estável durante o armazenamento (AMSELEM *et al.*, 1990). O extenso interesse no uso de lipossomas como carreadores de fármacos exige procedimentos que atendam aos padrões farmacêuticos quanto à preparação e caracterização das vesículas. Procedimentos tecnológicos aceitáveis devem ser reprodutíveis em larga escala e economicamente viáveis. Vemuri e Rhodes (1995) também consideram que para a produção em larga escala de lipossomas, deve-se garantir a remoção de todo o solvente orgânico, a proteção dos fosfolípidos contra a oxidação, a remoção das endotoxinas, a remoção da droga livre (não encapsulada), o controle do tamanho das vesículas e a esterilização dos lipossomas.

Quando um sistema solvente for selecionado para um dado procedimento deve-se levar em consideração os limites de segurança, solubilidade e pureza do mesmo. Os resíduos de solventes na preparação acabada podem causar danos à saúde do paciente. Solventes como etanol e hidrocarbonetos podem levar à desestabilização dos lipossomas por interferirem nas interações cooperativas hidrofóbicas entre os grupos metileno dos fosfolípidos que mantêm a estrutura unida. Estudos de Vemuri e Rhodes (1995) demonstraram que quanto menor o lote e maior a temperatura do banho, menor será a quantidade de resíduo de clorofórmio no filme fosfolipídico. Estes estudos ainda sugerem que o tamanho do lote influencia mais na quantidade de resíduo de clorofórmio do que a temperatura do banho.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de lipossomas em escala laboratorial, entretanto a aplicação dos lipossomas como medicamentos ainda é dificultada pelos desafios de sua produção em larga escala (WAGNER; VORAUER-UHL, 2011; MEURE *et al.*, 2008). As vantagens e desvantagens relacionadas à transição da produção da escala laboratorial para a escala industrial dos principais métodos de preparação de lipossomas são resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas durante a produção em escala industrial*

Método convencional	Vantagens	Desvantagens
Bangham	Processo simples	Grande quantidade de solvente orgânico, requer agitação vigorosa, formação de dispersões heterogêneas com vesículas grandes, tempo de preparação longo, procedimento de esterilização complexo
Depleção de detergente	Processo simples, produto homogêneo, controle do diâmetro das vesículas	Grande quantidade de solvente orgânico, resíduo de detergente, tempo de preparação longo, baixa eficiência de encapsulação, baixo rendimento, procedimento de esterilização complexo
Injeção de etanol/éter	Processo simples	Resíduo de solvente orgânico, bloqueio do bico do sistema etéreo devido à pré-evaporação, tempo de preparação longo, procedimento de esterilização complexo
Evaporação em fase reversa	Design simples, eficiência de encapsulação razoável	Inadequado para a encapsulação de moléculas lábeis devido a grande quantidade de solvente orgânico, tempo de preparação longo, procedimento de esterilização complexo

Fonte: Adaptado de Meure *et al.*, 2008.

Métodos comumente utilizados para a preparação de lipossomas que podem ser utilizados no escalonamento incluem hidratação do filme lipídico, homogeneização sob alta pressão, injeção de solvente orgânico e uso de gradiente de pH. Amselem e colaboradores (1990) compararam cinco métodos de preparação de lipossomas por hidratação do filme lipídico. Para o escalonamento de lipossomas de doxorubicina, um fármaco anfifílico, foi escolhido o processo chamado hidratação lenta do filme lipídico delgado, constituído de fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol (concentração lipídica 35 mM, razão molar igual a 7:3:4, respectivamente). Após a hidratação do filme, foi realizada a extrusão em membranas de policarbonato de 0,4 e 0,2 µm. Lipossomas oligolamelares foram obtidos, de diâmetro compreendido entre 300-500 nm, com teor de encapsulação de 97 %. O diâmetro dos

lipossomas não sofreu alteração por um período de 5 meses, a 4° C. Este método mostrou-se o mais eficiente em termos de encapsulação do fármaco.

Outro método utilizado para o escalonamento de lipossomas foi a homogeneização sob alta pressão. Mesoporfirina de estanho, um inibidor competitivo da hemoxigenase, foi dissolvida em metanol. A esta solução foi adicionada fosfatidilcolina de ovo previamente dissolvida em uma mistura metanol:clorofórmio (9:1). O solvente foi evaporado em rotavapor sob pressão reduzida. Ao filme lipídico formado foi adicionada uma solução de lactose 0,05 M/tampão fosfato 0,004 M. Esta mistura foi então homogeneizada por 2 horas e após este período, submetida à microfluidização, a 60-80 psi. As vesículas obtidas apresentaram diâmetros menores de 200 nm e teor de encapsulação acima de 90 %. Os lipossomas de mesoporfirina de estanho foram esterilizados por filtração e liofilizados em um ciclo de um dia, com retenção do diâmetro das vesículas e manutenção do teor de encapsulação. A lactose foi utilizada por suas propriedades crioprotetoras e por sua aceitabilidade em formulações para uso parenteral (CANNON *et al.*, 1993).

Vemuri e Rhodes (1994) sugeriram a utilização do método de encapsulação por gradiente de pH seguido de diafiltração para o escalonamento de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de ovo:fosfatidilglicerol de ovo:colesterol contendo sulfato de orciprenalina (100 mg/mL). O filme lipídico foi hidratado com tampão fosfato contendo 5 % lactose, pH 4,5, e o fármaco foi dissolvido em tampão fosfato contendo 5 % de lactose, pH 9,5. Por este método, foram obtidos lipossomas unilamelares e oligolamelares, de diâmetro inferior a 200 nm e com teor de encapsulação de 80-85 %. O processo de liofilização não alterou o diâmetro das vesículas, porém reduziu a porcentagem de encapsulação em 15 %. O extravasamento do fármaco foi associado ao aumento do tamanho das vesículas, durante o armazenamento.

Para a produção em larga escala de lipossomas do tipo LUV pode-se utilizar o método da microfluidização, no qual a suspensão lipídica é forçada repetidamente sob alta pressão através de um pequeno orifício para colidir contra uma parede ou um fluido que venha em sua direção contrária. As desvantagens são a relativa alta polidispersividade da dispersão lipossomal, dificuldades em refinar o diâmetro das vesículas e algum risco de degradação da amostra (ULRICH, 2002).

Barnadas-Rodríguez e Sabés (2001) estudaram alguns fatores a fim de avaliar as características dos lipossomas obtidos em um microfluidizador. Fatores tais como a pressão, o tempo em que as amostras são processadas (ciclos), a força iônica, a concentração de fosfolípide e a quantidade de solvente orgânico (etanol) foram relacionados com o diâmetro

médio dos lipossomas e sua distribuição. Para minimizar o número de experimentos foi aplicado o design fatorial, como ferramenta de otimização do trabalho. Como as características das dispersões lipossomais determinam sua eficiência de encapsulação e aplicação, um conhecimento detalhado do processo de homogeneização pode facilitar a escolha das condições de trabalho para a obtenção de um tipo de lipossoma pré-determinado. Através da variação do número de ciclos (0-9) e da pressão empregada (1273-5092 Bar), os resultados mostram que o diâmetro sempre diminui com o aumento do número de ciclos e com o aumento da pressão. Entretanto, há um limite no número de ciclos empregado para um valor de pressão constante, a partir do qual, não ocorre mais a diminuição do diâmetro. Este valor constante foi atingido em todos os valores de pressão em aproximadamente sete ciclos. Em amostras homogeneizadas a aproximadamente 4000 Bar, por 7 ciclos, foram obtidos lipossomas de diâmetro igual a 109 nm.

Jefferis e colaboradores (2005) utilizaram o método da injeção de solvente seguida de ultrafiltração da preparação de lipossomas constituídos de colesterol: diestearoilfosfatidilcolina:dióleiloxidimetilaminopropano:diestearoilglicerometoxipoliétil enoglicol 2000 (concentração lipídica 20 mM, razão molar igual a 55:20:15:10, respectivamente para a encapsulação de plasmídeo de DNA em larga escala. Com este método foram obtidas vesículas de diâmetro inferior a 200 nm e teor de encapsulação acima de 80 %.

Para a obtenção de um produto de uso parenteral, lipossomas não podem ser esterilizados pela exposição a altas temperaturas, e também são sensíveis aos vários tipos de irradiação, bem como esterilização por agentes químicos. Logo, o método disponível para a esterilização é a filtração em membranas de 0,22 μm , para lipossomas menores que 200 nm. Para lipossomas maiores, o processo deve ser conduzido em condições assépticas (NEW, 1990). A melhor maneira de controlar os níveis de endotoxinas das preparações de lipossomas é a utilização de matéria-prima de alta qualidade com baixos níveis de endotoxinas e a condução do processo em condições assépticas com utensílios despirogenizados (VAN WINDEN *et al.*, 1998).

Na Tabela 1 são apresentados estudos de transposição de escala de produção de lipossomas descritos na literatura.

Tabela 1 – Estudos de transposição de escala para a produção de lipossomas

DROGA	COMPOSIÇÃO	MÉTODO DE PRODUÇÃO	MÉTODO DE PURIFICAÇÃO	DIÂMETRO (nm)	TEOR DE ENCAPSULAÇÃO (%)	DEMAIS CARACTERIZAÇÕES	AUTORES
Doxorrubicina	PC:PG:CHOL Razão molar igual a 7:3:4 Conc. Lipídica = 35 mM	Hidratação do filme lipídico/Extrusão em membranas de policarbonato (0,4-0,2 µm)	Resina de troca catiônica (Dowex®)	300-500	97	Teor de fosfolípide, teste de esterilidade e de pirogênicos	Amselem <i>et al.</i> , 1990
Mesoporfirina de estanho	PC	Hidratação do filme lipídico/Microfluidização (60-80 psi/ 4 ciclos)	---	100-150	90	-	Cannon <i>et al.</i> , 1993
Plasmídeo DNA (pRSV-LUC)	DC-CHOL:DOPE Razão molar igual a 3:2 Conc. Lipídica = 2 µmol/mL	Hidratação do filme lipídico/Microfluidização (90 psi/ 3-5 ciclos)	---	≤ 200	-	Teor de fosfolípide, teste de esterilidade e pirogênicos	Sorgi <i>et al.</i> , 1996
Proteína rh-Cu/Zn-SOD	DPPC:CHOL: Esterilamina Razão molar igual a 7:2:1	Injeção de solvente orgânico com fluxo cruzado	Ultrafiltração (cut off: 100 kDa)	270-290	25-27	Teste de esterilidade	Wagner <i>et al.</i> , 2002
Pirazinamida	Lecitina hidrogenada de soja	Hidratação do filme lipídico em sistema multitubular	---	800-2000	14	Teor de fosfolípide	Carneiro, 2003
Plasmídeo DNA	CHOL:DSPC:DODMA: DSG-PEG ₂₀₀₀ Razão molar igual a 55:20:15:10 Conc. Lipídica = 20 mM	Injeção de solvente orgânico	Membrana de filtração com carga (Mustang Q®)	≤ 200	80	Diâmetro e morfologia	Jeffs <i>et al.</i> , 2005
Nimodipina	Deoxicolato-Na:Polaxamer 188:PC 0,3:3:5 (p/p)	Injeção de solvente orgânico/Homogeneização sob alta pressão	Díálise/Filtração em membranas de 0,10 µm	53,3	90	Diâmetro e morfologia	Yang <i>et al.</i> , 2006
Anfotericina B	PC:CHOL	Técnica de gás antisolvente (fluido supercrítico de dióxido de carbono)	Díálise	150-3000	20	Teor de fosfolípide, Diâmetro e morfologia	Kadimi <i>et al.</i> , 2007

PC: fosfatidilcolina; CHOL: colesterol; PG: fosfatidilglicerol; DC-CHOL: dicarbamoil-colesterol; DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina; DSPC: diestearoilfosfatidilcolina; DODMA: dioleiloxidimetil-aminopropano; DOPE: dioleilfosfatidiletanolamina; DSG-PEG₂₀₀₀: diestearoilglicerol acoplado ao polietilenoglicol 2000

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo otimizar o processo da produção piloto e desenvolver um programa de liofilização de uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos seguintes parâmetros no processo de produção de SpHL-CDDP: mudanças da concentração inicial da CDDP, do solvente do método REV e do método de produção de lipossomas;
- Produzir SpHL-CDDP em escala piloto, incluindo etapas de calibração e purificação;
- Realizar caracterização física, físico-química e química dos SpHL-CDDP;
- Determinar as temperaturas críticas da formulação de SpHL-CDDP para o desenvolvimento de um programa de liofilização;
- Eleger um crioprotetor a ser adicionado à formulação de SpHL-CDDP para a utilização durante a liofilização desta;
- Desenvolver um programa de liofilização de SpHL-CDDP.

CAPÍTULO 1

***Otimização da produção de lipossomas
pH-sensíveis de circulação prolongada
contendo cisplatina***

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cisplatina é um fármaco amplamente utilizado devido a sua elevada atividade antitumoral. Entretanto, seu uso clínico é limitado devido aos efeitos colaterais graves, como neurotoxicidade, distúrbios gastrointestinais, e principalmente, à nefrotoxicidade aguda. Lipossomas podem aumentar a concentração intracelular dos fármacos em células cancerígenas, pela utilização de estratégias tanto passivas quanto ativas para atingir o alvo tumoral, e deste modo, evitar a toxicidade nas células saudáveis. Os recentes avanços obtidos com a formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP) foram a alteração da farmacocinética da CDDP sob sua forma livre, resultando na redução de sua toxicidade e numa maior especificidade da entrega do fármaco na região tumoral.

Lipossomas podem ser preparados por uma variedade de metodologias, incluindo a hidratação do filme lipídico, evaporação em fase reversa (REV), injeção etanólica, congelamento-descongelamento e desidratação-reidratação (DRV). Muitas características desejadas aos sistemas de liberação de fármacos, como o diâmetro adequado e um alto rendimento de encapsulação, dependem em grande parte do processo de produção empregado. Um bom método de produção é desejável para alcançar lipossomas com elevada eficiência de encapsulação, distribuição de diâmetro homogênea e uma boa estabilidade de armazenamento a longo prazo.

O método REV é um método baseado na substituição de um solvente imiscível em água por uma fase aquosa, levando à formação de lipossomas com alto teor de encapsulação de fármacos hidrofílicos. Entretanto, os solventes orgânicos usados na produção de lipossomas devem ser removidos da preparação final já que eles representam um risco à saúde humana e à estabilidade das vesículas lipossomais. O uso de solventes orgânicos com ponto de ebulição maior do que o ponto de ebulição do éter dietílico foi avaliado neste estudo como uma alternativa para a adequação ao escalonamento do método REV na produção de SpHL-CDDP. Além disto, foi investigado o uso do método DRV na produção de SpHL-CDDP, através do qual lipossomas pré-formados são submetidos à liofilização, seguido de uma hidratação controlada. Pelo método DRV é possível atingir ótimos níveis de encapsulação usando condições suaves e o escalonamento deste processo parece ser diretamente aplicável.

Por fim, dando sequência aos estudos pré-clínicos da formulação de SpHL-CDDP faz-se necessário o escalonamento da sua produção, para dar suporte aos estudos de estabilidade assim como às avaliações pré-clínicas e clínica. Deste modo, nesta primeira parte do estudo foram avaliados parâmetros para a otimização da produção de SpHL-CDDP.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

DOPE e DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). CHEMS foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A CDDP foi adquirida da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, MG, Brasil). A trealose dihidratada, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano-sulfônico (HEPES) e NaOH foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O metanol, acetato de etila e a N, N-dimetilformamida (DMF), de grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, Estados Unidos). O clorofórmio e o éter etílico foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil). O NaCl e o isopropanol foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido nítrico foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

O padrão de tetracloroplatinato de potássio (46,44 % de Pt₀) da Johnson Matthey (West Deptford, NJ, EUA), foi gentilmente cedido pela Quiral Química do Brasil (Juiz de Fora, MG, Brasil). O argônio 99,99 % de pureza da Air Liquide Brasil (Contagem, MG, Brasil) foi utilizado como gás de purga. A água purificada grau Milli-Q foi obtida pelo sistema de purificação da Millipore S.A. (Billerica, MA, EUA).

2.1.2 Equipamentos

Os lipossomas foram preparados utilizando um rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). As amostras foram vortexadas em Mini-shaker Ika, modelo MS1 (Wilmington, NC, Estados Unidos). A calibração dos lipossomas produzidos em pequena escala foi feita através de um extrusor Lipex Biomembranes, modelo T 001 (Vancouver, Canadá). Para a calibração dos lipossomas produzidos em larga escala foi utilizado um homogeneizador de alta pressão de estágio único, modelo APV 2000 (Albertslund, Dinamarca). A purificação dos lipossomas foi realizada por ultracentrifugação, utilizando uma ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-80 XP (Indianápolis, IN, EUA) ou por ultrafiltração em sistema de filtração de fluxo tangencial Labscale® contendo um membrana

de poliétersulfona modelo Biomax[®] de 300 kDa com 50 cm² de área (Millipore S.A., Billerica, MA, EUA). Na liofilização realizada no método DRV, foi utilizado o Liofilizador Thermo Savant Modulyo D-115 (Waltham, MA, EUA).

Os lipossomas obtidos foram caracterizados quanto ao diâmetro das partículas e potencial zeta utilizando o Zetasizer Malvern Instruments, modelo 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). O teor de encapsulação foi determinado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Instruments, composto por uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector DAD modelo 2996 (Milford, MA, EUA), conectado a um computador apresentando o software Empower, versão 2.0; ou através do sistema de GF-AAS da Varian (Mulgrave, Victoria, Austrália), que consiste de um espectrômetro de absorção atômica, modelo Spectr AA – Zeeman 220, equipado com forno de grafite modelo GTA 110, injetor automático, refrigerador e corretor Zeeman. A lâmpada de catodo oco para Pt, da Hitachi Instrument Service Companhia Ltda (Shibuya, Tokyo, Japão) operou a 10 mA. Foram utilizados tubos cobertos de grafite pirolítico sem plataforma (Varian, Mulgrave, Victoria, Austrália).

2.2 Métodos

2.2.1 Métodos de preparação de lipossomas

2.2.1.1 Produção de lipossomas pelo método REV

A preparação dos lipossomas foi realizada mediante o emprego do método de REV (SZOKA;PAPAHADJOPOULOS, 1978). Após a etapa de formação das vesículas lipídicas, a produção foi efetuada por dois métodos distintos, que foram denominados como **Método 1**, a produção de lipossomas em pequena escala; e **Método 2**, a produção em escala piloto (Figura 16).

O volume do lote foi diferenciado para cada método. Foram produzidos lotes cujo volume foi igual a 2 mL no método 1 e, 50 mL no método 2.

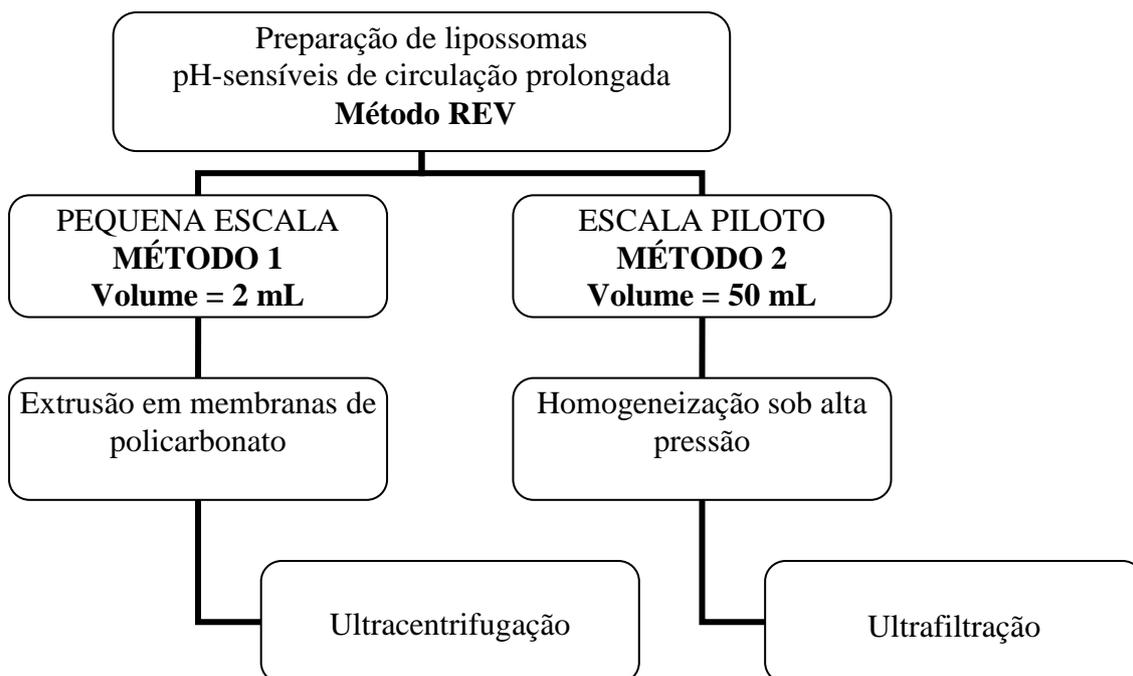


Figura 16 – Fluxograma da produção de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada.

2.2.1.1.1 Produção de lipossomas pelo método REV em pequena escala (método 1)

Obtenção de uma emulsão água em óleo (A/O)

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5; respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o solvente, em seguida, evaporado a 25°C, sob pressão reduzida. O filme lipídico obtido foi dissolvido em 3,0 mL de éter etílico, previamente tratado com solução de tampão HEPES 10 mM para eliminação de peróxidos, e em uma quantidade de solução de NaOH necessária para ionizar completamente as moléculas de CHEMS. Posteriormente, para a obtenção de lipossomas de CDDP, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de NaCl 0,9 g% (p/v) contendo CDDP 2,0 mg/mL, à solução lipídica. A mistura obtida foi, então, submetida ao vórtex durante 5 minutos, produzindo uma emulsão do tipo A/O.

Obtenção de SpHL-CDDP

Posteriormente, a emulsão A/O foi submetida à evaporação sob pressão reduzida, a 25°C, a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas.

Em seguida, os lipossomas foram submetidos à calibração mediante sua passagem através de membranas de policarbonato da marca Millipore (Billerica, MA, EUA) de 0,4 μm , 0,2 μm e 0,1 μm (5 vezes cada ciclo).

Purificação dos SpHL-CDDP por ultracentrifugação

O material não encapsulado nos SpHL-CDDP obtidos em pequena escala foi separado dos lipossomas mediante ultracentrifugação, a 150000 x g, a 10 °C, durante 90 minutos. Após a ultracentrifugação, o pellet foi reconstituído pela adição de solução de NaCl 0,9 % (p/v), seguida de agitação sob vórtex. Os SpHL-CDDP foram caracterizados quanto ao teor de encapsulação, diâmetro e potencial zeta das vesículas.

2.2.1.1.2 Produção de lipossomas pelo método REV em escala piloto (método 2)

Para a produção de SpHL-CDDP em escala piloto, o método utilizado diferenciou-se da produção em pequena escala quanto ao volume do lote e aos métodos de calibração e de purificação dos lipossomas. A preparação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos (sem CDDP, SpHL) e de SpHL-CDDP foi realizada mediante o emprego do método REV. Foram preparados lotes de 50 mL, sob pressão e rotação controladas. Os lipossomas foram submetidos à calibração por homogeneização sob alta pressão e a separação do material não encapsulado foi realizada por ultrafiltração.

Calibração de SpHL-CDDP por homogeneização sob alta pressão

Após a obtenção de 50 mL de SpHL-CDDP no rotavapor, a dispersão de lipossomas foi diluída para um volume final igual a 110 mL com uma solução de NaCl 0,9% (p/v), a fim de se obter o volume mínimo necessário para a calibração do diâmetro dos lipossomas em um homogeneizador de alta pressão. A calibração foi realizada mediante a passagem da dispersão de SpHL-CDDP no homogeneizador de alta pressão de estágio único (HAP), sob pressão de 500 Bar, por 9 ciclos, conforme definido em estudos anteriores (GIUBERTI *et al.*, 2011) (Figura 17). Cada ciclo representa o tempo necessário para que toda a amostra seja homogeneizada, sob pressão constante. O diâmetro das vesículas foi analisado em alíquotas retiradas antes do processo de homogeneização (0 ciclo) e após 9 ciclos.



Figura 17 – Ilustração do homogeneizador de alta pressão de estágio único.

Purificação de SpHL-CDDP por ultrafiltração

O material não encapsulado foi separado dos lipossomas produzidos pelo método 2 mediante a ultrafiltração em membrana de polietersulfona Biomax® de 300 kDa com 50 cm² de área (Cassete de filtração Millipore Pellicon® XL 50) acoplada a um sistema de filtração de fluxo tangencial Millipore Labscale® (Figura 18). Os lipossomas foram permeados durante 5 ciclos, sendo que cada ciclo corresponde à redução do volume da amostra até o volume mínimo necessário à recirculação pelo dispositivo de ultrafiltração.



Figura 18 – Ilustração do cassete de filtração Millipore Pellicon® XL 50 acoplado ao sistema de filtração de fluxo tangencial Millipore Labscale®.

Inicialmente, um volume de 100 mL da dispersão lipossomal foi acondicionado no reservatório de acrílico (recipiente alimentador), no qual era mantida sob agitação constante. Sua passagem foi impulsionada pela bomba peristáltica até a membrana, a qual separava a amostra em duas “fases”, sendo elas: 1) o **permeado**, composto por solução de CDDP e NaCl

e 2) o **retido**, composto pelos SpHL-CDDP. A amostra retida retornava ao reservatório de acrílico e recirculava até sua concentração a um volume de aproximadamente 20 mL. Ao atingir este volume, cessava-se o bombeamento e a amostra era diluída com solução de NaCl 0,9 % (p/v) em quantidade suficiente para 100 mL. Este procedimento foi repetido por 5 ciclos. Ao final de 5 ciclos, a amostra retida foi reservada. Um volume de 5 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v) foi injetado na membrana para recuperar o volume “morto” de SpHL-CDDP restante no dispositivo de ultrafiltração e adicionado à amostra retida, totalizando assim 25 mL de lipossomas purificados e concentrados.

A dispersão retida pela membrana (SpHL-CDDP concentrado) foi reconstituída ao volume inicial de produção (50 mL) adicionando-se solução de NaCl 0,9 % (p/v).

Os SpHL-CDDP foram caracterizados quanto ao teor de encapsulação, diâmetro e potencial zeta das vesículas.

2.2.2 Produção de lipossomas pelo método REV em pequena escala (método 1) com alteração dos solventes utilizados

Os solventes orgânicos usados na preparação de lipossomas devem ser removidos do produto final uma vez que estes representam um risco tanto para a saúde humana quanto para a estabilidade das vesículas. O uso de solventes orgânicos com pontos de ebulição elevados, em comparação ao éter etílico, foram avaliados como uma alternativa adequada no escalonamento da produção de lipossomas pelo método REV.

O planejamento para o uso de solventes orgânicos compreende a utilização de áreas à prova de explosão (devido à atmosfera de vapor de solvente que pode ser formada durante o processo) visando a aplicação do método em escala industrial. Além disso, o solvente orgânico deve ser imiscível com a fase aquosa no método REV. E finalmente, outro ponto a ser considerado é a toxicidade dos solventes. Estes devem apresentar a menor toxicidade possível e quantidades aceitáveis destes deverão ser permitidos em produtos injetáveis. De acordo com a *European Medicines Agency* (EMA, 2011), os solventes são divididos em 3 classes, a saber: classe 1 (solventes a serem evitados), classe 2 (solventes a serem limitados) e classe 3 (solventes com baixo potencial tóxico). Etanol (classe 3), acetato de etila (classe 3) e clorofórmio (classe 2, com limite de concentração igual a 60 ppm) podem ser usados na preparação de produtos farmacêuticos.

2.2.2.1 Variação do solvente utilizado na produção de SpHL pelo método REV

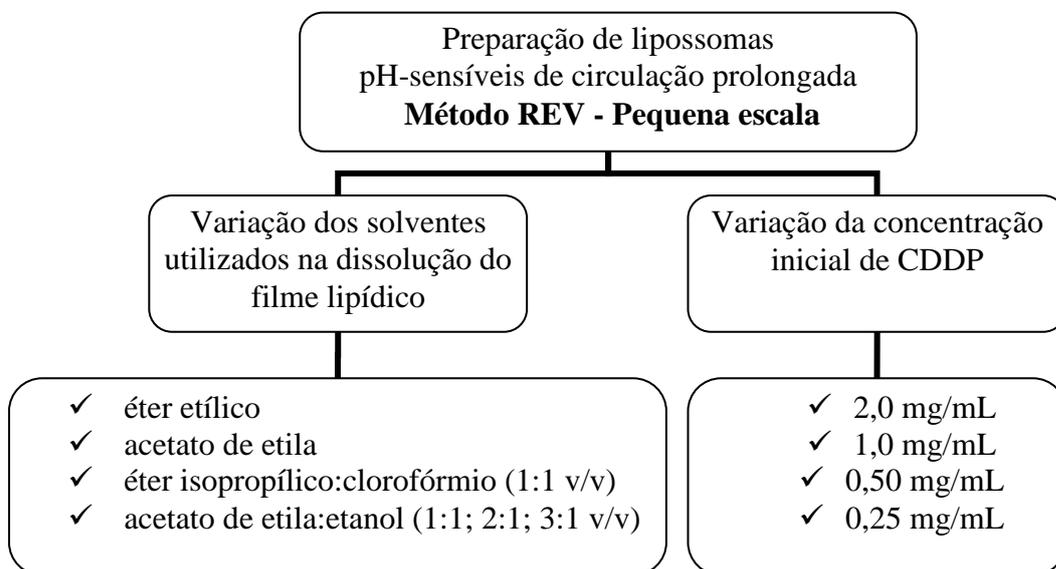


Figura 19 – Fluxograma das variáveis testadas na produção de SpHL-CDDP pelo método REV em pequena escala.

Inicialmente, os solventes foram testados na produção em pequena escala (Figura 19). Na preparação de lipossomas pelo método REV, foram testados diversos solventes candidatos à substituição do éter etílico, objetivando a utilização de um solvente mais viável à transposição para a escala industrial. SpHL foram produzidos em pequena escala (Método 1): alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5; respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o clorofórmio, em seguida, evaporado sob pressão reduzida. O filme lipídico obtido foi dissolvido em diferentes solventes orgânicos como listado na Tabela 2.

Após a dissolução do filme lipídico, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v). A mistura obtida foi, então, submetida à agitação em vórtex durante 5 minutos. Posteriormente, a dispersão foi submetida à evaporação sob pressão reduzida a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas. Os lipossomas foram caracterizados quanto ao aspecto macroscópico, diâmetro das vesículas e índice de polidispersão.

Tabela 2 – Solventes utilizados na etapa de emulsificação da preparação de SpHL pelo método REV

Solvente Orgânico (v/v)	Relação fase aquosa:solvente orgânico (v/v)	Ponto de ebulição (°C)
Éter etílico	1:3	34,6
Acetato de etila	1:4	77,1
Acetato de etila:etanol 1:1	1:4	---
Acetato de etila:etanol 2:1	1:4	---
Acetato de etila:etanol 3:1	1:4	---
Éter isopropílico:clorofórmio 1:1	1:6	---

2.2.2.2 Variação do solvente utilizado na produção de SpHL-CDDP pelo método REV

Diante dos resultados obtidos pela produção de SpHL, foram escolhidas as misturas de solventes Acetato de etila:etanol 1:1 (v/v) e Acetato de etila:etanol 2:1 (v/v), para a produção de SpHL-CDDP. Após a obtenção do filme lipídico (descrito no item 2.2.2.1), este foi dissolvido com uma das misturas de solventes citadas anteriormente. A relação entre a fase aquosa [solução de NaCl 0,9 % (p/v)] e a fase orgânica foi de 1:4 (v/v). Após a dissolução do filme lipídico, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v) contendo cisplatina 2 mg/mL, à solução lipídica. Posteriormente, a dispersão foi submetida à evaporação sob pressão reduzida a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas. Os lipossomas foram caracterizados quanto ao aspecto macroscópico, diâmetro das vesículas e índice de polidispersão.

2.2.2.3 Produção de lipossomas pelo método REV em pequena escala (método 1) com alteração da concentração do fármaco

Foram produzidos SpHL-CDDP em pequena escala, pelo método REV (Figura 19), utilizando na etapa de hidratação do filme lipídico, soluções de NaCl 0,9 % (p/v) contendo CDDP em diversas concentrações. Foram utilizadas soluções de CDDP nas concentrações de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL. Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro das vesículas, índice de polidispersão e teor de encapsulação.

2.2.3 Produção de lipossomas pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração do solvente e da concentração do fármaco

Após testes preliminares de produção de SpHL-CDDP com variação da concentração da solução de CDDP (fase aquosa) e do solvente utilizado como fase orgânica do método REV, em pequena escala (método 1), foram produzidos lotes de 50 mL de SpHL-CDDP utilizando uma solução de CDDP na concentração igual a 0,5 mg/mL e a mistura acetato de etila:etanol 1:1 (v/v), pelo método REV, em escala piloto (método 2).

2.2.4 Preparação de lipossomas pelo método de DRV

No método de DRV vesículas “vazias” (sem o fármaco), contendo diferentes lípidos ou misturas destes, são preparadas. Após a mistura das vesículas “vazias” com o fármaco solubilizado, procede-se a desidratação. Pela adição de água, a reidratação leva novamente à formação das vesículas (ZADI; GREGORIADIS, 2000). SpHL-CDDP foram também produzidos pelo método de DRV mediante a mistura de SpHL e da solução de CDDP nas concentrações de 0,5 ou 1,0 mg/mL, seguida da liofilização da mistura e reidratação do pó liofilizado, a fim de se avaliar um novo método de preparo, o qual pode também ser aplicado em larga escala.

Preparação de SpHL – método DRV

Inicialmente, SpHL foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM *et al.*, 1965). Aliquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5; respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o solvente, em seguida, evaporado sob pressão reduzida, a 25°C (Figura 20). Ao filme lipídico obtido foi adicionada quantidade suficiente de solução de NaOH necessária para ionizar completamente as moléculas de CHEMS. Posteriormente, a hidratação do filme foi feita pela adição de 1,0 mL de solução aquosa de NaCl 0,45 % e trealose 2,5 % (p/v). A dispersão foi misturada em um agitador tipo vórtex, por cerca de 10 minutos ou até completo desprendimento do filme. Em seguida, os lipossomas foram extrusados em membranas de policarbonato de 0,4 µm; 0,2 µm e 0,1 µm (por 5 vezes cada).

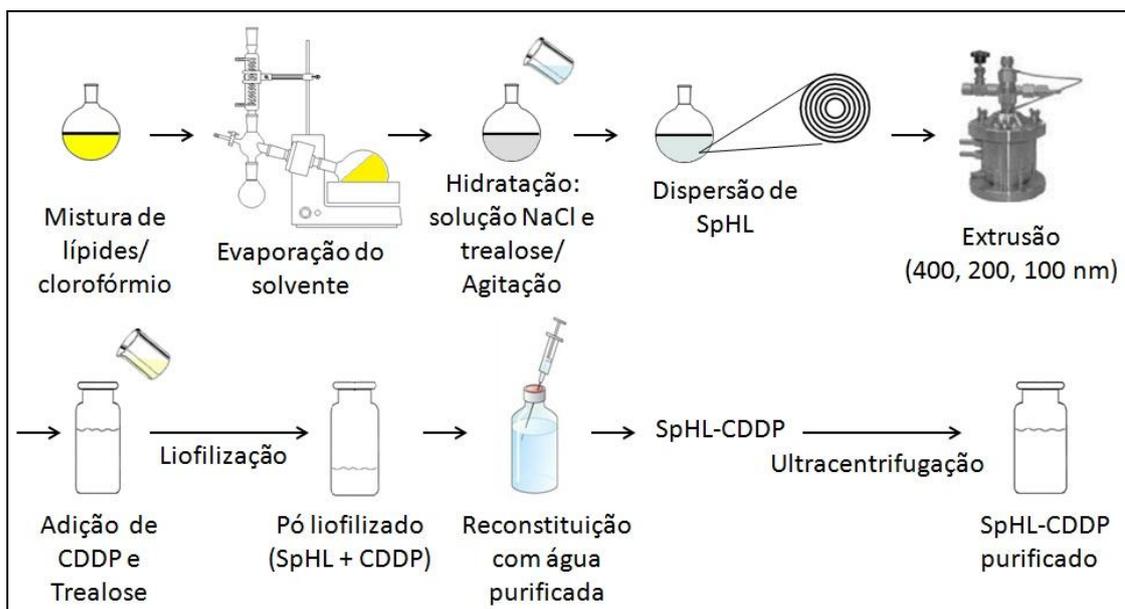


Figura 20 - Representação esquemática do método de desidratação-reidratação de vesículas da preparação de SpHL-CDDP.

Aos lipossomas calibrados, foi adicionado 1,0 mL de solução de NaCl 0,45 % (p/v) contendo CDDP (0,5 mg/mL ou 1,0 mg/mL) e trealose 2,5 % (p/v), como substância crioprotetora, totalizando uma razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p. Em seguida, esta mistura foi congelada em nitrogênio líquido e colocada na câmara do liofilizador (Modulyo D-115). Os lipossomas foram submetidos à liofilização durante 24 horas. Após este período, os frascos foram vedados.

Os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada liofilizados foram reconstituídos com quantidade suficiente de água purificada para a recuperação do volume inicial de lipossomas (lipossoma total). Em seguida, a dispersão lipossomal foi submetida à agitação, com auxílio do vórtex, por 3 minutos. Imediatamente após a ressuspensão, estes lipossomas foram purificados por ultracentrifugação. O pellet foi reconstituído com solução de NaCl 0,9 % (p/v), formando os lipossomas purificados. Após a ultracentrifugação, a quantidade de CDDP presente no sobrenadante e nos lipossomas purificados foi analisada por espectroscopia de absorção atômica. Os lipossomas foram armazenados sob atmosfera de nitrogênio, a 4° C, protegidos da luz. Estes foram caracterizados quanto ao diâmetro das vesículas antes e após a etapa de liofilização.

2.3 Métodos de caracterização dos lipossomas

2.3.1 Determinação do diâmetro e do potencial zeta das vesículas

A análise do diâmetro das partículas foi efetuada por meio de espectroscopia de correlação de fótons utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). Para a realização das medidas foram utilizados 30 µL de lipossomas diluídos em 3 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v), até que se obtivesse a contagem adequada de partículas. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas.

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas 250 vezes, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°.

2.3.2 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP

A determinação da porcentagem de CDDP encapsulada foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS).

O teor de encapsulação (TE) da CDDP em SpHL-CDDP foi calculado mediante a determinação da porcentagem da concentração de CDDP presente nos lipossomas purificados (Lip Purificado) e a concentração de CDDP presente nos lipossomas antes da purificação (Lip Total), como indicado na equação discriminada abaixo:

$$TE = \frac{[CDDP]_{Lip\ Purificado} \times 100}{[CDDP]_{Lip\ Total}}$$

2.3.2.1 Doseamento da CDDP por CLAE

A CLAE foi utilizada como técnica de doseamento da CDDP, segundo método analítico descrito na Farmacopéia Americana 24ª edição (USP 24), com modificações no eluente empregado. O eluente descrito na USP 24 é constituído por acetato de etila, metanol, dimetilformamida e água, na proporção de 25:16:5:5, respectivamente; enquanto o eluente

utilizado neste trabalho é constituído por acetato de etila, metanol, dimetilformamida e água, na proporção 4:4:1:1, respectivamente. A CDDP foi separada utilizando como fase estacionária a coluna LiChrospher® 100 NH₂, 25 cm x 4 mm, 10 µm (Darmstadt, Alemanha). O volume de injeção foi de 20 µL, em fluxo igual a 1,0 mL/min e o material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 310 nm.

Os SpHL-CDDP foram previamente abertos com o emprego de álcool isopropílico na proporção 1:2, seguida de diluição em fase móvel (1,5 vezes) para injeção no cromatógrafo.

2.3.2.2 Doseamento da CDDP por GF-AAS

As condições de análise para a determinação da platina por GF-AAS estão descritas na tabela 3 (temperaturas, tempo das etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza, e o fluxo de gás de purga). Essas condições foram definidas em trabalho anterior (VIEIRA, 2003).

Tabela 3 – Programa de temperaturas e fluxo de gás para a determinação da Pt

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de argônio (L/min)
Estágio 1 – Secagem		
85	5,0	3,0
95	40,0	3,0
170	10,0	3,0
Estágio 2 – Pirólise		
500	5,0	3,0
1100	5,0	3,0
1100	10,0	3,0
Estágio 3 – Atomização		
1100	2,0	0,0
2700	0,8	0,0
2700	4,0	0,0
Estágio 4 – Limpeza		
2700	3,0	3,0

Preparo da solução padrão estoque de Pt 1000 ppm

A massa de 0,2149 g do padrão de cloroplatinato de potássio (46,54 %), exatamente pesada em balança analítica (Sartorius BP221S, Alemanha), foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e diluída com água Milli-Q acidificada com ácido clorídrico.

Preparo do padrão intermediário de Pt 350 µg/L

Foram realizadas sucessivas diluições da solução padrão estoque de Pt 1000 ppm, em solução aquosa de ácido nítrico 5 % (v/v) em balões volumétricos de 10 mL, até atingir a concentração de 350 µg/L. A partir da solução padrão intermediária, foi traçado uma curva padrão por diluições realizadas no próprio equipamento.

Preparo das amostras de SpHL-CDDP

As amostras de SpHL-CDDP foram diluídas em solução aquosa de ácido nítrico 1 % (v/v). A digestão foi efetuada pela adição de solução aquosa de ácido nítrico 1 % (v/v) e a homogeneização foi realizada manualmente com pipeta automática. A concentração final estimada das amostras foi igual a 325 ng de Pt /mL. O branco utilizado foi a solução de ácido nítrico 1 % (v/v). As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 265,9 nm com largura da fenda de 0,5 nm. O volume de amostra utilizado foi igual a 10 µL .

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da determinação dos coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração. As curvas de calibração foram construídas com 5 concentrações distintas em triplicata para cada experimento. As concentrações 22,50; 52,50; 82,50; 112,50 e 142,50 µg de Pt/L foram preparadas por automação à partir da solução padrão intermediária.

2.4 Análise estatística

Os valores médios e os desvios padrão (d.p.) foram calculados para todos os experimentos descritos acima. A análise estatística foi feita através do teste t ou pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey, usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Para todas as análises, adotou-se o intervalo de confiança de 95 % e um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP

Os métodos utilizados para o doseamento da cisplatina foram validados anteriormente em trabalho desenvolvido por Vieira e colaboradores (2003).

3.1.1 Método CLAE

3.1.1.1 Linearidade

O doseamento da CDDP foi realizada pelo método CLAE, conforme descrito no item 2.3.2.1. A curva de calibração (Figura 21) apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9991, indicando adequada linearidade para a faixa de concentração utilizada (0,05 a 1,6 mg de CDDP/mL).

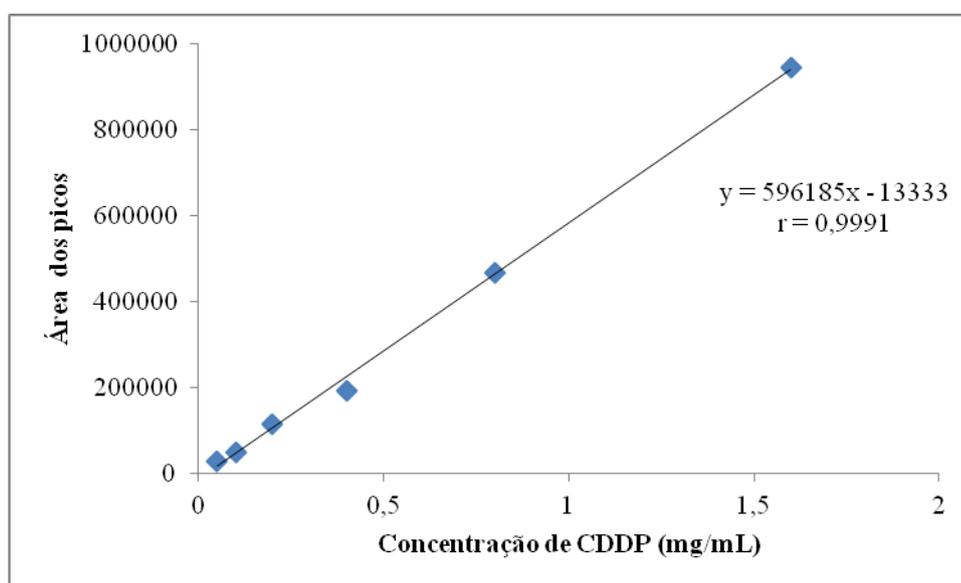


Figura 21 – Curva de calibração para o doseamento da CDDP pelo método de CLAE.

3.1.2 Método GF-AAS

3.1.2.1 Linearidade

A curva de calibração (Figura 22) apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9995 indicando adequada linearidade para a faixa de concentração utilizada 22,5 µg/L a 142,5 µg/L de Pt que equivale a faixa de 34,62 µg/L a 219,23 µg/L de CDDP.

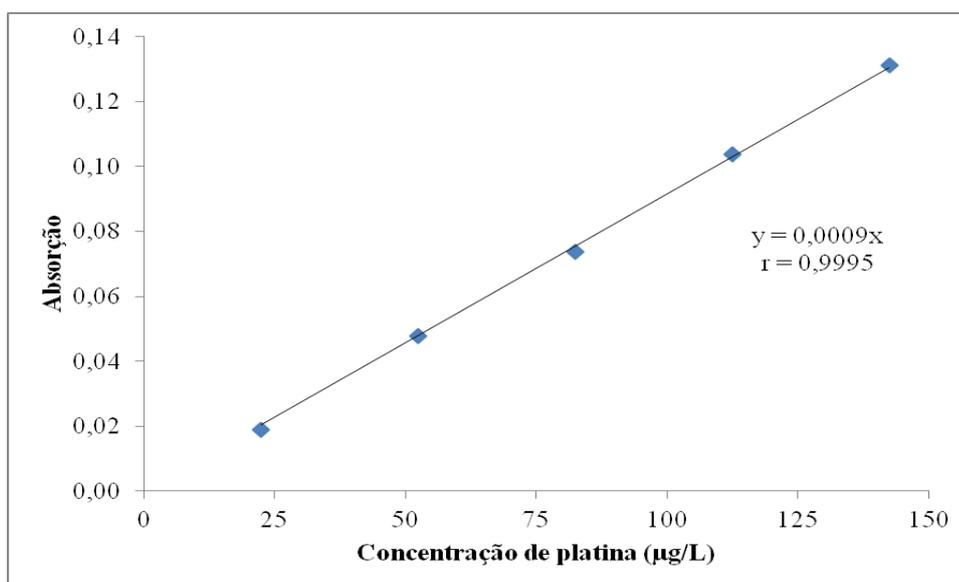


Figura 22 - Curva de calibração para doseamento da platina pelo método de GF-AAS.

3.2 Produção de SpHL e SpHL-CDDP pelo método REV

SpHL e SpHL-CDDP foram produzidos sob o método REV, com a variação da composição solvente e/ou da concentração do fármaco utilizado para a encapsulação, visando à otimização do processo de produção.

3.2.1 Produção de SpHL pelo método REV em pequena escala (método 1) com alterações dos solventes utilizados

A preparação de lipossomas pelo método REV, envolve a formação de um filme lipídico seguido da dissolução deste por um solvente, que juntamente com uma solução aquosa do fármaco, forma uma emulsão A/O, sob agitação, e atinge a forma lipossomal após a

evaporação deste mesmo solvente sob pressão reduzida. Na formulação desenvolvida utiliza-se o éter etílico como solvente. Para a substituição deste, visando à produção industrial desta formulação, diferentes solventes foram testados os quais diferiram em relação à capacidade de dissolução do filme lipídico e à formação de lipossomas (Quadro 2). Para tanto, entretanto, inicialmente os solventes foram testados na formulação sem o fármaco (SpHL).

Quadro 2 – Aspectos do processo de produção de SpHL preparados com diferentes solventes orgânicos

Solvente orgânico (v/v)	Dissolução do filme lipídico	Formação de fase gel	Aspecto da mistura durante a evaporação	Aspecto macroscópico da dispersão final
Éter etílico	sim	sim	Hom	Hom
Acetato de etila	sim	sim	Het	Hom
Éter isopropílico:clorofórmio 1:1	sim	não	Het	Het
Acetato de etila:etanol 1:1	sim	sim	Het	Hom
Acetato de etila:etanol 2:1	sim	sim	Hom	Hom
Acetato de etila:etanol 3:1	sim	sim	Hom	Hom

* Het significa heterogêneo e Hom, homogêneo.

Para os solventes testados, observou-se a formação da fase gel característica deste método, exceto para a mistura de éter isopropílico:clorofórmio (1:1 v/v), a qual resultou em uma dispersão heterogênea, contendo agregados de lípidos visualizados macroscopicamente. Após a evaporação do clorofórmio, o sistema desestabilizou-se e os lípidos precipitaram na presença do éter isopropílico.

A mistura de solventes que permitiu melhor dissolução do filme lipídico foi a mistura acetato de etila e etanol em diferentes proporções de volume [1:1, 2:1 e 3:1 (v/v), respectivamente]. No entanto, a dissolução só foi possível quando inicialmente o filme lipídico foi dissolvido em acetato de etila, e posteriormente, o etanol foi acrescentado à mistura. Em comparação a utilização do éter etílico, solvente comumente utilizado como fase orgânica na preparação de lipossomas pelo método REV, cujas preparações apresentam um aspecto homogêneo da dispersão lipossomal, as misturas de acetato de etila:etanol (1:1, 2:1 e 3:1 v/v) formaram dispersões com o mesmo aspecto uniforme.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de diâmetro médio e índice de polidispersão das vesículas após a formação dos lipossomas, ou seja, antes da etapa de extrusão. A formulação tradicional de SpHL-CDDP, utilizando éter etílico como solvente do filme lipídico, forma uma dispersão lipossomal com vesículas de aproximadamente 400 nm, com distribuição heterogênea (i.p. = 0,4). Resultados semelhantes foram observados utilizando-se o acetato de etila como solvente desta fase do processo. Entretanto foram observados agregados de lípidos suspensos na mistura durante a evaporação deste.

Tabela 4 – Características físico-químicas de SpHL preparados com diferentes solventes orgânicos

Solvente orgânico *	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)
Éter etílico	400,0	0,40
Acetato de etila	414,0	0,40
Acetato de etila:etanol 1:1	1228,0	0,25
Acetato de etila:etanol 2:1	1061,4	0,13
Acetato de etila:etanol 3:1	721,0	0,06

* Os valores correspondem a n = 1. Os dados referem-se a lipossomas antes da etapa de extrusão.

Para as misturas de acetato de etila:etanol, obteve-se dispersões lipossomais homogêneas com diâmetro médio das vesículas entre 721 e 1228 nm, as quais foram facilmente calibradas pelo método da extrusão. Foram selecionadas as misturas volumétricas de acetato de etila:etanol, nas proporções de 1:1 e 2:1, para a continuidade dos estudos de substituição do solvente éter etílico. Apesar dos resultados de menor diâmetro e boa homogeneidade da formulação contendo acetato de etila:etanol 3:1 v/v, o procedimento de evaporação desta formulação foi efusivo e turbulento, o que dificultou a condução do experimento, o controle do processo e a reprodutibilidade entre os lotes.

3.2.2 Produção de SpHL-CDDP pelo método REV em pequena escala (método 1) com alterações da concentração do fármaco

Na produção de SpHL-CDDP, segundo método REV (REV SpHL-CDDP), utilizando o éter etílico como solvente e uma solução de CDDP 2,0 mg/mL, o teor médio de encapsulação obtido foi $19,6 \pm 3,0$ % (GIUBERTI *et al.*, 2011). A fim de se otimizar o

processo de produção de SpHL-CDDP, diferentes concentrações de CDDP foram testadas. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa no diâmetro médio e índice de polidispersão das vesículas quando a concentração de CDDP foi diminuída. Em todas as concentrações testadas, foram obtidas dispersões de SpHL-CDDP monodispersas, com diâmetro médio das vesículas de aproximadamente 130 nm (Tabela 5).

Tabela 5 - Influência das diferentes concentrações de CDDP sobre o diâmetro das vesículas e teor de encapsulação de SpHL-CDDP preparados pelo método REV

Concentração inicial de CDDP (mg/mL) ^a	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Concentração de CDDP encapsulada (mg/mL)	Teor de encapsulação (%)
2,00	133,3 ± 12,5	0,08 ± 0,03	0,32 ± 0,04	19,6 ± 3,0
1,00	126,8 ± 11,1	0,07 ± 0,03	0,25 ± 0,02 ^b	30,9 ± 0,7
0,50	130,3 ± 6,8	0,06 ± 0,04	0,18 ± 0,04 ^{c,e}	40,6 ± 5,9
0,25	129,7 ± 7,2	0,07 ± 0,04	0,03 ± 0,01 ^{c,d,f}	14,1 ± 2,3

^a O éter etílico foi utilizado como solvente orgânico. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão (n=3).

^b indica que não há diferença significativa em relação a concentração inicial de CDDP 2,0 mg/mL (p>0,05).

^c indica uma diferença significativa em relação a concentração inicial de CDDP 2,0 mg/mL (p<0,05).

^d indica uma diferença significativa em relação a concentração inicial de CDDP 1,0 mg/mL (p<0,05).

^e indica que não há uma diferença significativa em relação a concentração inicial de CDDP 1,0 mg/mL (p>0,05).

^f indica uma diferença significativa em relação a concentração inicial de CDDP 0,5 mg/mL (p<0,05).

Para atingir um alto rendimento de encapsulação do fármaco, foi utilizado o método de REV, reconhecidamente usado para a encapsulação de fármacos hidrofílicos (WAGNER; VORAUER-UHL, 2011). Visando a administração IV, a encapsulação é ainda mais desafiadora, devido ao diâmetro reduzido requerido para estas formulações (em torno de 100 nm). O pequeno volume aquoso interno destes lipossomas exige uma encapsulação mais eficiente para que a concentração do fármaco dentro destes atinja níveis terapêuticos no sítio de ação (BARENHOLZ, 2003).

A maior concentração de fármaco encapsulado foi obtido a partir da solução de CDDP 2,0 mg/mL (Tabela 6). Entretanto, a quantidade de CDDP livre a ser recuperada após a etapa de purificação é elevada (aproximadamente 1,68 mg/mL). A utilização de soluções de CDDP com concentrações iniciais iguais a 1,0 e 0,5 mg/mL resultaram em SpHL-CDDP com quantidades de CDDP encapsulada similares à formulação com concentração inicial de CDDP 2,0 mg/mL. Portanto, estes resultados indicam que uma melhor eficiência na produção de

SpHL-CDDP pode ser atingida utilizando uma concentração inicial de CDDP de 0,5 mg/mL, já que a quantidade de CDDP não encapsulada (livre) é menor quando comparada a concentração inicial de CDDP de 1,0 mg/mL. Isto resulta em uma menor quantidade de CDDP livre, a ser recuperada após a etapa de purificação do processo de produção. A utilização de uma solução de CDDP de 0,25 mg/mL, surpreendentemente, resultou em uma quantidade de fármaco encapsulado bem abaixo das concentrações anteriormente testadas.

3.2.3 Produção de SpHL e SpHL-CDDP pelo método REV, em pequena escala (método 1), com variação do solvente da formulação

3.2.3.1 Efeito dos solventes sobre o diâmetro e índice de polidispersão das vesículas de SpHL

Os SpHL, produzidos segundo método REV n°1, utilizando como solvente a mistura acetato de etila:etanol, nas proporções 1:1 e 2:1 (v/v), apresentaram diâmetro médio e índice de polidispersão semelhantes aos SpHL produzidos utilizando o éter etílico na formulação (Tabela 6).

Tabela 6 – Caracterização físico-química de SpHL obtidos com uso de diferentes solventes orgânicos

Solvente orgânico	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)
Éter etílico	131,1 ± 19,40	0,15 ± 0,03
Acetato de etila:etanol 1:1 (v/v)	132,9 ± 16,44	0,17 ± 0,03
Acetato de etila:etanol 2:1 (v/v)	148,8 ± 6,22	0,10 ± 0,01

* Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2).

3.2.3.2 Efeito dos solventes sobre as características físico-químicas de SpHL-CDDP

A possibilidade da substituição do éter etílico na formulação de SpHL-CDDP produzida pelo método REV (REV SpHL-CDDP) foi estudada. A escolha das duas misturas de solventes, acetato de etila:etanol 1:1 e 2:1 (v/v), foi baseada nos resultados preliminares, descritos no item 3.2.1. Estes solventes foram escolhidos devido à biocompatibilidade,

capacidade de solubilização dos lípidos e capacidade de formação de lipossomas por este método.

REV SpHL-CDDP, preparados com acetato de etila:etanol 1:1 (v/v) ou acetato de etila:etanol 2:1 (v/v), resultaram em dispersões lipossomais com diâmetro médio maior do que REV SpHL-CDDP, preparados com éter etílico. Entretanto, todas as formulações apresentaram índices de polidispersão semelhantes (Tabela 7). Em relação ao teor de encapsulação de SpHL-CDDP, preparados com uma concentração inicial de CDDP 0,5 mg/mL, houve uma redução do teor das formulações preparadas com as misturas solventes acetato de etila:etanol (1:1 e 2:1, v/v) quando comparadas a REV SpHL-CDDP, preparadas com éter etílico (Tabela 7). Esta redução pode ser devido a um fenômeno interfacial que permite a formação de uma maior área superficial quando da utilização de éter etílico em comparação com as misturas acetato de etila:etanol. Esta hipótese pode ser apoiada pelo diâmetro mais elevado das vesículas nas formulações de SpHL-CDDP em que as misturas acetato de etila:etanol foram utilizadas.

Tabela 7 - Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos com uso de diferentes solventes orgânicos

Solvente orgânico*	Concentração inicial de CDDP (mg/mL)	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Concentração de CDDP encapsulada (mg/mL)	Teor de encapsulação (%)
Éter etílico	0,50	127,6 ± 6,9	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,04	40,6 ± 5,9
Acetato de etila:etanol (1:1 v/v)	0,50	150,9 ± 8,8 ^a	0,11 ± 0,02	0,05 ± 0,01	11,0 ± 2,7 ^a
Acetato de etila:etanol (2:1 v/v)	0,50	153,3 ± 5,0 ^a	0,10 ± 0,05	0,05 ± 0,01	13,6 ± 2,9 ^a

* Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 3).

^a indica uma diferença significativa em relação à formulação de SpHL-CDDP com éter etílico (p < 0,05).

Além disso, as constantes dielétricas (ϵ) dos solventes utilizados são iguais a ϵ éter etílico: 4,3; ϵ acetato de etila: 6,2, ϵ etanol: 24,6 e ϵ água: 80,4. Diante desses valores, uma

outra possível explicação é a partição entre CDDP e as misturas acetato de etila:etanol, já que a $\epsilon_{\text{acetato de etila:etanol}}$ é maior do que $\epsilon_{\text{éter etílico}}$, e deste modo, o uso das misturas solventes favorecem a solubilização do fármaco. Portanto, uma concentração menor de CDDP poderia estar disponível para ser encapsulada no compartimento aquoso dos lipossomas.

3.2.4 Escalonamento da produção de SpHL-CDDP pelo método REV (método 2)

O escalonamento da produção de SpHL-CDDP foi realizado pela variação do volume do lote de SpHL-CDDP, cujo volume é igual a 2 mL em escala laboratorial (método REV nº1) para os volumes de 50 mL e 120 mL, produzidos segundo o método REV nº2. Para a homogeneização sob alta pressão, o lote de 50 mL de SpHL-CDDP foi diluído com solução de NaCl 0,9 % (p/v) até um volume final de 110 mL a fim de cumprir o volume mínimo necessário à utilização do equipamento.

Tabela 8 - Caracterização de SpHL-CDDP produzidos pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração do volume do lote

Amostra SpHL- CDDP*	Diâmetro (nm)	I.P.	Distribuição do diâmetro médio das vesículas (%)			
			< 100	< 200	200-500	> 500
Total	364,8 ± 38,5 ^a	0,62 ± 0,0 ^a	4,2 ± 0,1 ^a	23,6 ± 6,2 ^a	41,6 ± 1,8 ^a	34,7 ± 8,0 ^a
3 ciclos HAP	113,0 ± 5,9	0,28 ± 0,0	40,4 ± 0,1 b,c,d	83,8 ± 4,9 b,c,d	15,9 ± 4,9 b,c,d	0,3 ± 0,0
6 ciclos HAP	96,0 ± 7,9	0,23 ± 0,0	54,8 ± 0,1	94,6 ± 0,1	5,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
9 ciclos HAP	94,7 ± 3,3	0,23 ± 0,0	54,8 ± 0,3	94,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Ultrafiltrado	94,6 ± 3,3	0,24 ± 0,0	54,9 ± 0,3	94,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0

* SpHL-CDDP produzidos com éter etílico e concentração inicial de CDDP 0,5 mg/mL. O volume do lote foi igual a 120 mL. HAP significa Homogeneização sob alta pressão. SpHL-CDDP total corresponde a formulação antes do processo de HAP e ultrafiltração. SpHL-CDDP ultrafiltrado corresponde à formulação final homogeneizada e purificada por ultrafiltração.

^a Indica diferença estatística significativa em relação às demais amostras de SpHL-CDDP (p<0,05).

^b Indica diferença estatística significativa em relação ao SpHL-CDDP após 6 ciclos de HAP (p<0,05).

^c Indica diferença estatística significativa em relação ao SpHL-CDDP após 9 ciclos de HAP (p<0,05).

^d Indica diferença estatística significativa em relação ao SpHL-CDDP ultrafiltrado (p<0,05).

Na comparação do produto final de SpHL-CDDP (homogeneizado por 9 ciclos no HAP a 500 bar e purificado por ultrafiltração) dos lotes de 50 mL e 120 mL, verificou-se que não houve diferença no diâmetro das vesículas, homogeneidade e teor de encapsulação. Além disto, SpHL-CDDP purificados após 3 e 6 ciclos de HAP (lote de 50 mL) mantiveram o mesmo teor de encapsulação que a formulação purificada submetida a 9 ciclos de HAP.

Portanto, não houve perda do material encapsulado durante o processo de HAP da formulação diluída.

A diferença entre o diâmetro médio e índice de polidispersão entre SpHL-CDDP total (após formação das vesículas lipossomais no rotavapor) e as demais amostras de SpHL-CDDP submetidas à homogeneização sob 500 bar demonstra que o processo de HAP é eficaz na redução do diâmetro das vesículas bem como na calibração do sistema, resultando em um produto monodisperso com diâmetro médio em torno de 100 nm. Ao compararmos a população das vesículas com diâmetro inferior a 500 nm, vimos que o processamento por 6 ciclos no HAP é suficiente para a completa redução do diâmetro das vesículas e sua calibração (Tabela 8).

3.2.5 Produção de SpHL-CDDP pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração dos solventes e da concentração do fármaco

Tabela 9 - Caracterização de SpHL-CDDP produzidos pelo método REV nº2 com alteração do solvente

Solvente orgânico*	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)		Concentração de CDDP encapsulada (mg/mL)	Teor de encapsulação (%)
			< 200 nm	> 500 nm		
			Éter etílico	94,6 ± 3,3		
Acetato de etila: etanol 1:1 (v/v)	175,7 ± 25,6 ^a	0,32 ± 0,07	42,2 ± 7,7 ^a	2,1 ± 2,1	0,02 ± 0,02 ^a	3,8 ± 1,2 ^a

* Os valores são expressos como a média ± desvio padrão (n = 3). A concentração inicial de CDDP foi de 0,5 mg/mL.

^a indica uma diferença significativa em relação à formulação de SpHL-CDDP com éter etílico (p < 0,05).

Apesar do baixo teor de CDDP encapsulado pela formulação utilizando a mistura acetato de etila:etanol 1:1 (v/v), a eficiência deste solvente foi estudada na produção de SpHL-CDDP em escala piloto (método REV nº2). O aumento na escala de produção em um fator de 25 e o uso do HAP na calibração do diâmetro das vesículas conduziram a uma

redução da quantidade de CDDP encapsulada e do diâmetro das vesículas na formulação em que o éter etílico foi usado como fase orgânica (Tabela 9).

Uma redução mais pronunciada no teor de encapsulação foi observado quando a mistura acetato de etila:etanol 1:1 (v/v), foi usada como solvente orgânico, comparando as produções na escala laboratorial (Tabela 7) e na escala piloto (Tabela 9). Na produção piloto, SpHL-CDDP produzidos com éter etílico resultaram em dispersões homogêneas, com aproximadamente 95 % das vesículas com diâmetro inferior a 200 nm (Tabela 9). Portanto, a produção de SpHL-CDDP em uma escala piloto formou uma dispersão lipossomal de diâmetro médio homogêneo e adequado à administração IV. Logo, pode ser considerado um processo aplicável à produção de lipossomas.

3.3 Preparação de lipossomas pelo método de DRV

SpHL-CDDP, produzidos segundo o método DRV (DRV SpHL-CDDP) e utilizando soluções de CDDP de 0,5 ou 1,0 mg/mL, apresentaram vesículas com diâmetro em torno de 500 nm, e uma distribuição de diâmetro heterogênea (i.p. > 0,25) (Tabela 10). O aumento da concentração inicial de CDDP de 0,5 mg/mL para 1,0 mg/mL levou ao aumento da concentração de CDDP encapsulada. Entretanto, os teores de encapsulação em ambas as concentrações utilizadas foram semelhantes. Logo, a quantidade de CDDP não encapsulada em DRV SpHL-CDDP 1,0 mg/mL foi maior, gerando uma maior quantidade de CDDP a ser recuperada após a etapa de purificação. Convém destacar que SpHL-CDDP preparados pelos métodos REV e DRV resultaram em igual teor de encapsulação, quando utilizada a concentração de inicial de CDDP 0,5 mg/mL (Tabelas 5 e 10).

O método de DRV, como o método REV, também é um método utilizado para aumentar o volume encapsulado na fase aquosa interna lipossomal e assim, aumentar a razão droga/lípide (BARENHOLZ, 2003). Entretanto, por este método, SpHL-CDDP formados não foram capazes de encapsular todo o fármaco disponível, o que leva à necessidade de uma nova etapa de purificação dos lipossomas antes da utilização, dificultando a praticidade de seu uso na clínica.

Tabela 10 - Caracterização de SpHL-CDDP obtida pelo método DRV

Amostra*	Concentração	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Concentração	Teor de encapsulação (%)
	inicial de CDDP (mg/mL)			de CDDP encapsulada (mg/mL)	
SpHL	---	124,4 ± 12,2	0,04 ± 0,03	---	---
Após liofilização/reidratação					
SpHL-CDDP	0,5	502,2 ± 165,6	0,63 ± 0,32	0,17 ± 0,06	35,84 ± 11,20
SpHL-CDDP	1,0	505,9 ± 102,9	0,37 ± 0,04	0,32 ± 0,03	35,10 ± 3,71

* Os valores são expressos como a média ± desvio padrão (n = 3). As amostras foram liofilizadas com trealose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p).

SpHL-CDDP REV é um produto purificado e disponibilizado para uso imediato. Tem sido demonstrado que lipossomas podem atingir diferentes tumores devido a sua propriedade de circulação por um tempo prolongado e devido ao tamanho reduzido (≤ 500 nm) que permite o extravasamento em tecidos com permeabilidade vascular aumentada, condição frequentemente presente no caso de tumores (YUAN *et al.*, 1995; FERRARI, 2005). Porém, SpHL-CDDP DRV, após a reconstituição do líofilo, forma vesículas grandes com uma elevada quantidade de CDDP não encapsulada. O diâmetro resultante após a etapa de liofilização/reconstituição das vesículas está próximo ou acima de 500 nm (Tabela 10) e heterodispersos, o que está fora dos limites almejados para uma formulação antitumoral intravenosa. Para tanto, seria necessária a inclusão de uma nova etapa de calibração das vesículas. A presença da trealose, nas fases aquosas interna e externa dos lipossomas, não foi capaz de manter o diâmetro das vesículas após o processo de liofilização/reidratação.

CAPÍTULO 2

***Desenvolvimento do programa de liofilização
de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada
contendo cisplatina***

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desafio da utilização de lipossomas como um produto comercial é sua relativa instabilidade em dispersões aquosas. Estes podem sofrer degradação química e física, eventualmente resultando em reduzida eficácia devido ao decréscimo de qualidade da formulação, e em alguns casos, pela formação de produtos de degradação que levam a efeitos indesejáveis. Para contornar os fenômenos de instabilidade em meio aquoso, a liofilização é o processo mais utilizado para a obtenção do produto na forma seca, e desta forma aumentar o tempo de armazenamento destas formulações.

Para melhorar a produção comercial e assegurar a qualidade dos medicamentos lipossomais de alto custo, os parâmetros críticos do processo de liofilização devem ser otimizados. A otimização de um ciclo de liofilização significa a redução da duração do ciclo. Apesar de a liofilização aumentar o tempo de prateleira dos produtos lipossomais, os estresses impostos durante as etapas do processo podem levar à ruptura da estrutura das vesículas. Sendo assim, para promover a estabilidade física durante o processo de liofilização, agentes crioprotetores, como os açúcares, têm sido utilizados.

Neste capítulo estão relatadas a caracterização dos lipossomas e a determinação de temperaturas críticas para fins de definição de um programa de liofilização adequado para SpHL-CDDP. Esta parte da tese foi realizada em colaboração científica com o Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo e a Dra. Camila Figueiredo Borgognoni, no Laboratório de Física Industrial, do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a produção de SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP, em escala laboratorial (método 1) e em escala piloto (método 2) do método REV foram os mesmos descritos no Capítulo 1.

A sacarose, a trealose dihidratada e a glicose foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) é da marca Cerestar (Hammond, IN, EUA).

2.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a produção em escala laboratorial (método 1) e em escala piloto (método 2) do método REV, bem como aqueles utilizados para a caracterização do diâmetro, potencial zeta e teor de encapsulação são os mesmos descritos no Capítulo 1.

As temperaturas de colapso foram determinadas no microscópio óptico acoplado ao liofilizador LYOSTAT *Cryostage* (FDCS 196) equipado com câmara de liofilização (FDCS 196), sistema de refrigeração com nitrogênio líquido (LNP94/2) e sistema de controle de temperatura (TMS 94), da Linkam Scientific Instruments (Surrey, Reino Unido) e com bomba de vácuo Edwards E2M1.5 (Inglaterra). O sistema de liofilização é integrado com um microscópio polarizado Nikon Elipse E600 (Nikon, Japão) e câmera digital (Imasys, Suresnes, França).

O programa de liofilização foi desenvolvido no Liofilizador Microprocessado FTS Systems, Modelo TDS-00209-A, dotado de central de controle, bomba de vácuo, extrator de amostras, analisador do ponto de orvalho e sistema de fechamento de amostras (Nova Iorque, EUA), controlado pelo programa *Liphaware*.

A umidade residual das amostras liofilizadas foi obtida no analisador de umidade Vapor PRO Rx Computrac, Arizona Instrument (Chandler, Arizona, EUA).

Os lipossomas foram analisados em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Philips CM 120 (Worcester, Massachusetts, EUA). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio eletrônico de emissão de campo de catodo frio

(*field-emission gun scanning electron microscopy* - FEG-SEM), da marca JEOL JSM-7401F (Tóquio, Japão).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação de lipossomas para o estudo de congelamento-descongelamento e da liofilização

A preparação dos lipossomas (SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP) foi realizada segundo método REV (SZOKA; PAPAHAJIOPOULOS, 1978). Após a etapa de formação das vesículas lipídicas, a produção foi efetuada por dois métodos distintos, que foram denominados como **Método 1**, a produção de lipossomas em pequena escala; e **Método 2**, a produção em escala piloto, conforme descrito no Capítulo 1.

2.2.1.1 Produção de lipossomas pelo método REV em escala piloto (método 2) com alteração na composição lipídica

A fim de se avaliar o efeito protetor do DSPE-mPEG₂₀₀₀ durante a etapa de congelamento de lipossomas brancos, foram produzidos SpHL sem o fosfolípide DSPE-mPEG₂₀₀₀ (SpHL sem PEG). Estes lipossomas foram produzidos em escala piloto (método 2), na concentração lipídica de 40 mM, na proporção molar DOPE:CHEMS 6:4.

2.2.2 Utilização de substâncias crioprotetoras

A sacarose, trealose, HP- β -CD e glicose foram testadas quanto à sua capacidade crioprotetora e lioprotetora quando adicionadas às formulações lipossomais. A influência da presença destas substâncias, utilizadas separadamente nas formulações, sobre o teor de encapsulação, diâmetro das vesículas e potencial zeta, após os processos de congelamento/descongelamento e o processo de liofilização foram avaliadas.

A concentração escolhida para os testes baseou-se na relação peso/peso (p/p) entre os crioprotetores e os fosfolípidos presentes na formulação, na relação 2:1. As soluções de crioprotetores eram isotônicas em relação à solução encapsulada.

A solução de NaCl 0,9 % (p/v) foi utilizada como fase aquosa em SpHL, e solvente da CDDP em SpHL-CDDP. Quando da utilização de um açúcar na fase aquosa externa lipossomal, a massa de NaCl foi ajustada de modo a se manter a isotonicidade do sistema.

A massa de crioprotetor e de NaCl, usado como isotonzante, foram pesados em balança analítica e dissolvidos na fase aquosa externa dos lipossomas (SpHL ou SpHL-CDDP). A solução de glicose 5 % (p/v) é uma solução isotônica e à esta não foi adicionado NaCl (Quadro 3).

Quadro 3 - Relação das soluções de crioprotetores empregados no preparo dos lipossomas

Carboidrato	Trealose	Sacarose	HP- β -CD	Glicose
Isotonizante	5 %	5 %	5 %	5 %
NaCl (%)	0,45	0,45	0,80	---

2.2.3. Estudo da etapa de congelamento

2.2.3.1 Estudo de congelamento-descongelamento

Os lipossomas (SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP) foram congelados através do resfriamento rápido (imersão em nitrogênio líquido) ou lento, por resfriamento gradual em um liofilizador piloto, modelo SMH45, Usifroid (Maurepas, França).

2.2.3.1.1 Congelamento rápido

Amostras de 1,0 mL de lipossomas (SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP), produzidos segundo método REV n°1, acrescidos de um dos seguintes crioprotetores (sacarose, trealose, HP- β -CD ou glicose; razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) ou na ausência de substância crioprotetora foram submetidos ao congelamento rápido pela imersão em nitrogênio líquido, por 5 minutos ou em freezer a -80°C , por 15 minutos. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Todas as amostras foram caracterizadas quanto ao diâmetro das vesículas, antes e após a etapa de congelamento, conforme descrito no item 2.3.1 do capítulo 1.

Ainda, SpHL-CDDP, após o descongelamento, foram homogeneizados e ultracentrifugados. O sobrenadante foi dosado por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite para determinar o teor de CDDP liberado após a etapa de congelamento, conforme descrito no item 2.3.2.2 do capítulo 1.

2.2.3.1.2 Congelamento lento

Amostras de 1,0 mL de lipossomas (SpHL e SpHL sem PEG), produzidos segundo método REV n°2, acrescidos de um dos seguintes crioprotetores (sacarose, trealose, HP- β -CD ou glicose; razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) ou na ausência de substância crioprotetora foram submetidos ao congelamento lento, sob uma das 4 condições listadas a seguir:

- a. 0,5 °C/minuto até -20 °C
- b. 0,5 °C/minuto até -40 °C
- c. 1,0 °C/minuto até -20 °C
- d. 1,0 °C/minuto até -40 °C

Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente para descongelamento. Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro das vesículas, antes e após a etapa de congelamento, conforme descrito no item 2.3.1 do capítulo 1.

2.2.4 Determinação da temperatura de colapso

SpHL, produzidos segundo método REV n°2, na ausência ou contendo os crioprotetores sacarose, trealose, HP- β -CD ou glicose, na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p), foram submetidos à microscopia óptica acoplada à liofilização, no equipamento Lyostat (Figura 23).

Uma gota de 2 μ L foi colocada entre uma lâmina de quartzo (inferior) e uma lâmina de vidro (superior) no centro da câmara de liofilização. Adicionalmente, um espaçador de metal (70 μ m de espessura) foi colocado entre as duas lâminas para garantir uma espessura constante da amostra.

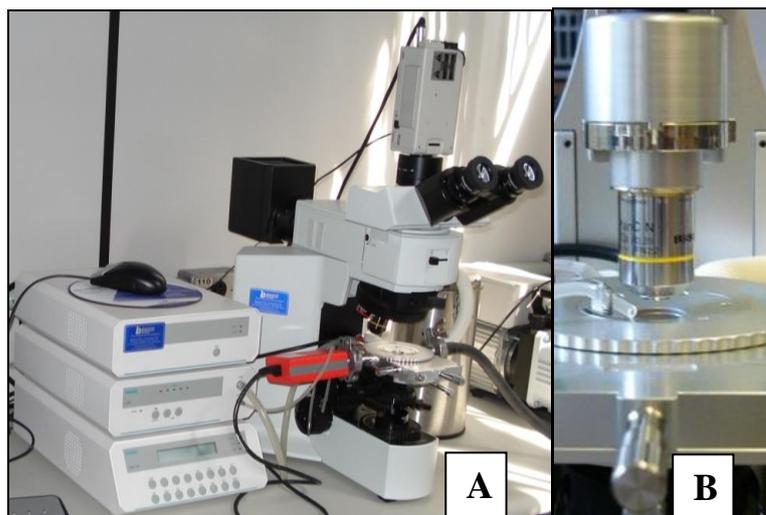


Figura 23 - Microscópio óptico acoplado ao liofilizador (A). Detalhe da objetiva do microscópio óptico e da câmara de liofilização (B).

A temperatura de colapso de cada amostra foi determinada da seguinte maneira: uma área que permite a visualização de parte da borda da gota foi ajustada para ser observada. Inicialmente, a amostra foi resfriada em uma razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ para atingir uma temperatura igual a -70°C . Depois de mantida a -70°C por 5 minutos, a amostra foi então aquecida em uma rampa de $2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir a temperatura de 25°C e seca sob pressão reduzida (150 mTorr). A interface de sublimação foi monitorada até que ocorresse o fenômeno do colapso.

O processo de liofilização foi monitorado em tempo real sob um campo de luz polarizada usando uma objetiva de 10x. Imagens digitais da amostra foram capturadas. A temperatura de colapso de cada amostra foi determinada durante a revisão de cada imagem capturada para análise do momento exato da perda de estrutura da amostra, com o programa LinkSys32 (programa de controle de temperatura e captura do vídeo).

Na etapa de congelamento foi observada a temperatura de nucleação ou temperatura de cristalização da água contida na amostra lipossomal, pela observação da primeira imagem de uma estrutura congelada da amostra.

O primeiro defeito estrutural ou escarificação da amostra (presença de fissuras ou buracos) dentro da frente de sublimação indicou o ponto de colapso. Finalmente, a temperatura de colapso foi determinada como a temperatura imediatamente antes da modificação estrutural.

2.2.5 Liofilização dos lipossomas

2.2.5.1 Liofilização de SpHL

Amostras de 1 mL de lipossomas brancos (SpHL), produzidos segundo método REV nº2, contidos em frascos de vidro, na ausência ou contendo os crioprotetores sacarose, trealose, glicose ou HP- β -CD, na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p) foram liofilizados segundo o protocolo: 1) congelamento a -50°C ; 2) secagem primária a -35°C e 100 mTorr; 3) secagem secundária a 25°C e 100 mTorr (Figura 24).



Figura 24 – Liofilizador microprocessado FTS Systems.

Depois de atingida a temperatura de -50°C , as amostras foram mantidas nesta temperatura por 60 minutos. A razão de congelamento foi de $1,0^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. A duração das etapas de secagem foi determinada pelo intervalo de tempo até que fosse atingida a temperatura de orvalho (*Dew point*) igual a -80°C na câmara de liofilização. A liofilização de todas as amostras foi realizada sob as mesmas condições quanto à temperatura do produto e pressão da câmara. Ao final do processo, os frascos foram regravados sob pressão reduzida.

As dispersões lipossomais submetidas ao congelamento rápido foram liofilizadas sob as mesmas condições descritas para o congelamento lento, com distinção somente na primeira

etapa do ciclo. As amostras foram congeladas por imersão em nitrogênio líquido por 5 minutos. A placa do liofilizador foi pré-resfriada até -50°C . Quando o produto atingiu aproximadamente -50°C , o equipamento foi acionado para o próximo passo da liofilização (secagem primária).

A medição da temperatura do produto durante a liofilização foi feita através da inserção de termopares no material. Quando a liofilização é feita em frascos ou em prateleiras, os termopares são inseridos no fundo do recipiente para registrar a temperatura do produto na secagem primária, quando todo o gelo for sublimado (Figura 25).

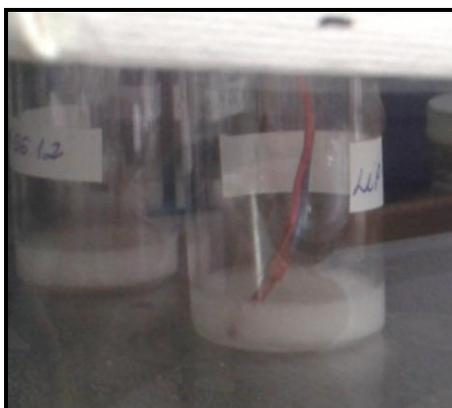


Figura 25 – Fotografia ilustrativa do termopar inserido no produto.

2.2.5.2 Liofilização de SpHL-CDDP

Amostras de 1 mL de SpHL-CDDP, produzidos segundo método REV n°2, contidos em frascos de vidro, contendo trealose, na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p) foram liofilizados segundo o protocolo: 1) congelamento a -50°C ; 2) secagem primária a -35°C e 100 mTorr; secagem secundária a 25°C e 100 mTorr.

Depois de atingida a temperatura de -50°C , as amostras foram mantidas nesta temperatura por 60 minutos. A razão de congelamento foi de $1,0^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. A duração das etapas de secagem foi determinada pelo intervalo de tempo até que fosse atingida a temperatura de orvalho igual a -80°C na câmara de liofilização. Ao final do processo, os frascos foram recravados sob pressão reduzida.

2.2.6 Determinação da absorção de umidade em SpHL-CDDP após armazenamento em diferentes condições de umidade

Amostras de 1,0 mL de SpHL-CDDP, contendo trealose na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p) foram submetidos à liofilização, conforme protocolo descrito no item 2.2.5.2. Cada amostra de líofilo formado continha aproximadamente 50 mg de pó. Cinco amostras de líofilo de SpHL-CDDP foram armazenadas em dessecadores herméticos contendo no fundo do recipiente diferentes soluções salinas saturadas, as quais produzem umidade relativa de ar própria de cada sal em uma determinada temperatura. Os dessecadores contendo as amostras foram mantidos a 25°C, sob vácuo, dentro de uma incubadora tipo B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio). As umidades relativas testadas estão descritas no Quadro 4. As amostras foram pesadas em intervalos de 24 horas até atingirem peso constante. Desta forma, foi determinada a umidade de equilíbrio das amostras.

Quadro 4 - Umidade relativa de equilíbrio de soluções salinas saturadas a 25°C

Solução saturada de sal	Umidade relativa (%)
Hidróxido de potássio	8,00
Cloreto de magnésio	32,50
Brometo de sódio	55,00
Cloreto de sódio	75,10
Cloreto de bário	90,00

Fonte: HONG *et al.*, 2005.

2.2.7. Caracterização físico-química dos lipossomas

2.2.7.1 Determinação do diâmetro e do potencial zeta das vesículas

A análise do diâmetro das partículas foi efetuada por meio de espectroscopia de correlação de fótons utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). Para a realização das medidas foram utilizados 30 µL de lipossomas diluídos em 3 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v), até que se obtivesse a contagem adequada de partículas. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas.

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas 250 vezes, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°.

2.2.7.2 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP

A determinação da porcentagem de CDDP encapsulada foi realizada por GF-AAS, conforme descrito no item 3.1 do Capítulo 1.

O teor de encapsulação (TE) da CDDP em SpHL-CDDP foi calculado mediante a determinação da porcentagem da concentração de CDDP presente nos lipossomas purificados (Lip Purificado) e a concentração de CDDP presente nos lipossomas antes da purificação (Lip Total), como indicado na equação discriminada abaixo:

$$TE = \frac{[CDDP]_{Lip\ Purificado} \times 100}{[CDDP]_{Lip\ Total}}$$

2.2.7.3 Análise qualitativa macroscópica dos lipossomas liofilizados

Os lipossomas liofilizados foram visualmente observados para detectar quaisquer craqueamento ou colapso da formulação após o processo de liofilização. Imagens da estrutura macroscópica (em frascos de vidro) dos produtos liofilizados colapsados ou não colapsados foram registradas.

2.2.7.4 Determinação da umidade residual dos lipossomas liofilizados

A análise de umidade residual dos lipossomas liofilizados (SpHL e SpHL-CDDP) foi feita no equipamento Vapor PRO. Este equipamento aquece uma amostra contida em um frasco até a temperatura de 100°C. A umidade contida na amostra é arrastada por uma corrente de gás nitrogênio ultrapuro seco, e a sua porcentagem é determinada mediante a detecção por um sensor de umidade, o qual registra o sinal de variação da umidade. Uma massa de aproximadamente 0,1000 g foi exatamente pesada em frascos próprios do

equipamento e submetidos à análise. Os dados obtidos são apresentados em teor de umidade percentual.

2.2.7.5 Determinação do tempo de reidratação dos lipossomas liofilizados

Os lipossomas liofilizados foram reidratados, à temperatura ambiente, com 1 mL de água purificada, que é um volume similar ao que foi retirado da amostra durante a liofilização. O tempo de reidratação, definido como o tempo requerido para a completa dispersão do líofilo sob inspeção visual direta, foi registrado. Em seguida, a dispersão lipossomal foi submetida à agitação, com auxílio do vórtex, por 1 minuto.

2.2.7.6 Determinação da retenção da CDDP em SpHL-CDDP

Amostras de 1,0 mL de SpHL-CDDP, acrescidos de um dos seguintes crioprotetores (sacarose, trealose, HP- β -CD ou glicose; razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) ou na ausência de substância crioprotetora foram submetidos ao congelamento/descongelamento.

Imediatamente após o congelamento/descongelamento, as amostras foram homogeneizadas e ultracentrifugadas a 150000 x g, a 10 °C, durante 90 minutos. Após a ultracentrifugação, o pellet foi reconstituído pela adição de solução de NaCl 0,9 % (p/v), seguida de agitação sob vórtex, formando os lipossomas purificados.

Os lipossomas foram submetidos à ultracentrifugação, após o congelamento/descongelamento, visando avaliar a influência do congelamento sobre a retenção da CDDP encapsulada nos lipossomas. Os lipossomas purificados foram analisados por GF-AAS.

Amostras de SpHL-CDDP contendo trealose e liofilizadas conforme protocolo descrito no item 2.2.5.2, também foram submetidos a análise do teor após a reidratação dos lipossomas liofilizados, imediatamente após a reidratação e após armazenamento em diferentes condições de umidade, conforme protocolo da determinação da retenção da CDDP em SpHL-CDDP.

2.2.7.7 Análises microscópicas

2.2.7.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises morfológicas foram conduzidas utilizando um microscópio eletrônico (Philips CM 120, 80 Kv). Uma amostra de 100 µL de SpHL foi misturada com igual volume de uma solução corante, cuja composição está descrita no Quadro 5. Uma gota desta mistura foi colocada sobre o suporte, o excesso de amostra foi removido com auxílio de papel absorvente, e foi mantida em repouso até secagem. SpHL congelados por resfriamento rápido ou lento, contendo ou não substâncias crioprotetoras na formulação, foram analisadas por MET.

Quadro 5 – Composição da solução para contraste utilizada na microscopia eletrônica de transmissão

Ácido fosfotúngstico (PTA).....	2,0 g
Fenol.....	0,2 mL
Sacarose.....	0,5 g
Albumina	0,5 g
Solução de NaOH 0,1 N.....	qs pH 7,0-7,2
Água destilada qsp.....	100 mL

2.2.7.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de SpHL, liofilizados na ausência de crioprotetor, e de SpHL-CDDP, liofilizados com trealose, segundo protocolo descrito nos itens 2.2.5.1 e 2.2.5.2, respectivamente, foram analisados em sua superfície em microscópio eletrônico de varredura, com detector de elétrons secundários (LEI) a 1,00 kV e aumento de 250 a 5000 vezes.

As amostras foram fixadas em suportes, com fita adesiva de cobre de dupla face e não sofreram recobrimento.

2.3. Análise estatística

Os valores médios e os desvios padrão (d.p.) foram calculados para todos os experimentos descritos acima. A análise estatística foi feita através do teste t ou pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Tukey, usando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Para todas as análises, adotou-se o intervalo de confiança de 95 % e um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento de um programa de liofilização – Estudo da etapa de congelamento

3.1.1 Efeito do congelamento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL

3.1.1.1 Congelamento rápido de SpHL

SpHL, produzidos segundo método REV nº2, foram submetidos ao congelamento rápido em nitrogênio líquido, por 5 minutos, e descongelados à temperatura ambiente. O diâmetro das vesículas, congeladas na presença dos diferentes crioprotetores, não sofreu alteração e as preparações mantiveram-se como dispersões homogêneas (i.p. < 0,2) (Tabela 11). Contudo, SpHL congelados na ausência de uma substância crioprotetora, resultou na formação de agregados e numa distribuição heterogênea das vesículas (i.p. > 1,0) (dados não mostrados).

Tabela 11 – Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL^a

Amostra*	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)
Antes do congelamento		
Lip-S/Criop	106,1 ± 0,00	0,18 ± 0,00
Após congelamento rápido		
Lip-sacarose	103,0 ± 0,2	0,19 ± 0,00
Lip-trealose	101,4 ± 0,9	0,19 ± 0,01
Lip-HP-β-CD	102,1 ± 0,1	0,15 ± 0,02
Lip-glicose	104,5 ± 0,8	0,18 ± 0,00

* Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2). As denominações Lip-S/ Criop, Lip-Sacarose, Lip-Trealose, Lip-HP-β-CD e Lip-glicose referem-se aos SpHL preparados na ausência de crioprotetor, na presença de sacarose, de trealose, de HP-β-CD e de glicose, respectivamente. ^a O congelamento de SpHL foi realizado em nitrogênio líquido, durante 5 minutos.

Quando os lipossomas brancos, produzidos segundo método REV nº 2, foram submetidos ao congelamento em freezer a -80 °C, por 15 minutos, e descongelados a temperatura ambiente, o mesmo perfil de comportamento foi observado em relação a variação do diâmetro das vesículas, tanto na presença quanto na ausência de substâncias crioprotetoras (Tabela 12).

Tabela 12 – Efeito do congelamento rápido (a -80 °C) sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL^a

Amostra*	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão(i.p.)
Antes do congelamento		
Lip-S/Criop	106,1 ± 0,0	0,18 ± 0,00
Após congelamento rápido		
Lip-sacarose	104,7 ± 1,5	0,20 ± 0,01
Lip-trealose	102,8 ± 0,7	0,19 ± 0,01
Lip-HP-β-CD	107,4 ± 0,9	0,14 ± 0,02
Lip-glicose	106,9 ± 3,0	0,18 ± 0,02

* Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2). As denominações Lip-S/ Criop, Lip-Sacarose, Lip-Trealose, Lip-HP-β-CD e Lip-glicose referem-se aos SpHL preparados na ausência de crioprotetor, na presença de sacarose, de trealose, de HP-β-CD e de glicose, respectivamente. ^a O congelamento de SpHL foi realizado em freezer a -80 °C, durante 15 minutos.

3.1.1.2 Congelamento lento de SpHL

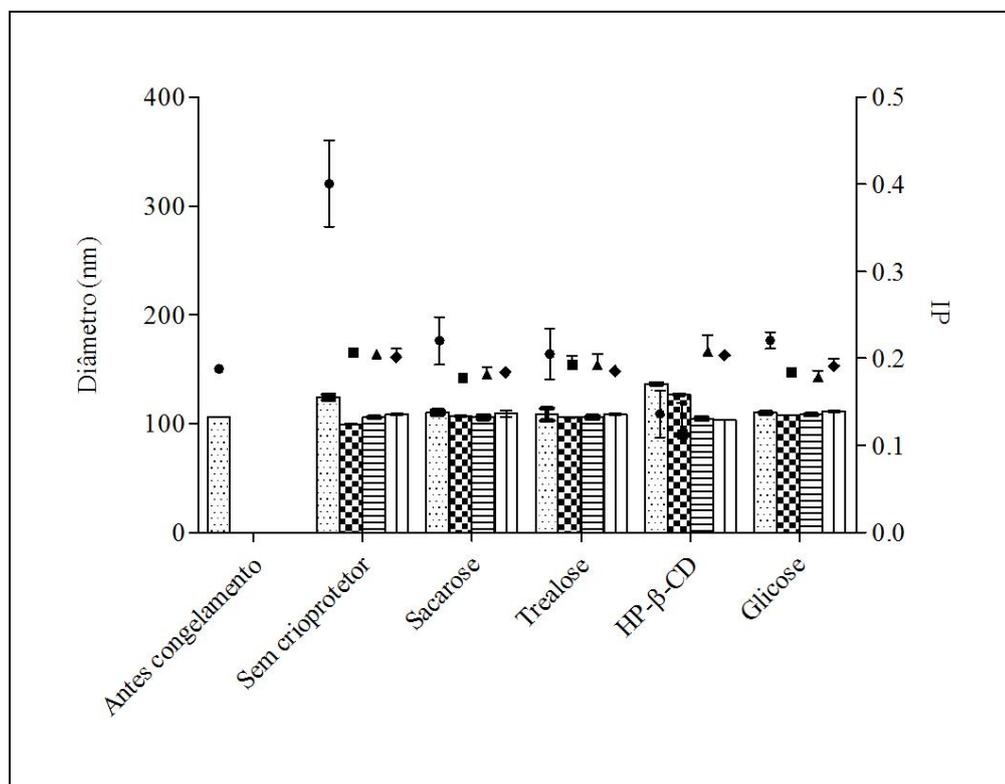


Figura 26 - Efeito do congelamento lento e dos diferentes crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão após o ciclo de congelamento/descongelamento. As colunas representam o diâmetro médio das vesículas e os símbolos sobre cada coluna representam o índice de polidispersão de cada amostra.

- ▤ Rampa de 1°C/min até -40°C
- ▣ Rampa de 0,5°C/min até -40°C
- ▨ Rampa de 1°C/min até -20°C
- ▧ Rampa de 0,5°C/min até -20°C

SpHL submetidos ao congelamento sob condições controladas (0,5°C/minuto até -20°C ou -40°C; ou 1,0°C/minuto até -20°C ou -40°C) não apresentaram alterações do diâmetro das vesículas, nas formulações contendo crioprotetores ou na ausência destes (Figura 26). Preparações de SpHL, que apresentaram diâmetro médio de 106,1 nm, antes da submissão ao congelamento, mantiveram o diâmetro médio entre 104,6 e 136,4 nm, após o congelamento/descongelamento. As preparações apresentaram-se monodispersas (i.p. < 0,2), exceto a preparação sem crioprotetores submetida à rampa de resfriamento de 1,0 °C/minuto até -40 °C, que apresentou índice de polidispersão igual a 0,44.

3.1.2 Efeito do congelamento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG

3.1.2.1 Congelamento rápido de SpHL sem PEG

SpHL sem PEG foram preparados, segundo método REV n° 2, a fim de verificar a contribuição da composição lipídica da formulação sobre a manutenção do diâmetro das vesículas na etapa de congelamento. As preparações de SpHL sem PEG, congeladas na presença de sacarose, trealose e glicose, mantiveram o diâmetro médio das vesículas após o congelamento rápido (-196 °C) e distribuição homogênea (i.p. < 0,2). O congelamento rápido, na ausência de uma substância crioprotetora, resultou em aumento de 5,6 vezes no diâmetro médio das vesículas e dispersões heterogêneas em comparação com a formulação antes do congelamento. Em preparações de SpHL sem PEG, contendo HP-β-CD, as dispersões formaram agregados (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG^a

Amostra Lip-S/PEG ^b	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)
Antes do congelamento		
Sem crioprotetor	112,0 ± 3,8	0,19 ± 0,01
Após congelamento rápido		
Sem crioprotetor	628,3 ± 224,3	0,39 ± 0,18
Com Sacarose	149,9 ± 1,0	0,20 ± 0,01
Com trealose	139,9 ± 0,4	0,19 ± 0,00
Com HP-β-CD	3532,3 ± 918,9	1,00 ± 0,00
Com glicose	129,4 ± 3,0	0,21 ± 0,01

O congelamento de SpHL sem a adição de DSPE-mPEG₂₀₀₀ (SpHL sem PEG) foi realizado em nitrogênio líquido, durante 5 minutos. ^b Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2).

3.1.2.2 Congelamento lento de SpHL sem PEG

As preparações de SpHL sem PEG, quando congeladas até -40 °C, na razão de 1°C/minuto apresentaram-se heterodispersas, exceto para a formulação de SpHL sem PEG contendo glicose como crioprotetor. As formulações contendo sacarose, trealose e HP-β-CD levaram à formação de vesículas maiores do que as formulações sem crioprotetores, após o ciclo de congelamento lento/descongelamento (Tabela 14).

Tabela 14 – Efeito do congelamento lento sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL sem PEG^a

Amostra Lip-S/PEG ^b	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)
Antes do congelamento		
Sem crioprotetor	107,1 ± 1,8	0,19 ± 0,02
Após congelamento lento		
Sem crioprotetor	480,2 ± 43,2	0,35 ± 0,00
Com Sacarose	2886,5 ± 283,6	0,56 ± 0,04
Com trealose	2371,1 ± 436,4	0,76 ± 0,35
Com HP-β-CD	1629,0 ± 40,3	0,51 ± 0,00
Com glicose	157,5 ± 49,9	0,24 ± 0,05

^a O congelamento de SpHL sem PEG foi realizado até a temperatura de -40°C, empregando a razão de resfriamento de 1,0 °C/min. ^b Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2).

3.1.3 Efeito do congelamento sobre as características físico-químicas de SpHL-CDDP

3.1.3.1 Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL-CDDP

Para avaliação do efeito da etapa de congelamento sobre a manutenção do diâmetro das vesículas e a capacidade de retenção da CDDP encapsulada após o estresse desta etapa do ciclo de liofilização, SpHL-CDDP foram preparados, segundo método REV nº 1, utilizando na etapa de hidratação do filme lipídico uma solução de NaCl 0,9 % (p/v) contendo cisplatina 2,0 mg/mL. Todas as preparações contendo uma substância crioprotetora foram capazes de manter o diâmetro médio das vesículas (Tabela 15), com as mesmas características apresentadas pelas preparações antes de serem submetidas ao congelamento rápido, exceto a preparação sem crioprotetores, na qual as vesículas apresentaram o dobro do diâmetro médio inicial e dispersões heterogêneas (i.p. 0,67).

Tabela 15 – Efeito do congelamento rápido sobre o diâmetro das vesículas e índice de polidispersão de SpHL-CDDP^a

Amostra SpHL-CDDP ^b	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)
Antes do congelamento		
Sem crioprotetor	141,7 ± 3,7	0,07 ± 0,03
Após congelamento rápido		
Sem crioprotetor	269,1 ± 40,6	0,67 ± 0,33
Com Sacarose	160,3 ± 12,6	0,07 ± 0,03
Com trealose	157,2 ± 14,0	0,08 ± 0,01
Com HP-β-CD	150,0 ± 2,9	0,07 ± 0,04
Com glicose	159,2 ± 14,6	0,06 ± 0,01

^a O congelamento de SpHL-CDDP foi realizado em nitrogênio líquido, durante 5 minutos. ^b Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2).

3.1.3.2 Efeito do congelamento rápido sobre a retenção de CDDP em SpHL-CDDP

Em relação à ação crioprotetora sobre a retenção da CDDP encapsulada após a etapa de congelamento, a presença destas substâncias, na concentração 2:1 p/p (relação fosfolípide:crioprotetor) não impediu a liberação de aproximadamente 50 % de CDDP dos lipossomas (Tabela 16).

Tem sido demonstrado que a quantidade de açúcar para prevenir o extravasamento do material encapsulado é superior à quantidade que é capaz de evitar a fusão dos lipossomas, o que também foi constatado no nosso experimento, uma vez que não foi observado alteração significativa do diâmetro das vesículas após congelamento/descongelamento (CACELA; HINCHA, 2006).

Tabela 16 - Efeito do congelamento rápido sobre a retenção da CDDP em SpHL-CDDP^a

Amostra SpHL-CDDP ^b	[CDDP] mg/mL
Antes do congelamento	
Sem crioprotetor	0,28 ± 0,01
Após congelamento rápido	
Sem crioprotetor	0,18 ± 0,02
Com Sacarose	0,13 ± 0,02
Com trealose	0,14 ± 0,01
Com HP-β-CD	0,12 ± 0,00
Com glicose	0,14 ± 0,02

^a O congelamento de SpHL-CDDP foi realizado em nitrogênio líquido, durante 5 minutos. ^b Os valores são expressos como média ± d.p. (n = 2).

3.2 Comparação do comportamento de SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP frente às diferentes temperaturas e razões de congelamento

Resumidamente, pode-se extrair os seguintes resultados após o estudo de congelamento/descongelamento dos lipossomas brancos (SpHL e SpHL sem PEG) e de SpHL-CDDP (Quadro 6).

Quadro 6 – Comparação do efeito do congelamento sobre o diâmetro médio das vesículas de SpHL, SpHL sem PEG e SpHL-CDDP

Amostra	Tipo de congelamento	Sem Crioprotetores*	Com crioprotetores
SpHL	Congelamento rápido (-196 °C)	(+)	(=)
	Congelamento rápido (-80 °C)	(+)	(=)
	Congelamento lento	(=)	(=)
SpHL sem PEG	Congelamento rápido (-196 °C)	(+)	(=); HP-β-CD (+)
	Congelamento lento	(+)	(+); glicose (=)
SpHL-CDDP	Congelamento rápido (-196 °C)	(+)	(=)

*Os símbolos (+) e (=) representam o aumento e a manutenção do diâmetro médio das vesículas, respectivamente, em relação às amostras antes da etapa de congelamento.

Para SpHL:

- ✓ No congelamento rápido sem crioprotetores, SpHL sofreu aumento do diâmetro das vesículas;
- ✓ Os crioprotetores foram capazes de manter o diâmetro das vesículas após o congelamento rápido e lento;
- ✓ No congelamento lento, SpHL foi capaz de manter o diâmetro das vesículas sem a adição de crioprotetores.

Para SpHL sem PEG:

- ✓ No congelamento rápido e lento sem crioprotetores, houve aumento do diâmetro das vesículas.
- ✓ Somente a HP-β-CD não foi capaz de impedir o aumento do diâmetro das vesículas de SpHL sem PEG no congelamento rápido.
- ✓ Somente a glicose foi capaz de manter o diâmetro das vesículas de SpHL sem PEG no congelamento lento.

Para SpHL-CDDP:

- ✓ Os crioprotetores foram capazes de proteger SpHL-CDDP no congelamento rápido.

O congelamento é uma etapa crítica na liofilização de nanossistemas. A generalização de que um congelamento rápido sempre leva a partículas com uma boa redispersibilidade deve ser considerada. Quando um crioprotetor está presente, a água é transformada em cristais de gelo e as partículas formam uma fase líquida crioconcentrada. O crioprotetor vitrifica em uma temperatura específica, e a matriz vítrea do crioprotetor protege os lipossomas do estresse mecânico dos cristais de gelo. O congelamento rápido resulta em cristais de gelo mais finos, que causam menor dano à bicamada lipídica e produzem uma estrutura altamente ordenada; o crioprotetor é uniformemente distribuído, e portanto, a crioconcentração é diminuída. Em contraste, o congelamento lento produz cristais de gelo maiores que são prejudiciais à integridade da membrana, resultando em uma estrutura desordenada e com reduzida área superficial (LEE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010).

O congelamento lento de SpHL foi capaz de manter o diâmetro das vesículas. De modo contrário, o diâmetro aumentou para as preparações de SpHL sem PEG, exceto quando foi utilizada a glicose como crioprotetor. Pode-se supor que este comportamento diferenciado frente ao processo de congelamento é decorrente da composição lipídica das duas formulações citadas. A presença de DSPE-mPEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica pode conduzir à diferentes transições de fase da bicamada durante o congelamento. Primeiramente, a bicamada de SpHL, teoricamente mais rígida do que a bicamada de SpHL sem DSPE-mPEG₂₀₀₀, foi capaz de suportar de modo mais eficaz o estresse mecânico durante o congelamento, o que não ocorreu para as amostras de SpHL sem PEG. A presença do DSPE-mPEG₂₀₀₀ na composição de SpHL foi efetiva na estabilidade física dos lipossomas e impediu a agregação das vesículas durante o congelamento lento. Stark e colaboradores (2010) sugerem que as cadeias de polietilenoglicol contribuem no impedimento da agregação das vesículas por inibirem a formação de cristais de gelo na camada de hidratação formada pelo PEG na superfície das vesículas lipossomais de forma semelhante ao que ocorre na presença de outros compostos polihidroxilados. Armstrong e colaboradores (2002) também observaram que a presença de fosfolípide acoplado ao polímero de polietilenoglicol evita a interação entre as partículas durante a liofilização devido ao impedimento estérico gerado pelas cadeias do polímero.

No congelamento lento, SpHL foi capaz de manter o diâmetro das vesículas sem a adição de crioprotetores. O congelamento lento permite às vesículas um maior tempo para

escapar das deformações da força mecânica e da pressão induzida pela formação dos cristais de gelo antes do crioconcentrado ser solidificado abaixo da T_g' (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Entretanto, no congelamento rápido sem crioprotetores, SpHL e SpHL-CDDP sofreram aumento do diâmetro das vesículas; enquanto que na presença de crioprotetores o diâmetro das vesículas foi preservado após a etapa de congelamento rápido. Isso pode ser explicado pois quando dispersões de lipossomas contendo crioprotetores são congeladas abaixo da T_g' , os crioprotetores formam uma matriz vítrea em torno das vesículas protegendo-as do estresse mecânico dos cristais de gelo e evitando a agregação. Porém, concentrações insuficientes de crioprotetores levam a incompleta cobertura da matriz vítrea ao redor das vesículas, favorecendo a agregação.

O estado vítreo é um estado metaestável, o qual apresenta baixa mobilidade molecular devido a sua elevada viscosidade. A estabilidade física e química de um composto incorporado em uma fase vítrea é determinada principalmente pela temperatura de transição vítrea (T_g) (VAN WINDEN *et al.*, 1998). Muitos açúcares têm sido usados como protetores durante a liofilização, incluindo monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e sacarídeos sintéticos. Dissacarídeos, particularmente trealose e sacarose, são acumulados em uma extensa variedade de organismos que sobrevivem ao estresse osmótico ou a severa desidratação por longos períodos. Eles são efetivos na proteção da integridade da membrana e na prevenção do extravasamento devido a sua temperatura de transição vítrea (T_g) relativamente elevada (T_g da sacarose e trealose é igual a 65 °C e 107 °C, respectivamente), o que os torna os crioprotetores de escolha durante a liofilização de lipossomas (YANG *et al.*, 2007; CACELA; HINCHA, 2006). Estudos de Roos (1997) demonstraram que em soluções aquosas crioconcentradas, a sacarose (concentração máxima de soluto igual a 81,7 % p/p) apresentou uma T_g' igual - 46 °C, enquanto que a trealose (concentração máxima de soluto igual a 81,6 % p/p) apresentou T_g' igual a - 40 °C. Os valores de T_g são inversamente proporcionais ao teor de umidade da amostra, ou seja, a medida que a amostra é hidratada, os valores da temperatura de transição vítrea diminuem (CROWE *et al.*, 1998). Logo, a água atua como um plastificante para os carboidratos e diminui a T_g . Portanto, pode-se concluir que os crioprotetores foram capazes de proteger a membrana de SpHL e SpHL-CDDP do estresse mecânico e osmótico da etapa de congelamento.

A glicose também é muito usada como crioprotetor, mas sua T_g relativamente baixa (T_g da glicose é igual a 30 °C) impede uma crioproteção eficiente, que seja capaz de garantir a estabilidade dos lipossomas (CHEN *et al.*, 2010). Entretanto, pode-se sugerir que a glicose em combinação com a camada de PEG, pode melhorar o efeito crioprotetor, devido à manutenção

do diâmetro das vesículas observado para as amostras de SpHL em todas as condições de congelamento.

Embora a manutenção da matriz vítrea seja necessária para a estabilização dos lipossomas no estado desidratado, isto não é por si só suficiente. A diminuição da T_m dos fosfolípides desidratados também é necessária para a manutenção da estabilidade dos lipossomas. A presença de crioprotetores pode prevenir o aumento na permeabilidade da bicamada e extravasamento do material encapsulado durante a reidratação (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Durante a secagem das bicamadas, as moléculas de água que estão entre os grupos polares dos fosfolípides são parcialmente removidas, o que diminui o espaçamento entre as cabeças polares dos fosfolípides. Conseqüentemente, a interação entre as cadeias acila dos fosfolípides torna-se mais forte e a energia necessária para aquecer estas cadeias do estado gel ordenado para o estado líquido cristalino desordenado aumenta. Isto reflete num acentuado aumento da T_m no estado seco em comparação a T_m no estado hidratado. Este fenômeno pode ser inibido na presença dos crioprotetores se houver quantidade suficiente de carboidrato /fosfolípide durante a secagem (CROWE *et al.*, 1998)

Estudos de Crowe e colaboradores (1998) demonstraram que a glicose e o hidroxietilamido isoladamente não são capazes de evitar o extravasamento a partir de lipossomas de fosfatidilcolina. Entretanto, a associação do hidroxietilamido, que possui elevada T_g , com a glicose, resultou na depressão do valor da T_m dos fosfolípides desidratados evitando a fusão e o extravasamento do material encapsulado dos lipossomas. Portanto, o controle do diâmetro das vesículas de SpHL sem PEG na presença de glicose durante o congelamento lento pode ser resultante da diminuição da T_m .

Em teoria, os oligossacarídeos, como a HP- β -CD, podem combinar as vantagens dos sacarídeos de cadeia curta e longa, tendo uma alta T_g , e além disto, sendo flexíveis e suficientemente pequenos para interagirem com os lipossomas. HP- β -CD apresentou resultados similares aos dissacarídeos (sacarose e trealose) e ao monossacarídeo (glicose) utilizados, como em estudos feitos por Abdelwahed e colaboradores (2006). Entretanto, na ausência de PEG, durante o congelamento rápido, a HP- β -CD não foi capaz de manter o diâmetro das vesículas, o que pode sugerir a ocorrência de uma distribuição heterogênea da HP- β -CD durante o congelamento rápido, incapacidade de formação da matriz vítrea na concentração utilizada e/ou baixa interação com a bicamada de SpHL sem PEG.

3.3 Análises microscópicas de SpHL

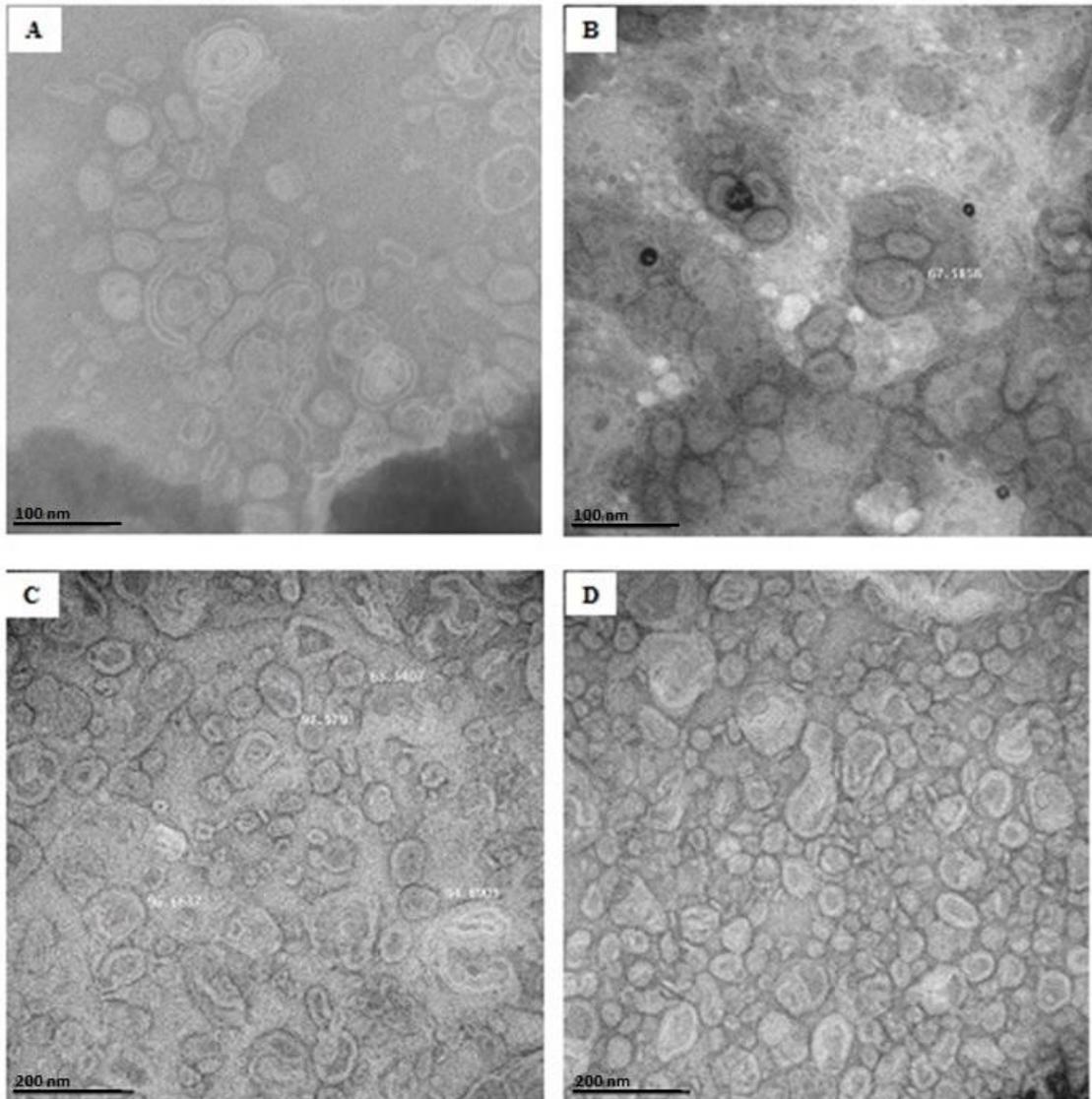


Figura 27 – Fotomicrografias de SpHL antes e após o ciclo de congelamento/descongelamento obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. SpHL sem crioprotetores antes (A) e após (B) o congelamento/descongelamento – razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C; SpHL com trealose após o congelamento na razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (C) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (D).

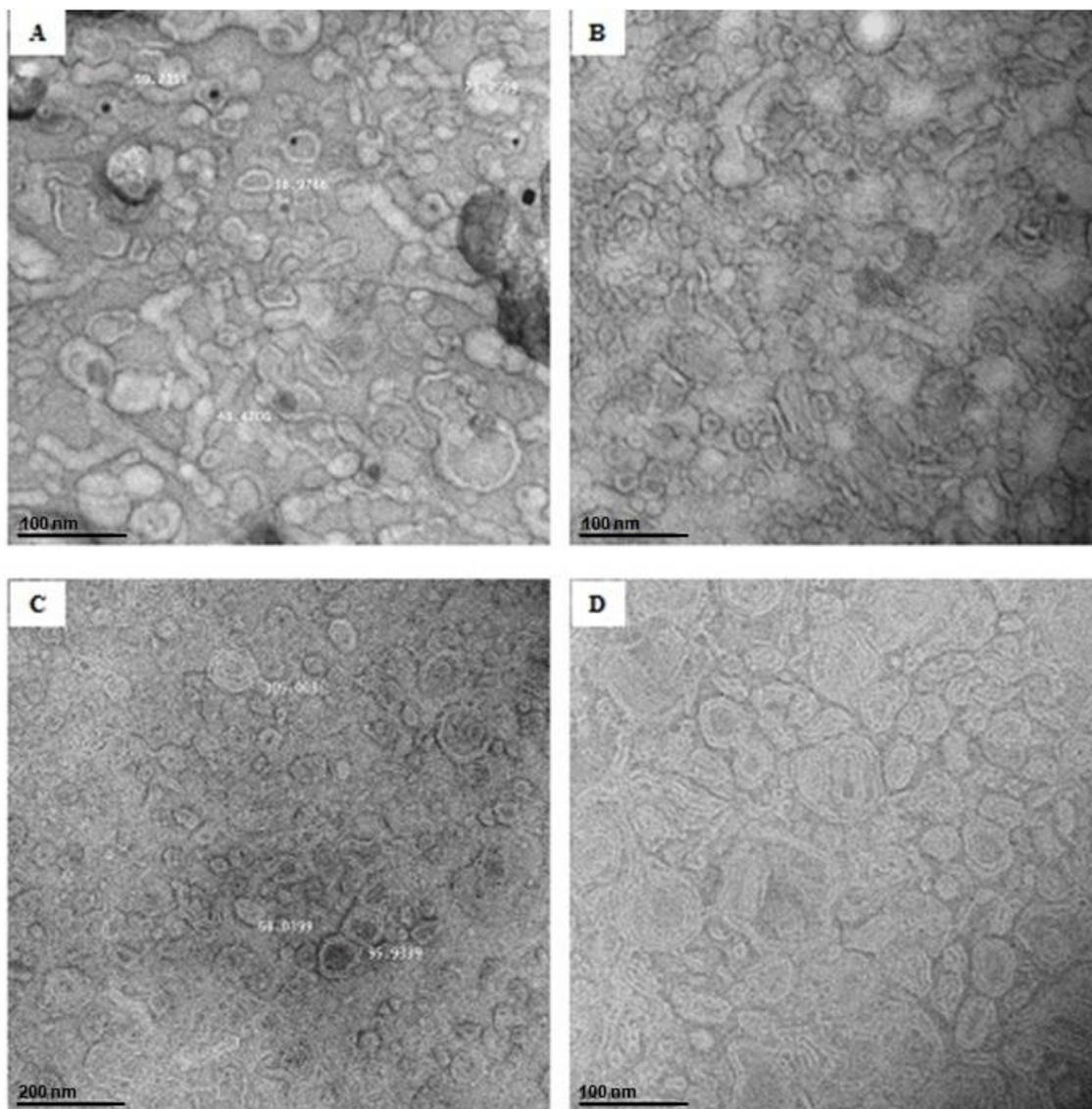


Figura 28 – Fotomicrografias de SpHL antes e após o ciclo de congelamento/descongelamento obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. SpHL HP- β -CD após o congelamento/descongelamento – razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (A) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (B); SpHL com glicose após o congelamento na razão de congelamento de 0,5°C/min até -40°C (C) e após o congelamento por imersão em nitrogênio líquido (D).

A fim de verificar alterações nos lipossomas decorrentes do ciclo de congelamento/descongelamento, foi realizada uma investigação microscópica das diferentes formulações pela técnica de MET. As Figuras 27 e 28 apresentam fotomicrografias das diferentes formulações de SpHL produzidas pelo método REV. Antes do congelamento, foi possível observar a presença de estruturas vesiculares, algumas com formato esférico e outras com formato alongado, com uma predominância de morfologia oligolamelar (Figura 27-A). Após o ciclo de congelamento/descongelamento, na formulação de SpHL sem crioprotetores foram observadas uma grande quantidade de vesículas unilamelares esféricas (Figura 27-B).

Morfologia e lamelaridade semelhantes foram observadas nas vesículas de SpHL com trealose em ambas as condições de congelamento, lento e rápido (Figuras 27-C e 27-D).

Quando o crioprotetor da formulação foi a HP- β -CD, a presença pronunciada de vesículas alongadas foi identificada após congelamento lento e rápido (Figuras 28-A e 28-B). Estes resultados sugerem a ocorrência de fortes interações interfaciais entre a HP- β -CD e as vesículas lipossomais. Pode-se concluir que os oligossacarídeos, em comparação aos dissacarídeos, exercem uma maior pressão sobre as vesículas lipídicas e induzem às mudanças morfológicas. Na presença de glicose, a formação predominante de vesículas esféricas oligolamelares pode ser observada (Figuras 28-C e 28-D). Deve ser destacado que tanto na ausência quanto na presença de substâncias crioprotetoras, o diâmetro das vesículas observado por MET foram menores do que aqueles obtidos por PCS. Estes resultados eram esperados visto que a medida do raio hidrodinâmico é realizada na PCS, a qual leva em consideração a camada de hidratação que está em volta da superfície das vesículas (WESSMAN *et al.*, 2010).

3.4 Determinação das temperaturas críticas para o desenvolvimento do processo de liofilização

3.4.1 Determinação da temperatura de cristalização da água e temperatura de colapso das formulações de SpHL contendo diferentes crioprotetores

SpHL, na ausência ou contendo os crioprotetores sacarose, trealose, glicose ou HP- β -CD, na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p), foram submetidos à microscopia óptica acoplada a liofilização. Foram determinadas as temperaturas de cristalização da água e a Tc das formulações contendo diferentes crioprotetores.

Para o desenvolvimento de um programa de liofilização é essencial que seja determinada a temperatura máxima à qual o produto pode ser submetido durante a secagem primária. Esta temperatura máxima permitida ao produto é denominada Tc e foi determinada por microscopia acoplada à liofilização. A Tc é definida como a temperatura em que um produto amorfo, no estado congelado, não é capaz de suportar sua própria estrutura, durante a etapa de secagem. Modificações estruturais podem ocorrer e estas podem ser visualizadas como “buracos” ou “fendas”. Conseqüentemente, o material não consegue mais manter sua consistência sólida. Estabilidade insuficiente, elevado conteúdo de umidade residual, tempo de reidratação longo, e estruturas heterogêneas da pastilha (*cake*) são resultantes de uma etapa

inadequada de secagem primária, que sempre deve ser conduzida em uma temperatura do produto abaixo da T_c . A T_c é sempre dependente da composição da formulação uma vez que todos os componentes a influenciam (WIEBER *et al.*, 2012).

A determinação da temperatura de cristalização da água (nucleação do gelo) serve como parâmetro para os estudos de annealing (LIU, 2006), cuja aplicação tem crescido no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Após o resfriamento da amostra em temperaturas muito baixas para obtenção da sua solidificação, a formulação congelada é aquecida para temperaturas situadas entre T_g' e a temperatura de fusão do gelo, e mantida por um período de tempo. Nesta temperatura, a água não congelada difunde através da matriz congelada e os cristais de gelo irão aumentar seu tamanho. Também podem ser criados canais devido às conexões entre os cristais de gelo. Como consequência do annealing, a secagem primária pode ter sua duração reduzida. Entretanto, o annealing não foi aplicado neste estudo. Apesar das vantagens do annealing, o aumento da mobilidade molecular durante esta etapa pode causar problemas significativos na estabilidade, como a cristalização de componentes e alterações no pH (LIU, 2006).

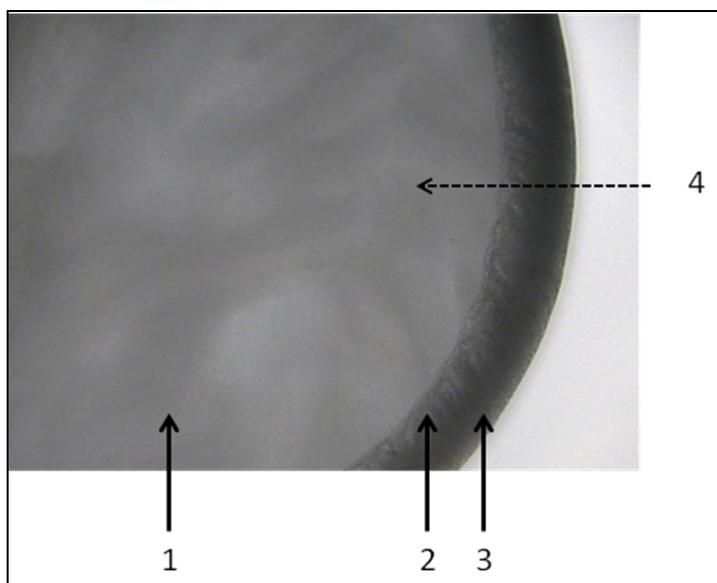


Figura 29 – Imagem descritiva das mudanças do estado físico da amostra de SpHL submetida à liofilização: 1) Camada Congelada 2) Interface de sublimação 3) Camada seca (liofilizada) 4) Movimento de sublimação.

A formulação, na forma de gota, foi visualizada num aumento de 100 vezes. Adicionada ao porta-amostras do microscópio acoplado ao liofilizador, a formulação foi resfriada até -70°C , numa razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a 750 Torr. As mudanças do estado físico da amostra após congelamento estão representadas na Figura 29. A camada congelada (1)

formada foi sublimada em uma razão de 2°C/minuto, quando a pressão da câmara foi reduzida (150 mTorr) e iniciou-se o aquecimento da amostra até a temperatura limite de 25°C. A interface de sublimação (2) segue o movimento (4) em direção ao interior da gota. A camada seca (liofilizada) pode ser visualizada na zona representada pelo nº3 da Figura 29. A Tc é determinada quando é visualizada a formação de fissuras durante a etapa de sublimação.

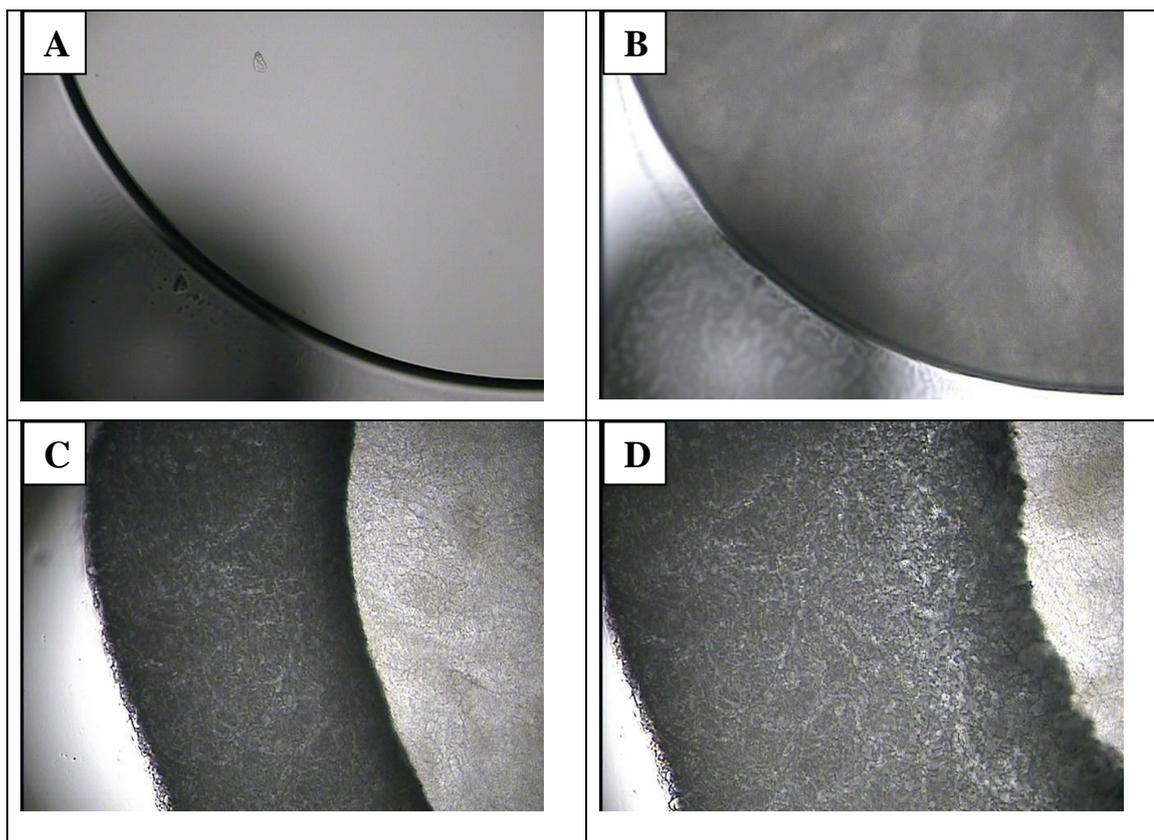


Figura 30 – Fotomicrografias de uma gota de SpHL na ausência de crioprotetor. Temperaturas (A) 25°C; (B)-21°C; (C) -27°C e (D) -30°C. Determinação da Tc por microscopia óptica acoplada a liofilização. Aumento original x100.

A Figura 30 mostra a determinação da Tc em uma dispersão líquida de SpHL, na ausência de crioprotetores. As figuras A e B referem-se à etapa de resfriamento da amostra até -70°C, a 750 Torr. As figuras C e D referem-se à etapa de secagem da amostra, durante o aquecimento de -70°C até +25°C, a 150 mTorr. Na Figura 30-A, a dispersão lipossomal de SpHL sem crioprotetores é visualizada à temperatura ambiente (25°C). A Figura 30-B mostra o momento da cristalização da água contida na amostra, à temperatura de -21°C. Na Figura 30-C, a faixa mais escura representa a camada liofilizada. À medida que a temperatura aumenta, a interface de sublimação segue em direção ao interior da gota. A Figura 30-D

mostra fissuras (pontos brancos) na camada seca. A Tc da formulação de SpHL sem crioprotetores determinada foi de -27°C .

A temperatura de colapso foi determinada em todas as formulações de SpHL contendo crioprotetores. Na Figura 31 está representada a determinação da Tc em uma dispersão líquida de SpHL, contendo glicose na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p). Na Figura 31-A, a gota de SpHL contendo glicose é visualizada à temperatura ambiente (25°C). A Figura 31-B mostra o momento da cristalização da água contida na amostra, à temperatura de -23°C . Na Figura 31-C, a faixa mais escura representa a camada liofilizada. À medida que a temperatura aumenta, a interface de sublimação segue em direção ao interior da gota. A Figura 31-D mostra fissuras (pontos brancos) na camada seca. A Tc da formulação de SpHL com glicose determinada foi de -50°C .

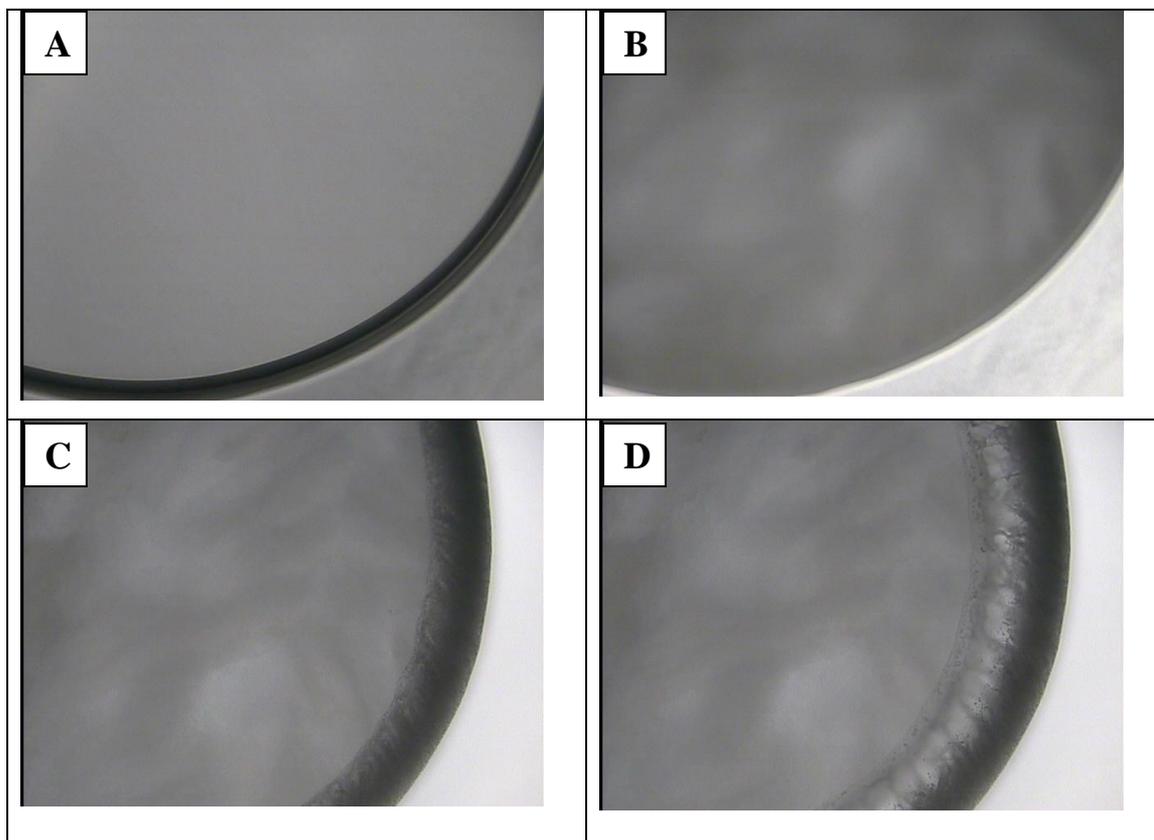


Figura 31 – Fotomicrografias de uma gota de SpHL contendo glicose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p). Temperaturas (A) 25°C ; (B) -23°C ; (C) -50°C e (D) -47°C . Determinação da Tc por microscopia óptica acoplada a liofilização. Aumento original x100.

Na Tabela 17 estão discriminados os valores de temperatura de cristalização (T_{crist}) e Tc determinados por microscopia óptica acoplada a liofilização para as diferentes formulações de SpHL, na ausência ou contendo os crioprotetores.

As temperaturas de cristalização da água determinadas nas formulações de SpHL com ou sem crioprotetores mantiveram-se na faixa de -23°C a -21°C, valores próximos à temperatura eutética da solução aquosa de NaCl que é igual a -22°C (ROOS, 1997). Este resultado é coerente visto que a dispersão de SpHL contém solução da NaCl 0,9 % (p/v) como fase aquosa interna e externa e os carboidratos componentes da formulação possuem Tg' inferiores a -30°C, visto que os valores Tc foram menores à este valor como demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 – Relação das temperaturas críticas de SpHL para o processo de liofilização

Formulação*	Temperatura de cristalização (°C)	Temperatura de colapso (°C)
Lip-S/Criop	-21	-27
Lip-Sacarose	-23	-43
Lip-Trealose	-22	-42
Lip- HP-β-CD	-21	-38
Lip-Glicose	-23	-50

*As denominações Lip-S/Criop, Lip-Sacarose, Lip-Trealose, Lip-HP-β-CD e Lip-Glicose referem-se aos SpHL preparados na ausência de crioprotetor, na presença de sacarose, de trealose, de hidroxipropil-beta-ciclodextrina e de glicose, respectivamente, na concentração crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p).

Embora a Tc de SpHL sem crioprotetores seja -27°C, valor superior às Tc de SpHL com crioprotetores e em tese, quanto maior a Tc, maior a facilidade do trabalho de liofilização, deve ser considerado que o congelamento e a secagem de lipossomas afetam fortemente a estabilidade dos lipossomas devido ao estresse mecânico causado pela formação do gelo durante o congelamento, o que pode danificar as membranas lipossomais. Além disto, o aumento da concentração dos solutos durante o congelamento e a secagem podem levar a uma desestruturação química dos lipossomas. Por isto, a adição de crioprotetores é essencial à formulação, por sua natureza não eutética e pela formação de uma matriz amorfa que protege SpHL.

Durante o congelamento, a maioria da água da amostra gradualmente forma o gelo (até 80 % p/v), levando a formação do crioconcentrado da solução descongelada remanescente até que esta atinja o estado vítreo (YANG *et al.*, 2010). Os carboidratos usados como excipientes nas formulações a serem liofilizadas, são quimicamente inócuos e podem ser facilmente vitrificados durante o congelamento. Os valores de Tg' dos dissacarídeos utilizados, sacarose e trealose são inferiores a -30°C (ROSS, 1997; FRANKS, 1998; CRAIG, 1999;

SUNDARAMURTHI; SURYANARAYANAN, 2012). Na literatura, também foram relatados os valores de Tg' de -15°C para a HP-β-CD (ABDELWAHED *et al.*, 2006; VEGA *et al.*, 2012) e de -43°C para a glicose (ROOS, 1997; ABDELWAHED *et al.*, 2006; EROGLU, 2010). A Tg' depende da composição da solução, mas não de sua concentração inicial (FRANKS, 1998). Neste estudo, a Tg' de SpHL na presença dos crioprotetores não foi determinada, sendo a liofilização baseada nos resultados da Tc de cada formulação (Tabela 17) e comparada aos valores de Tg' da literatura.

Tem sido relatado que a Tc de soluções aquosas de excipientes devem ser 5°C inferior a Tg' (YANG *et al.*, 2010). Todas as Tc determinadas para as dispersões de SpHL contendo crioprotetores apresentaram valores inferiores às Tg' encontradas na literatura (Tabela 17).

Para garantir a natureza porosa do liofilizado, a secagem primária deve ser conduzida a aproximadamente 4°C abaixo da Tg' do crioprotetor e é ideal que a temperatura do produto esteja no mínimo 2 °C abaixo da Tc durante a etapa de secagem primária (CROWE *et al.*, 1994; TANG;PIKAL, 2004). Dado que o aumento de 1°C na temperatura do produto leva a uma redução de 13 % no tempo de secagem primária (TANG;PIKAL, 2004), a importância econômica da escolha racional da temperatura de secagem é clara. Neste trabalho, a temperatura de secagem primária igual a -35°C foi escolhida baseada nas temperaturas de colapso das formulações, na viabilidade econômica do processo e na diferença de temperatura a ser mantida entre a câmara e o condensador do liofilizador. Esta temperatura foi utilizada na liofilização de todas as formulações de SpHL.

Embora esta temperatura seja superior a Tc das formulações de Lip-sacarose, Lip-trealose e Lip-HP-β-CD vale destacar que tipicamente, a temperatura do produto durante a secagem primária é 5 a 40°C menor do que a temperatura da placa (TANG; PIKAL, 2004). Portanto, a temperatura do produto manteve-se abaixo da temperatura da placa, mantendo-se constante a pressão da câmara durante todo o processo de liofilização, conforme registrado na Figura 32 e Tabela 19, para Lip-trealose e na Figura 33 e Tabela 20, para Lip-HP-β-CD. Além disto, a medida que a água vai sendo sublimada, o valor da Tg' aumenta, já que a Tg' é inversamente proporcional ao conteúdo de água. Deste modo, a temperatura do produto foi mantido abaixo da Tg' durante todo o processo de secagem primária.

3.5 Desenvolvimento do programa de liofilização de SpHL

Basicamente, o objetivo de desenvolver um processo de liofilização otimizado está na capacidade deste tipo de estudo fornecer dados e evidências com um alto grau de

reprodutibilidade e confiança. Deste modo, busca-se atingir especificações pré-determinadas para o produto final, através da análise dos parâmetros utilizados durante o processo de liofilização associada às características do produto liofilizado (LIU, 2006).

3.5.1 Liofilização de SpHL contendo crioprotetores, após congelamento lento

SpHL foram liofilizados, na ausência ou contendo os crioprotetores sacarose, trealose, HP- β -CD ou glicose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) segundo o protocolo: 1) congelamento lento até -50°C (razão de resfriamento $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 2) secagem primária a -35°C e 100 mTorr e 3) secagem secundária a $+25^{\circ}\text{C}$ e 100mTorr.

A Figura 32-A representa as diversas formulações de SpHL, sob a forma líquida, antes da liofilização. Esta serve de parâmetro para comparação do aspecto macroscópico do líofilo obtido, principalmente como comparativo da altura da pastilha formada em relação ao volume ocupado pela dispersão líquida antes de ser submetida à liofilização.

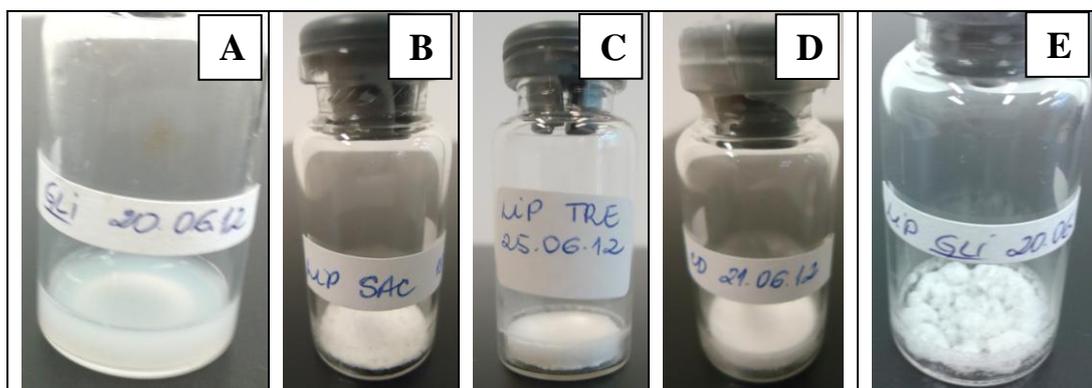


Figura 32 – Aspecto macroscópico de SpHL com diferentes crioprotetores. (A) SpHL antes da liofilização. Após a liofilização: (B) SpHL com sacarose; (C) SpHL com trealose; (D) SpHL com HP- β -CD e (E) SpHL com glicose.

SpHL liofilizados com trealose (Figura 32-C) e HP- β -CD (Figura 32-D) formaram uma pastilha elegante, com altura igual à dispersão líquida submetida à liofilização (Figura 32-A). SpHL com sacarose (Figura 32-B) formou uma pastilha delgada, com altura inferior àquela da dispersão líquida antes da liofilização. SpHL com glicose (Figura 32-E) sofreu colapso, o que é evidenciado pela formação de bolhas no líofilo.

No equipamento utilizado, o liofilizador FTS, a temperatura mínima atingida pela placa é -50°C e esta foi a temperatura mínima utilizada para o bom funcionamento deste. As temperaturas de colapso determinadas para as formulações de SpHL são consideradas muito

baixas, o que dificultam o processo de liofilização (LIU, 2006). A temperatura de -50°C da formulação contendo glicose inviabiliza o trabalho em temperatura abaixo da T_c . Isto pôde ser confirmado pelo colapso da estrutura macroscópica do líófilo de SpHL contendo glicose (Figura 26-E). Por este mesmo motivo, o teor de umidade residual da amostra foi elevado (6,99 %) devido à dificuldade de saída da água durante a secagem secundária.

Na secagem primária, a temperatura da placa foi mantida em -35°C . A força motriz para a sublimação da água durante a liofilização é a diferença entre a temperatura do produto e a temperatura do condensador. Portanto, a temperatura do condensador foi mantida a -85°C , permitindo o mínimo de 50°C de diferença na temperatura de ambos (AYEN; KUMAR, 2012). Considerando a temperatura de colapso determinada para cada crioprotetor e o aspecto macroscópico dos líófilos obtidos de experimentos preliminares, o estudo teve prosseguimento com SpHL na presença de trealose ou HP- β -CD assim como na ausência de crioprotetor, o qual serviu como padrão de verificação da ação dos crioprotetores.

A formulação contendo trealose foi escolhida em detrimento à sacarose, dentre os dois dissacarídeos, considerando que em condições de extrema desidratação, como na liofilização, trealose e sacarose tem ação protetora semelhante. Porém, em meio aquoso, trealose liga-se mais efetivamente aos biomateriais, através de ligações de hidrogênio. A diferença deve-se à orientação espacial dos grupos hidroxilas dos carboidratos (LUZARDO *et al.*, 2000). Já a HP- β -CD, um oligossacarídeo cíclico, apresenta a T_g' igual a -15°C e T_c igual a -38°C , temperaturas mais elevadas dentre os crioprotetores utilizados nesse estudo, e aspecto macroscópico de SpHL contendo HP- β -CD semelhante à formulação de SpHL contendo trealose.

3.5.1.1 Curvas de liofilização de SpHL com diferentes crioprotetores, após congelamento lento

SpHL foram liofilizados após o congelamento lento, na razão de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, na prateleira do liofilizador FTS. Após ser atingida a temperatura da placa de -50°C , o produto foi mantido por cerca de 2 horas nesta temperatura. Após este período, a pressão da câmara foi reduzida até atingir 100 mTorr e a placa foi aquecida até atingir a temperatura de -35°C , dando início à secagem primária. O monitoramento da secagem primária foi feito através do

termo-higrômetro, cujo resultado é expresso pela temperatura do ponto de orvalho (*Dew Point*). A queda desta temperatura reflete a redução da pressão de vapor na câmara do liofilizador. Quando o *Dew Point* atingiu a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, o processo foi alternado manualmente para a etapa seguinte (passagem da etapa de secagem primária para a etapa de secagem secundária). A pressão da câmara foi mantida em 100 mTorr e a temperatura da placa foi elevada para $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. O *Dew Point* neste momento atingiu o valor basal de $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. A detecção do fim da secagem secundária foi feito quando o *Dew Point* atingiu novamente o valor de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As Figuras 33-35 apresentam curvas de liofilização de SpHL, submetidas às condições de liofilização descritas acima, com seus respectivos tempos de liofilização. As curvas mostram os dados de pressão da câmara e temperaturas do condensador, da placa, do produto e do ponto de orvalho, em função do tempo. A duração da liofilização para cada formulação de SpHL foi distinto.

Na análise dos dados registrados pelo *software* durante a liofilização de SpHL, após congelamento lento, foram extraídas a duração de cada etapa do ciclo de liofilização. Em virtude da passagem entre as etapas do ciclo ser realizada manualmente, o equipamento permaneceu na mesma etapa mesmo após o *Dew Point* ter atingido a temperatura almejada ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Logo, para efeito de cálculo da duração de cada etapa, foi considerado somente o período necessário para atingir o *Dew Point* de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A liofilização de SpHL sem crioprotetores teve a duração de aproximadamente 57 horas, sendo o tempo dividido entre aproximadamente 43 horas de secagem primária e 10 horas de secagem secundária. (Figura 33 e Tabela 18).

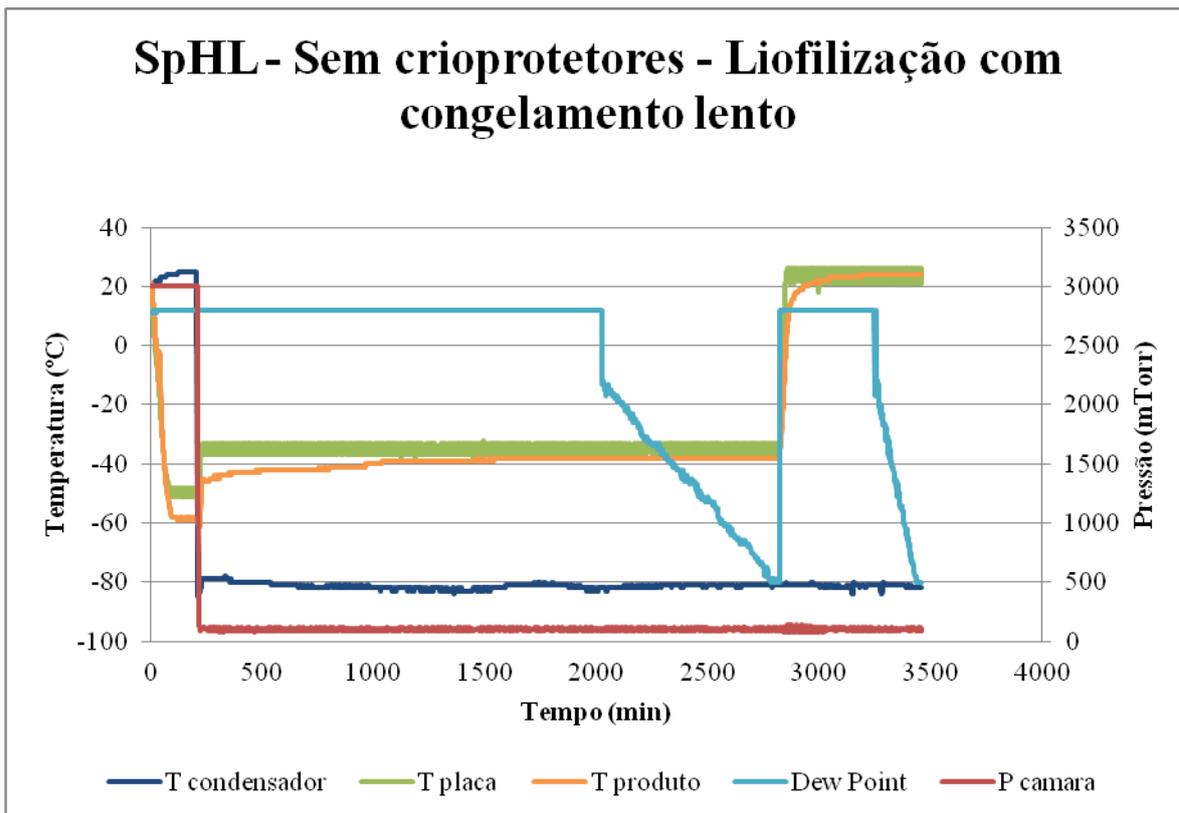


Figura 33 – Curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Duração da liofilização: aproximadamente 57 horas.

Tabela 18 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento lento

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	77	+24	3000	-45	-50	+12
Início da secagem primária	229	-82	103	-35	-50	+12
Fim da secagem primária	2798	-81	95	-33	-38	-80
Fim da secagem secundária	3438	-82	100	+21	+24	-80

Na liofilização de SpHL, contendo trealose, após congelamento lento (Figura 34 e Tabela 19) mostraram a duração de aproximadamente 20 horas para a etapa de secagem primária e, aproximadamente 5 horas na secagem secundária, perfazendo um total de aproximadamente 29 horas no ciclo de liofilização, incluindo a etapa de congelamento.

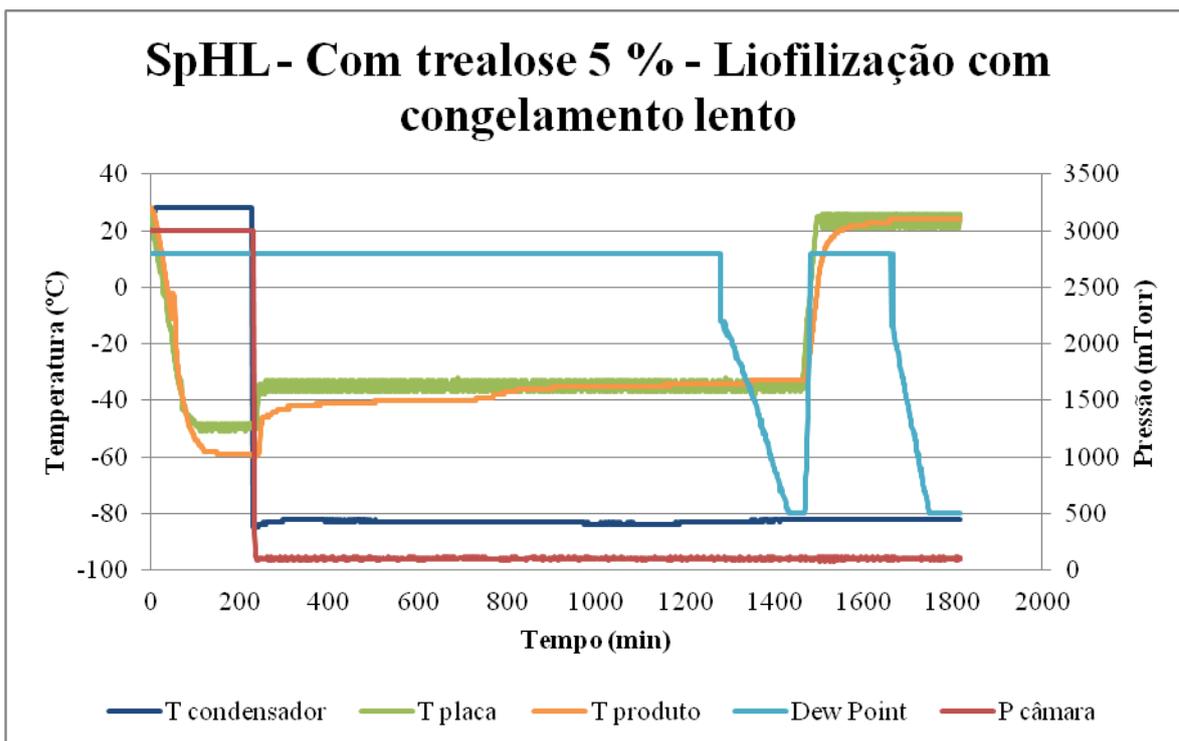


Figura 34 – Curva de liofilização de SpHL, contendo trealose como crioprotetor, após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Duração da liofilização: aproximadamente 29 horas.

Tabela 19 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo trealose como crioprotetor e após congelamento lento

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	109	+28	3000	-50	-55	+12
Início da secagem primária	252	-84	100	-35	-46	+12
Fim da secagem primária	1432	-82	99	-33	-33	-80
Fim da secagem secundária	1748	-82	104	+25	+24	-80

A análise dos dados experimentais da curva de liofilização de SpHL, contendo HP- β -CD (Figura 35 e Tabela 20), demonstram a duração de aproximadamente 30 horas na etapa de secagem primária e de aproximadamente 55 horas de secagem secundária, perfazendo um total de aproximadamente 89 horas (3 dias e 17 horas) para completar a liofilização.

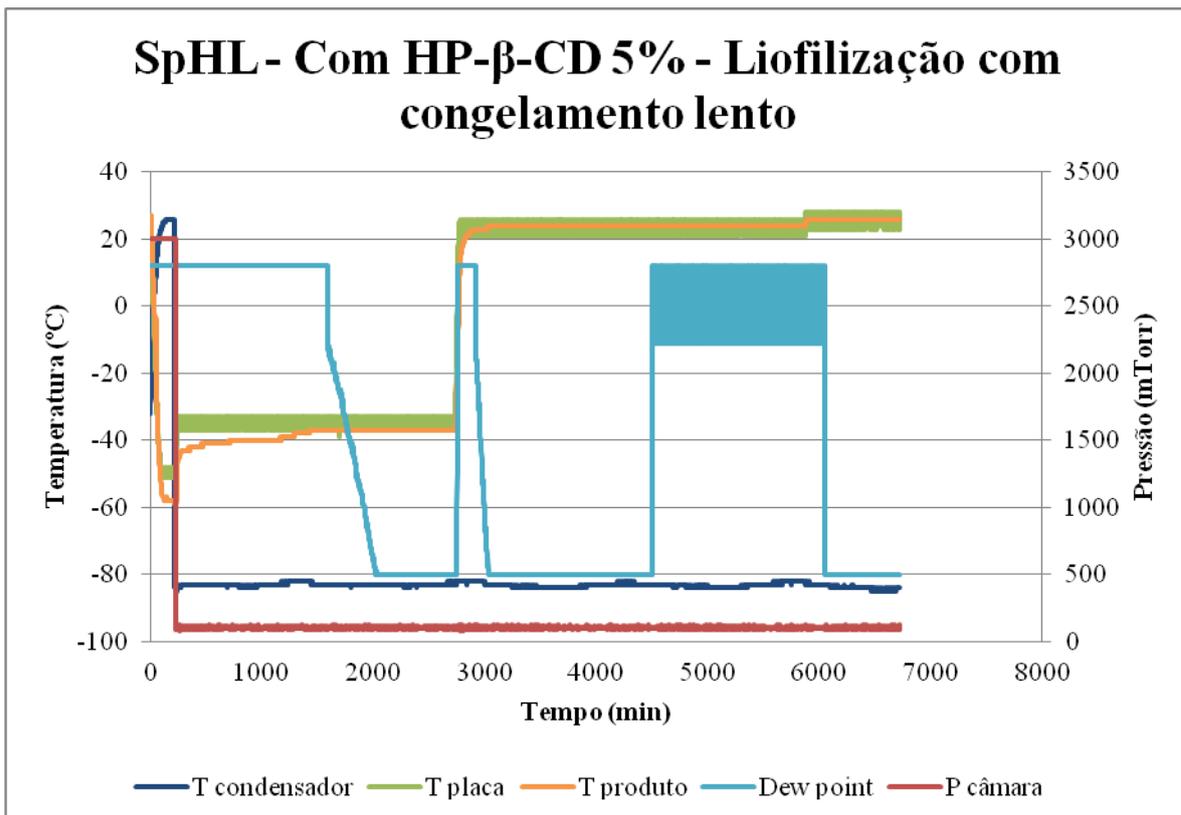


Figura 35 - Curva de liofilização dos lipossomas brancos, contendo HP-β-CD como crioprotetor e após congelamento lento (razão de congelamento 1°C/min). Tempo de liofilização: aproximadamente 88,7 horas).

Tabela 20 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo HP-β-CD como crioprotetor e após congelamento lento

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	89	+22	3000	-47	-50	+12
Início da secagem primária	245	-84	98	-35	-47	+12
Fim da secagem primária	2027	-83	101	-36	-37	-80
Início da secagem secundária	2755	-82	104	+5	-19	-22
Fim da secagem secundária	6049	-83	93	+25	+26	-80

3.5.1.2 Análise macroscópica e tempo de reidratação de SpHL liofilizados após congelamento lento

A inspeção visual das formulações de SpHL liofilizados não apresentam diferenças nas características da pastilha entre as formulações com ou sem crioprotetores (Figura 36). A liofilização das dispersões lipossomais resultou em pastilhas brancas intactas e elegantes. O programa de liofilização conduzido em temperaturas inferiores a T_c do produto garantiu a formação de pastilhas não colapsadas.

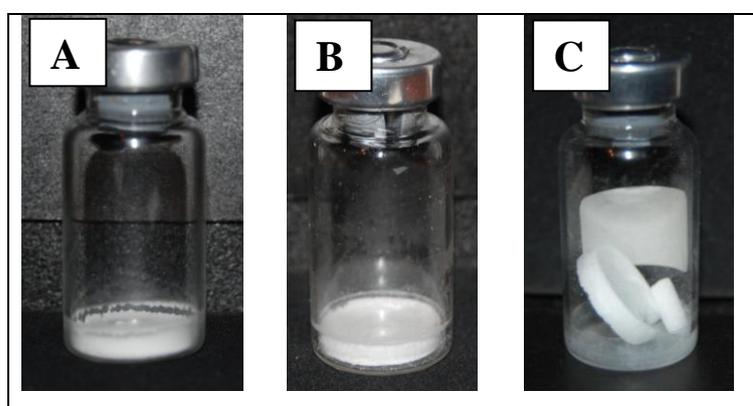


Figura 36 - Imagens de SpHL liofilizados após congelamento lento. A: SpHL sem crioprotetor. B: SpHL com trealose. C: SpHL com HP- β -CD.

As mudanças morfológicas da pastilha liofilizada podem afetar a reconstituição do produto. A porosidade permite mais eficientemente o transporte do vapor d'água durante a secagem e também pode melhorar a molhabilidade da matriz. Por exemplo, os poros formados na camada superficial superior da pastilha pode facilitar a penetração do líquido. Entretanto, a presença de grandes poros homogêneos na matriz podem aumentar a espessura desta e reduzir a área superficial, o que pode levar a uma dissolução mais lenta (SEARLES *et al.*, 2001b).

O congelamento lento produz cristais de gelo maiores resultando em uma estrutura desordenada e área superficial reduzida do líofilo, mas com uma relativa alta razão de sublimação durante a secagem primária (CHEN *et al.*, 2010). Entretanto as formulações de SpHL após congelamento lento foram facilmente redispersas, com duração inferior a 1 minuto. Para garantir a homogeneidade, as amostras foram vortexadas por 1 minuto após a reidratação.

3.5.1.3 Determinação do diâmetro das vesículas, índice de polidispersão e teor de umidade residual de SpHL liofilizados após congelamento lento

Para ser considerado bem-sucedido, um processo de liofilização deve gerar partículas facilmente redispersíveis em um solvente (sem a formação de agregados), a razão entre o diâmetro final/diâmetro inicial deve se manter próximo a 1,0 (no máximo 1,3) e o índice de polidispersão não deve mudar (HIRSJÄRVI, 2009; DATE, 2010).

Pastilhas elegantes foram obtidas, porém SpHL liofilizados/reidratados apresentaram aumento do diâmetro médio das vesículas numa ordem de aproximadamente 6 vezes para Lip-S/Criop e Lip-CD e de aproximadamente 3 vezes para Lip-trealose, e heterodispersos. A presença dos crioprotetores em SpHL resultou em formulações com teor de umidade residual dentro dos limites aceitáveis para a maioria dos produtos farmacêuticos que está situada na faixa de 1-3 %, enquanto a formulação de SpHL sem crioprotetor, liofilizada após congelamento lento, apresentou teor de umidade de 3,34 % (Tabela 21).

Tabela 21 - Caracterização físico-química de SpHL liofilizados/reidratados após congelamento lento

Amostra*	Diâmetro das vesículas (nm)	Índice de polidispersão	Teor de umidade residual (%)
Antes da liofilização			
Lip-S/Criop	112,8	0,255	---
Após a liofilização			
Lip-S/Criop	716,6	0,889	3,34 %
Lip-trealose	358,8	0,732	1,88 %
Lip-HP-β-CD	692,2	1,000	0,92 %

*As denominações Lip-S/Criop, Lip-Trealose e Lip-HP-β-CD referem-se aos SpHL preparados na ausência de crioprotetor, na presença de trealose e de hidroxipropil-beta-ciclodextrina, respectivamente, na concentração crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p).

3.5.2 Liofilização de SpHL contendo crioprotetores, após congelamento rápido

SpHL foram liofilizados, na ausência ou contendo os crioprotetores trealose ou HP-β-CD (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) segundo o protocolo: 1) congelamento rápido por imersão em nitrogênio líquido, por 5 minutos 2) secagem primária a -35°C e 100 mTorr e 3) secagem secundária a +25°C e 100mTorr.

3.5.2.1 Curvas de liofilização de SpHL com diferentes crioprotetores, após congelamento rápido

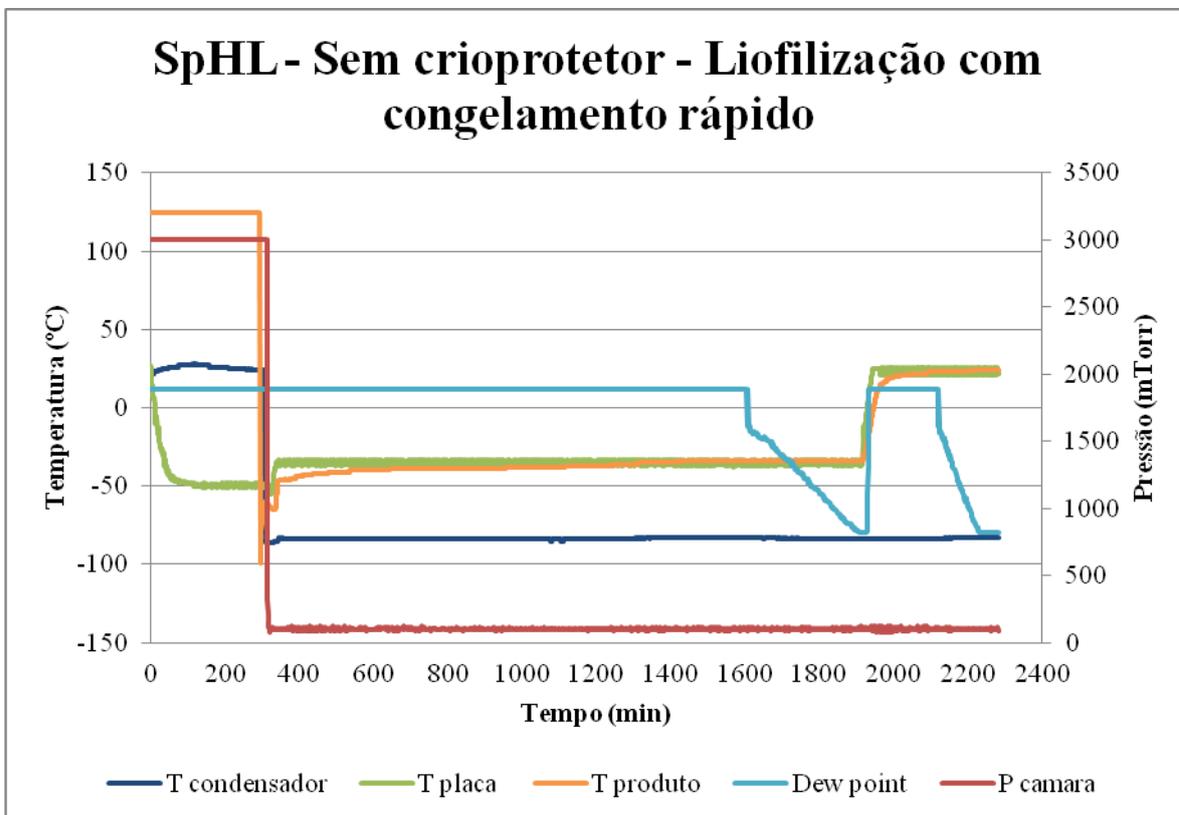


Figura 37 – Curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento rápido (imersão em N₂ líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 37 horas.

Tabela 22 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, na ausência de crioprotetores, após congelamento rápido

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	296	+24	3000	-50	-99	+12
Início da secagem primária	320	-86	94	-52	-63	+12
Fim da secagem primária	1907	-84	95	-37	-34	-80
Fim da secagem secundária	2230	-83	104	+23	+24	-80

Os frascos contendo SpHL sem crioprotetor, congelados, foram postos na placa do liofilizador e a temperatura do produto detectada foi igual a -99°C . A secagem primária teve a duração de aproximadamente 27 horas e a secagem secundária, aproximadamente 5 horas, totalizando cerca de 37 horas, com a inclusão da preparação do liofilizador e o congelamento das amostras (Figura 37 e Tabela 22).

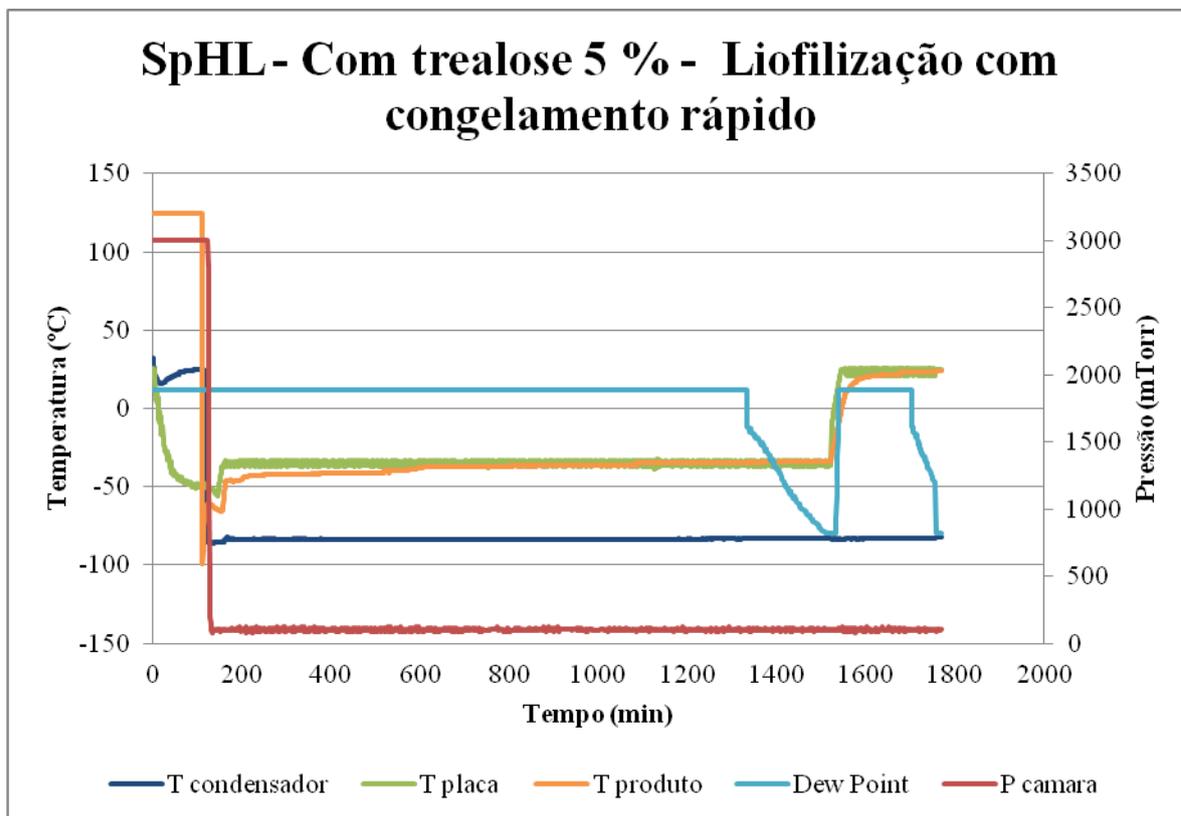


Figura 38 – Curva de liofilização de SpHL contendo trealose, após congelamento rápido (imersão em N_2 líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 30 horas.

Tabela 23 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo trealose, após congelamento rápido

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador ($^{\circ}\text{C}$)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura do produto ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura do ponto de orvalho ($^{\circ}\text{C}$)
Congelamento	112	+25	3000	-49	-99	+12
Início da secagem primária	132	-85	113	-51	-62	+12
Fim da secagem primária	1509	-83	98	-35	-34	-80
Início da secagem secundária	1538	-84	117	+15	-11	+12
Fim da secagem secundária	1757	-82	107	+25	+24	-80

A liofilização de SpHL, contendo trealose, após congelamento rápido (Figura 38 e Tabela 23) teve a duração de aproximadamente 23 horas para a etapa de secagem primária e a duração de aproximadamente 4 horas na secagem secundária, perfazendo um total de aproximadamente 30 horas no ciclo completo de liofilização, incluindo a etapa de congelamento.

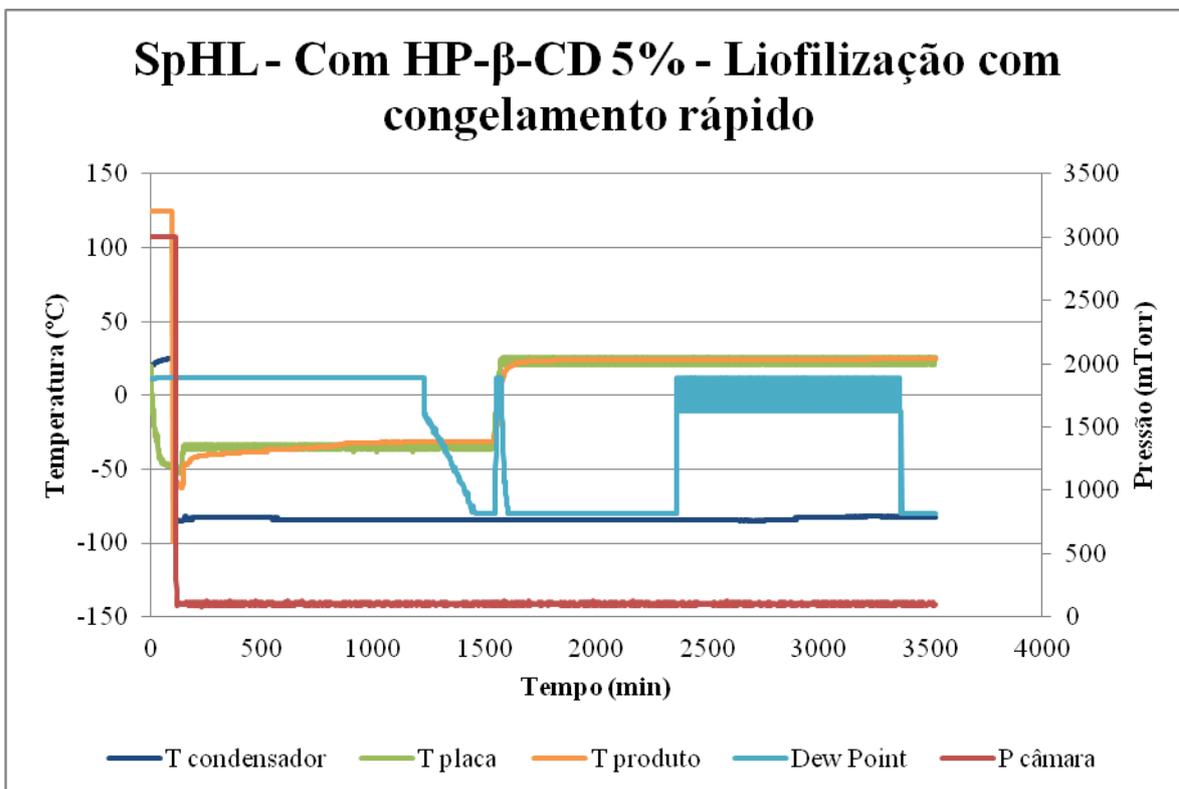


Figura 39 - Curva de liofilização de SpHL, contendo HP-β-CD, após congelamento rápido (imersão em N₂ líquido). Tempo de liofilização: aproximadamente 56 horas.

Tabela 24 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL, contendo HP-β-CD, após congelamento rápido

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	101	+25	3000	-47	-99	+12
Início da secagem primária	121	-85	102	-49	-59	+12
Fim da secagem primária	1457	-84	99	-37	-31	-80
Início da secagem secundária	1546	-84	112	-19	-29	-74
Fim da secagem secundária	3364	-83	102	+21	+25	-80

A análise dos dados experimentais da curva de liofilização de SpHL, contendo HP- β -CD (Figura 39 e Tabela 24), demonstram a duração de aproximadamente 22 horas na etapa de secagem primária e de aproximadamente 30 horas de secagem secundária, perfazendo um total de aproximadamente 56 horas de liofilização, incluindo a etapa de congelamento.

3.5.2.2 Análise macroscópica e tempo de reidratação de SpHL liofilizados após congelamento rápido

SpHL liofilizados após congelamento rápido formaram pastilhas com aspecto quebradiço, com retração do volume inicial, especialmente na formulação de SpHL sem crioprotetor (Figura 40-A). A projeção de líquido durante a imersão do frasco em nitrogênio líquido, faz com que uma névoa de pó branco seja formada nas paredes do frasco, proporcionando uma aspecto de sujidade, o que ocorreu especialmente na liofilização de SpHL com HP- β -CD (Figura 40-C). A pastilha com aparência mais elegante, após liofilização por congelamento rápido, foi formada na formulação de SpHL com trealose (Figura 40-B).

A reconstituição de SpHL liofilizados por congelamento rápido levou à formação de SpHL, com duração menor que 1 minuto. Para melhorar a homogeneidade, a dispersão foi vortexada por 1 minuto, após a reidratação. Apesar de as pastilhas obtidas pela liofilização após congelamento rápido apresentarem aspectos distintos daquelas liofilizadas após congelamento lento, não houve diferença na duração da reconstituição das amostras.

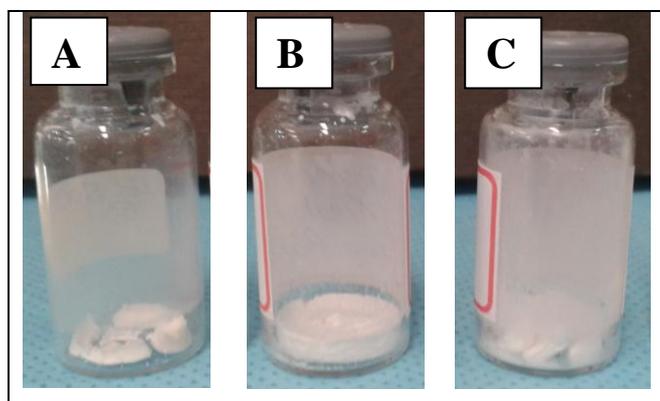


Figura 40 - Imagens de SpHL liofilizados após congelamento rápido. A: SpHL sem crioprotetor; B: SpHL com trealose; C: SpHL com HP- β -CD.

3.5.2.3 Determinação do diâmetro das vesículas, índice de polidispersão e teor de umidade residual de SpHL liofilizados após congelamento rápido

SpHL liofilizados/reidratados apresentaram um aumento do diâmetro médio das vesículas de aproximadamente 3; 4,5 e 7 vezes, respectivamente para Lip-trealose, Lip-HP- β -CD e Lip-S/Criop. Após reidratação, todas as dispersões lipossomais formadas apresentaram-se heterodispersas. A presença dos crioprotetores em SpHL resultou em formulações com teor de umidade residual dentro dos limites desejados de 1-3 %, enquanto a formulação de SpHL sem crioprotetor, liofilizada após congelamento rápido, apresentou teor de umidade de 3,77 % (Tabela 25).

Tabela 25 - Caracterização físico-química de SpHL liofilizados/reidratados após congelamento rápido

Amostra	Diâmetro das vesículas (nm)	Índice de polidispersão	Teor de umidade residual (%)
Antes da liofilização			
Lip-S/Criop	112,8	0,255	---
Após a liofilização			
Lip-S/Criop	802,2	1,00	3,77
Lip-trealose	353,7	1,00	1,01
Lip-HP- β -CD	504,8	1,00	0,92

*As denominações Lip-S/Criop, Lip-Trealose e Lip-HP- β -CD referem-se aos SpHL preparados na ausência de crioprotetor, na presença de trealose e de hidroxipropil-beta-ciclodextrina, respectivamente, na concentração crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p).

3.5.3 Liofilização de SpHL-CDDP

Diante dos resultados obtidos pela liofilização de SpHL, o crioprotetor escolhido para a liofilização de SpHL-CDDP foi a trealose na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p. A liofilização de SpHL com trealose após congelamento lento resultou em um processo de menor duração, com menor diâmetro médio das vesículas após reconstituição do liófilo e umidade residual satisfatória. Portanto, a liofilização de SpHL-CDDP com trealose foi realizada segundo o programa: 1) congelamento lento até -50°C (razão de resfriamento 1°C/min), 2) secagem primária a -35°C e 100 mTorr e 3) secagem secundária a +25°C e 100mTorr.

3.5.3.1 Curva de liofilização de SpHL-CDDP com trealose, após congelamento lento

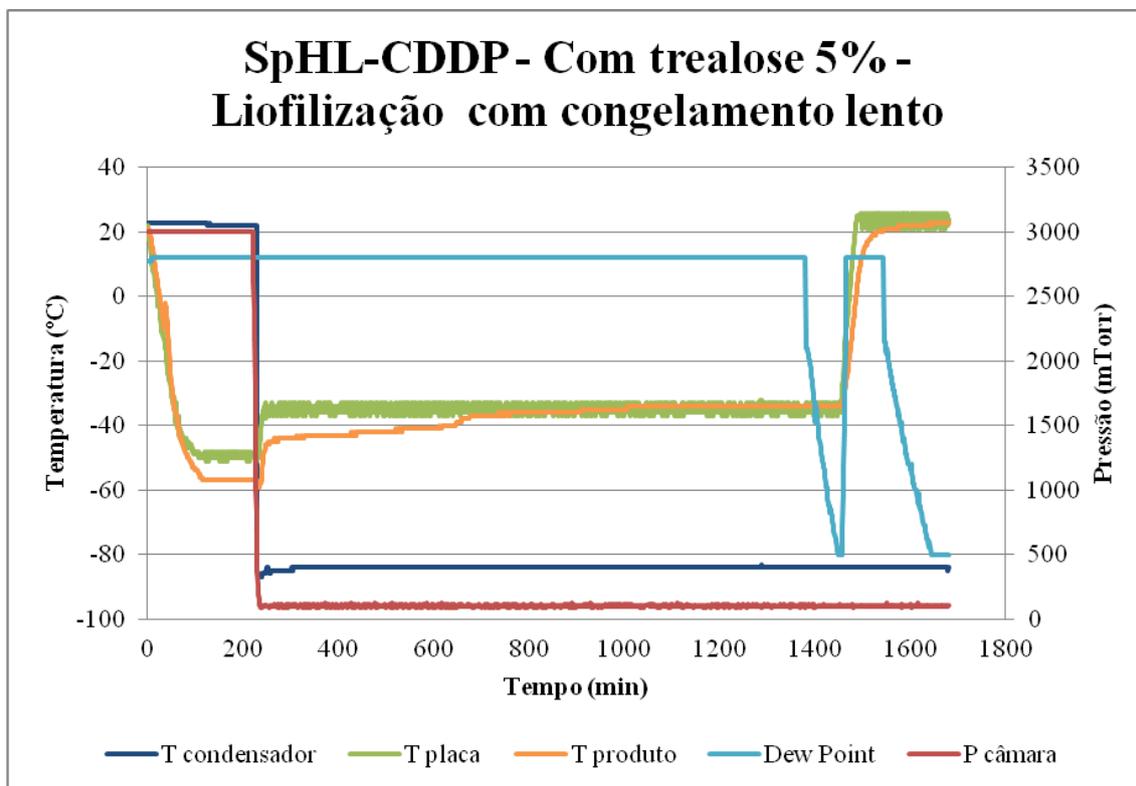


Figura 41 – Curva de liofilização de SpHL-CDDP contendo trealose, após congelamento lento. Tempo de liofilização: aproximadamente 27 horas.

Tabela 26 – Dados experimentais extraídos da curva de liofilização de SpHL-CDDP contendo trealose, após congelamento lento

Etapa	Tempo (min)	Temperatura do condensador (°C)	Pressão da câmara (mTorr)	Temperatura da placa (°C)	Temperatura do produto (°C)	Temperatura do ponto de orvalho (°C)
Congelamento	86	+23	3000	-46	-50	+12
Início da secagem primária	230	+22	800	-49	-57	+12
Fim da secagem primária	1449	-84	96	-34	-34	-80
Início da secagem secundária	1458	-84	102	-27	-33	-71
Fim da secagem secundária	1643	-84	96	+24	+22	-80

A análise dos dados registrados pelo software durante a liofilização de SpHL-CDDP, contendo trealose, após congelamento lento (Figura 41 e Tabela 26) apontaram o tempo gasto em cada etapa do ciclo de liofilização. Após a temperatura do produto atingir -50°C , este foi mantido por cerca de 2 horas a -50°C . A etapa de secagem primária da liofilização de SpHL-CDDP contendo trealose, durou aproximadamente 20 horas e a secagem secundária, aproximadamente 3 horas, perfazendo um total de aproximadamente 27 horas no ciclo de liofilização (Figura 41), incluindo a etapa de congelamento.

A duração da liofilização de SpHL-CDDP com trealose foi semelhante à liofilização de SpHL com trealose, após congelamento (Figura 34). Logo, a adição de CDDP não influenciou o processo de liofilização.

3.5.3.2 Análise macroscópica e tempo de reidratação de SpHL-CDDP com trealose liofilizados após congelamento lento

SpHL-CDDP contendo trealose liofilizado formou uma pastilha intacta ocupando o mesmo volume correspondente à dispersão congelada de SpHL-CDDP original (Figura 42). O tempo necessário à reconstituição de SpHL-CDDP após a adição de água purificada foi menor que 1 minuto. A homogeneidade foi garantida por vortexação da amostra por 1 minuto após a reconstituição espontânea.

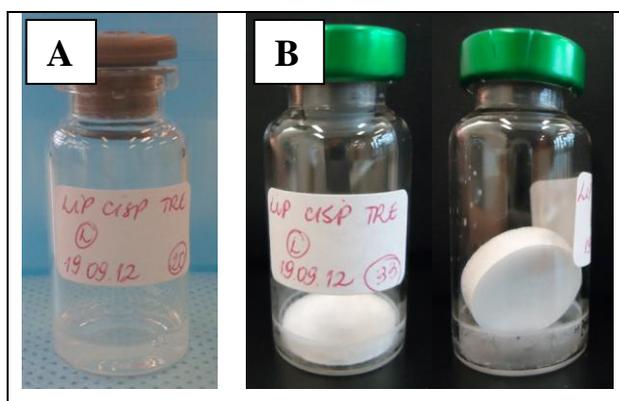


Figura 42 - Imagens de SpHL-CDDP contendo trealose liofilizados após congelamento lento. A: Dispersão de SpHL-CDDP com trealose antes da liofilização; B: SpHL-CDDP com trealose liofilizado.

3.5.3.3 Determinação do diâmetro das vesículas, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de umidade residual de SpHL-CDDP com trealose liofilizados após congelamento lento

As características físico-químicas de nanossistemas afetam sua estabilidade físico-química e o comportamento *in vivo* destas formulações. Para SpHL-CDDP com trealose, o diâmetro e polidispersividade obtidos após a reconstituição apresentaram considerável aumento, com diâmetro dentro dos limites das especificações para uma formulação IV, porém heterodispersas. As vesículas de SpHL-CDDP mostraram valores de potencial zeta próximos a neutralidade (Tabela 27). De acordo com Woodle e colaboradores (1992), bicamadas contendo DSPE –mPEG exibem um potencial de superfície negativo mas uma reduzida mobilidade eletroforética. A baixa mobilidade eletroforética e, portanto, o reduzido valor de potencial zeta é devido a grande resistência hidrodinâmica proporcionada pelo polímero de polietilenoglicol (PEG). O impedimento estérico proporcionado pelo PEG presente na bicamada lipídica confere estabilidade física à formulação.

Tabela 27 - Caracterização físico-química de SpHL-CDDP contendo trealose

Amostra*	Diâmetro das vesículas (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Teor de umidade residual (%)
Antes da liofilização				
SpHL-CDDP trealose	112,8	0,255	3,1	---
Após a liofilização				
SpHL-CDDP trealose	302,2	0,536	4,4	2,81 %

*SpHL-CDDP contendo trealose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1) foram liofilizados após congelamento lento (razão 1°C/min) e reconstituídos com água purificada imediatamente após o processo de liofilização.

3.5.3.4 Determinação da retenção de CDDP em SpHL-CDDP após liofilização/reidratação

O teor de fármaco encapsulado/associado ao sistema de liberação de fármacos dita a viabilidade comercial e a efetividade deste (AYEN; KUMAR, 2012). Neste sentido, é importante que o teor de fármaco no sistema de liberação de fármacos se mantenha igual antes

e após a liofilização. Por este motivo, SpHL-CDDP foram purificados por ultracentrifugação após a reconstituição do líofilo de SpHL-CDDP com trealose e o teor de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP foi determinado. A retenção de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP foi igual a 87,50 % após reconstituição do líofilo de SpHL-CDDP com trealose quando comparada a dispersão líquida de SpHL-CDDP antes da liofilização.

A T_c determinada para a formulação de SpHL com trealose foi igual a -42°C. Baseada no fato de a trealose ser o principal componente na formulação responsável por esta T_c, este valor foi extrapolado para os estudos de liofilização de SpHL-CDDP com trealose. Portanto, durante a etapa de secagem primária, a temperatura do produto SpHL-CDDP manteve-se abaixo da T_c (Figura 41 e Tabela 26), o que garantiu a manutenção da estabilidade física de SpHL-CDDP com trealose.

A proteção proporcionada pela trealose à formulação de SpHL-CDDP pode ser explicada pela hipótese da substituição da água e/ou pela hipótese da vitrificação. A hipótese de substituição da água foi proposta por Crowe e colaboradores (1998), na qual as interações entre os açúcares e os fosfolípidos reduzem a T_m dos lípidos da bicamada no estado seco, porque os açúcares mantêm o espaçamento entre os grupos polares dos fosfolípidos e reduzem a interação de van der Waals entre suas cadeias hidrocarbonadas. Portanto, evitando a transição de fase dos lípidos durante a liofilização e reidratação, é possível aumentar o teor de retenção do fármaco nos lipossomas.

A secagem dos lipossomas na ausência de lioprotetores resulta em um aumento da T_m. Quando a temperatura em que as vesículas são reidratadas está abaixo da T_m de lipossomas liofilizados, a transição de fases ocorrerá durante a reidratação e isto pode resultar em uma permeabilidade aumentada e extravasamento do material encapsulado dos lipossomas (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Koster e colaboradores (1994) notaram que a T_g deve ser maior que a T_m nos filmes lipídicos completamente hidratados para que os estabilizantes sejam eficazes na depressão da T_m dos lipossomas.

A trealose é uma substância capaz de reduzir a temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalino (T_m) da bicamada lipídica devido a interação dos grupos hidroxila do dissacarídeo e o grupo polar dos fosfolípidos via ligação de hidrogênio (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Porém, em estudos de DSC de Rocha e colaboradores (2008), o difratograma da DOPE indica a ocorrência de transição de fase L_β→L_α na temperatura de -43°C e a transição de fase L_α para uma fase hexagonal na temperatura de 10°C. Quando aplicados à formulação de SpHL-CDDP com trealose, foi detectada uma transição L_β→L_α alargada no intervalo de

temperatura igual a -23 a -1°C , indicando que a presença da trealose na concentração utilizada foi capaz de levar ao aumento da T_m da DOPE.

No entanto, o maior controle do diâmetro das vesículas de SpHL-CDDP na presença de trealose parece não estar relacionado aos valores de T_m , uma vez que esta foi inferior à temperatura de reidratação do liofilizado, não ocorrendo portanto a transição $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ durante esse processo. O fato das moléculas de DOPE se encontrarem no estado líquido-cristalino na temperatura de reidratação contribui para a obtenção de vesículas de menor diâmetro assim como para a retenção do material encapsulado.

Outro mecanismo lioprotetor é a hipótese da vitrificação, na qual a solução de trealose torna-se crioconcentrada e forma uma matriz vítrea estável durante o congelamento e após a secagem, os lipossomas são inseridos na matriz vítrea do açúcar. Na matriz, que apresenta alta viscosidade e baixa mobilidade, a agregação/fusão dos lipossomas é evitada e protegida do estresse mecânico dos cristais de gelo. Análises microscópicas confirmaram a inserção de SpHL-CDDP em uma matriz vítrea de trealose (GIUBERTI *et al.*, 2011). De modo geral, além da maior T_g apresentada pela trealose e capacidade de formação da matriz vítrea, podem ser ressaltadas outras vantagens que são importantes para sua eficácia crioprotetora, como sua baixa higroscopicidade, a ausência de ligações de hidrogênio internas que permite maior flexibilidade para a formação de ligações de hidrogênio durante a liofilização e reatividade química muito baixa (ABDELWAHED, 2006).

3.5.3.5 Análise macroscópica, determinação da absorção de umidade e teor de retenção de CDDP em SpHL-CDDP após armazenamento em diferentes condições de umidade

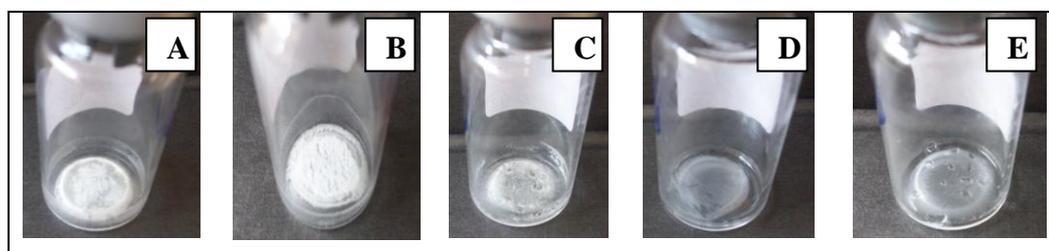


Figura 43 - SpHL-CDDP armazenados a 25°C sob distintas condições de umidade relativa. (A) 8,23 %, (B) 32,50 %, (C) 55,00 %, (D) 75,10 % e (E) 90,00 %

Para um produto liofilizado, é importante a manutenção de suas características durante o armazenamento e que, após a reconstituição, este atue do mesmo modo que a dispersão líquida recentemente preparada. Nesse estudo, SpHL-CDDP, contendo trealose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p), liofilizados após congelamento lento, foram armazenados sob cinco distintas condições de umidade relativa, a 25°C. Estes sofreram modificação estrutural da pastilha liofilizada (Figuras 43 A-E), com retração do volume inicial.

O tempo de reidratação foi superior a 5 minutos, sob agitação em vórtex, para todas as amostras de SpHL-CDDP armazenadas nas diferentes condições de armazenamento. Além disto, todas as amostras de SpHL-CDDP absorveram umidade e o aumento da absorção foi gradual e proporcional ao teor de umidade do ambiente de armazenamento, e situou-se na faixa de 0,13 a 0,91 % (Tabela 28).

Tabela 28 - Absorção de umidade e teor de retenção de CDDP em SpHL-CDDP contendo trealose sob diferentes condições de armazenamento

Amostra	Solução saturada de	Teor de umidade relativa (%)	Aumento de umidade (%)	Teor de retenção de CDDP encapsulada (%)
A	Hidróxido de potássio	8,23	0,1257	77,98
B	Cloreto de magnésio	32,50	0,1514	79,72
C	Brometo de sódio	55,00	0,2713	100,00
D	Cloreto de sódio	75,10	0,3764	82,28
E	Cloreto de bário	90,00	0,9097	80,14

Após reidratação dos líofilos, a retenção da CDDP encapsulada em SpHL-CDDP com trealose ficou em torno de 80 % (Tabela 28), a despeito do colapso das amostras (Figura 43). Amostras liofilizadas com sucesso podem colapsar quando estocadas a temperaturas superiores a Tg do material ou devido à sorção de água da atmosfera, a qual exerce sua ação plastificante e pode deprimir a Tg para temperaturas inferiores a temperatura ambiente (25°C) (ROSS, 1997). Nesse estudo, o efeito plastificante da água sobre a amostra resultou em colapso das amostras de SpHL-CDDP, sendo então justificado o armazenamento do produto sob refrigeração (2 a 8°C) a fim de que o aspecto físico da formulação permaneça inalterado e elegante.

3.6 Análises por microscopia eletrônica de varredura de SpHL e SpHL-CDDP

Nas fotomicrografias de SpHL sem crioprotetor liofilizado após congelamento lento (Figura 44), obtidas por MEV, pode ser observada uma matriz frondosa amorfa com poros grandes que foram anteriormente ocupados pelo gelo. A liofilização ocorreu em temperatura abaixo da T_c de SpHL sem crioprotetor, permitindo a completa remoção do gelo e a manutenção da matriz lipídica. Contudo, mesmo no maior aumento utilizado, de 2500 vezes (Figura 44-D) não foi possível visualizar vesículas de SpHL.

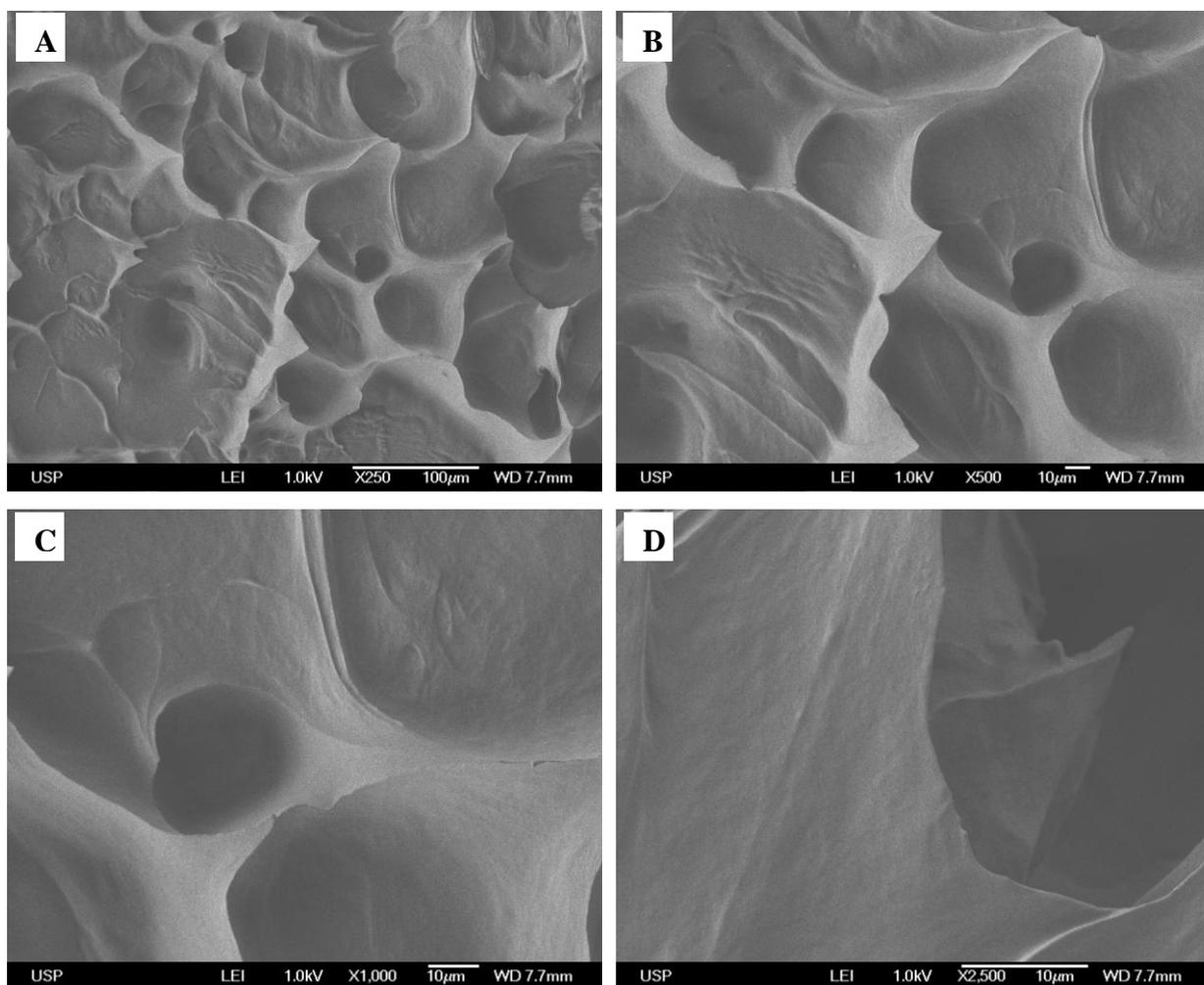


Figura 44 - Fotomicrografias de SpHL liofilizado, sem crioprotetor, após congelamento lento obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de (A) 250 vezes, (B) 500 vezes, (C) 1000 vezes e (D) 2500 vezes, respectivamente.

Imagens de MEV de SpHL-CDDP contendo trealose (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) liofilizados após congelamento lento mostram vesículas inseridas na matriz vítrea formado pelo crioprotetor (Figura 45-D). SpHL-CDDP com trealose, após liofilização/reidratação, apresentaram diâmetro igual a 302,2 nm (Tabela 27), enquanto que em SpHL sem crioprotetor houve agregação das vesículas (Tabela 21).

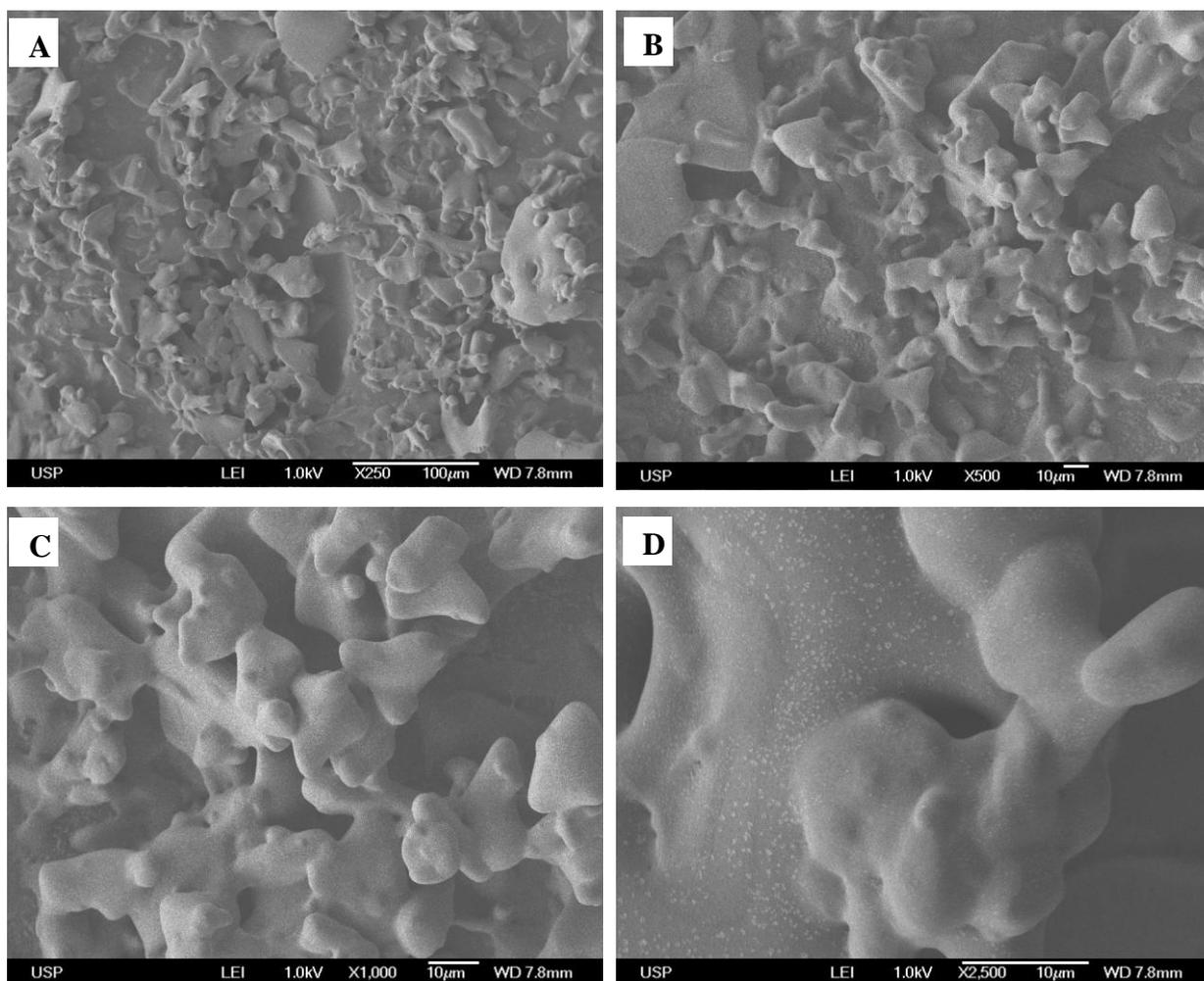


Figura 45 - Fotomicrografias de SpHL-CDDP liofilizado, com trealose, após congelamento lento obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Aumento de (A) 250 vezes, (B) 500 vezes, (C) 1000 vezes e (D) 2500 vezes, respectivamente.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo da produção piloto e desenvolver um programa de liofilização de uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina (SpHL-CDDP).

Na produção de SpHL-CDDP, segundo o método REV em escala laboratorial, na redução da concentração inicial da solução de CDDP, uma melhor eficiência na produção de SpHL-CDDP foi atingida quando foi utilizada a solução de CDDP 0,5 mg/mL, resultando em menor quantidade de CDDP livre a ser recuperada após a etapa de purificação do processo de produção.

Na busca de solventes alternativos ao éter etílico, foram selecionados as misturas de acetato de etila:etanol 1:1 e 2:1 (v/v) para a produção de SpHL-CDDP, em escala laboratorial, segundo método REV. No entanto, apesar destas misturas de solventes terem sido capazes de formar vesículas lipossomais, uma dispersão homogênea, com diâmetro médio de 127,6 nm e o melhor teor de encapsulação (40,6 %) foi obtido pela utilização do éter etílico como solvente orgânico da formulação.

A produção em escala piloto de SpHL-CDDP segundo a formação de SpHL-CDDP pelo método REV usando o éter etílico, seguido pela homogeneização por 6 ciclos a 500 bar e, pela purificação por ultrafiltração resultaram em dispersões homogêneas e adequadas à administração IV, com diâmetro médio das vesículas de 94,6 nm e com aproximadamente 95 % das vesículas com diâmetro inferior a 200 nm. Portanto, este método pode ser considerado aplicável à produção de lipossomas.

O método DRV não apresentou resultados satisfatórios quanto ao diâmetro das vesículas, visto que o diâmetro médio atingido está acima daquele almejado para uma administração IV, o que torna necessário a inclusão de uma nova etapa de calibração ao método. Além disto, SpHL-CDDP formados não foram capazes de encapsular todo o fármaco disponível, o que leva à necessidade de uma nova etapa de purificação dos lipossomas antes da utilização.

Em estudos preliminares para o desenvolvimento do programa de liofilização, o estudo do congelamento-descongelamento mostrou que os crioprotetores foram capazes de manter o diâmetro das vesículas após o congelamento rápido e lento de SpHL. Mesmo na ausência de crioprotetores, o diâmetro médio de SpHL foi mantido após o estresse do congelamento, quando o mesmo foi realizado lentamente. Estes resultados indicam que a presença de DSPE-

mPEG₂₀₀₀ e dos crioprotetores são importantes componentes da formulação responsáveis pela proteção da bicamada lipídica.

Os crioprotetores também foram capazes de manter o diâmetro das vesículas de SpHL-CDDP, durante o congelamento rápido. Entretanto, a concentração de crioprotetores (razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 p/p) não foi suficiente para evitar o extravasamento de 50 % do fármaco encapsulado.

Baseado nas curvas de liofilização (após congelamento rápido e lento), no aspecto macroscópico e na caracterização físico-química das formulações de SpHL, a trealose foi escolhida como substância crioprotetora, por ter sido capaz de reduzir o tempo de secagem primária, importante parâmetro para otimização do ciclo de liofilização.

SpHL-CDDP, foi liofilizado com trealose na razão crioprotetor:fosfolípide 2:1 (p/p), gerando pastilhas brancas e elegantes, de fácil ressuspensão, com teor de umidade residual igual a 2,81 %. O ciclo de liofilização durou aproximadamente 27 horas. Após reconstituídos, SpHL-CDDP retiveram 87,5 % da CDDP encapsulada e formaram vesículas com diâmetro médio de 302 nm, apesar de heterodispersas. Os resultados obtidos apontam o emprego da liofilização como uma alternativa para a produção comercial de SpHL-CDDP.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

A partir do trabalho realizado até o momento, são propostas as seguintes perspectivas:

- ✓ Continuidade da pesquisa de solventes orgânicos alternativos para a produção de SpHL-CDDP segundo método REV;
- ✓ Inclusão de uma etapa de esterilização final na produção de SpHL-CDDP em escala piloto;
- ✓ Desenvolvimento de um método para recuperação da quantidade de CDDP não encapsulada;
- ✓ Estudo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP sob as formas líquida e liofilizada.
- ✓ Desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de produtos de hidrólise e oxidação em SpHL-CDDP;
- ✓ Otimizar o programa de liofilização a fim de produzir SpHL-CDDP homogêneos após a reconstituição do líofilo;
- ✓ Avaliar o uso de uma associação de crioprotetores a fim de aumentar a Tc da formulação;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Instrução Normativa Nº2 de 30 de março de 2009. Brasília:2009. Disponível em: <<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis>> Acesso em 05 outubro 2012.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMSELEM, S.; GABIZON, A.; BARENHOLZ, Y. Optimatization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 12, p. 1045-1052, 1990.

ARAUJO, J.G.V.C.; MOTA, L.G.; LEITE, E.A.; MARONI, L.C.; WAINSTEIN, A.J.A.; GONZAGA, L.G.V.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; PEREIRA, M.T.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARDOSO, V.N.; DE OLIVEIRA, M.C. Biodistribution and antitumoral effect of long-circulating and pH-sensitive liposomal cisplatin administered in Ehrlich tumor-bearing mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 808-815, 2011.

ARMSTRONG, T.K.C.; GIROUARD, L.G.; ANCHORDOQUY, T.J. Effects of PEGylation on the preservation of cationic lipid/DNA complexes during freeze-thawing and lyophilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 2549-2558, 2002.

ARMSTRONG, D.K.; BUNDY, B.; WENZEL, L.; HUANG, H.Q.; BAERGEN, R.; LELE, S.; COPELAND, L.J.; WALKER, J.L.; BURGER, R.A. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 34-43, 2006.

AULTON, M.E. Secagem. In: **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre:Editora Artmed, 2005, Cap. 26, p. 384-401.

AYEN, W.Y.; KUMAR, N. A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG)₃-PLA nanopolymersomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 405-414, 2012.

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

BARENHOLZ, Y. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. **Journal of Liposome Research**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2003.

BARNADAS-RODRIGUÉZ, R., SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, p. 175-186, 2001.

BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 223, p. 55-68, 2001.

BI, R.; SHAO, W.; WANG, Q.; ZHANG, N. Spray-freeze-dried powder inhalation for delivery of insulin-loaded liposomes for enhanced pulmonary delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 9, p. 639-648, 2008.

BIBI, S.; KAUR, R.; HENRIKSEN-LACEY, M.; McNEIL, S.E.; WILKHU, J.; LATTMANN, E.; CHRISTENSEN, D.; MONHAMMED, A.R.; PERRIE, Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 417, p. 138-150, 2011.

BOULIKAS, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. **Oncology reports**, v.12, p. 3-12, 2004.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). **Oncology Reports**, v. 10, p. 1663-1682, 2003.

BRANDL, M. High-pressure homogenization techniques for the production of liposome dispersions: potential and limitations. In: MÜLLER, R.H.; BENITA, S.; BÖHM, B. **Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs**. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1998. p. 267-294.

CACELA, C.; HINCHA, D.K. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 2831-2842, 2006.

CANNON, J.B.; MARTIN, C.; DRUMMOND, G.S.; KAPPAS, A. Targeted delivery of a heme oxygenase inhibitor with a lyophilized Liposomal tin mesoporphyrin formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 5, p. 715-721, 1993.

CARNEIRO, A.L. **Projeto, Montagem e Operação de Instalação para a Produção Escalonável de Lipossomas Visando Aplicações Farmacêuticas**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

CARVALHO-JUNIOR, A.D.C.; VIEIRA, F.P.; MELO, V.J.M.; LOPES, M.T.P.; SILVEIRA, J.N.; RAMALDES, G.A.; GARNIER-SUILLEROT, A.; PEREIRA-MAIA, E.C.; OLIVEIRA, M.C. Preparation and cytotoxicity of cisplatin loaded liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40. p. 1149-1157, 2007.

CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 125, p. 139-146, 2003.

CASALS, E.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Factors influencing the encapsulation of thioguanine in DRV liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, p. 171-177, 1996.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 299-311, 2010.

CHOW, C.; 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**, v. 1239, p.168-176, 1995.

CRAIG, D.Q.M.; ROYALL, P.G.; KETT, V.L.; HOPTON, M.L. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze-dried systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 179-207, 1999.

CROWE, J.H.; LESLIE, S.B.; CROWE, L.M. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? **Cryobiology**, v. 31, p. 355-366, 1994.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 73-103, 1998.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; WISTROW, C.A. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v. 242, p. 1-10, 1987.

DATE, P.V.; SAMAD, A.; DEVARAJAN, P.V. Freeze-thaw: a simple approach for prediction of the optimal cryoprotectant for freeze-drying. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 304-313, 2010.

DE ROSA, G.; DE STEFANO, M.; LA ROTONDA, M.I. Cold Field emission gun-scanning electron microscopy: a new tool for morphological and ultrastructural analysis of liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, p. 189-192, 2008.

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

European Medicines Agency - EMEA. Note for guidance on process validation - CPMP/QWP/848/96. 2001. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002913.pdf> Acesso em: 05 outubro 2012.

European Medicines Agency - EMEA. ICH guideline Q3C(R5) on impurities: guideline for residual solvents - EMA/CHMP/ICH/82260/2006, 2011. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104258.pdf> Acesso em: 10 março 2013.

EROGLU, A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: intra and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization and development rates. **Cryobiology**, v. 60, n. 3, p. S54-S59, 2010.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. In: **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 345-411.

FONTES, A.P.S.; CESAR, E.T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

FOURNIER, C., HECQUET, B., BASTIAN, G., KHAYAT, D. Modification of the physicochemical and pharmacological properties of anticancer platinum compounds by commercial 5-fluoracil formulations: a comparative study using cisplatin and carboplatin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 461-466, 1992.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 221-229, 1998.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Biological Research**, n. 32, p. 181-189, 1999.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GIUBERTI, C.S.; REIS, E.C.O.; ROCHA, T.G.R.; LEITE, E.A.; LACERDA, R.G.; RAMALDES, G.A.; DE OLIVEIRA, M.C. Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. **Journal of Liposome Research**, v. 21, p. 60-69, 2011.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL, A.A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 291, p. 79-86, 2005.

GREGORIADIS, G.; DA SILVA, H.; FLORENCE, A.T. A Procedure for the Efficient Entrapment of Drugs in Dehydration-rehydration Liposomes (DRVs). **International Journal of Pharmaceutics**, n. 65, p. 235-242, 1990.

GREGORIADIS, G.; WILLS, E.J.; SWAIN, C.P.; TAVILL, A.S. Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. **Lancet**, v. 1, p. 1313-1316, 1974.

GUILLOT, T., SPIELMANN, M., KAC, J. et. al. Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. **Laryngoscope**, v. 102, n. 3, p. 311-319, 1992.

GULINO, P.M., GRANTHAM, F.H., SMITH, S.H., HAGGERTY, A. C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, p. 857-869, 1967.

HARRINGTON, K. J.; LEWANSKI, C. R.; NORTHCOTE, A. D.; WHITTAKER, J.; WELLBANK, H.; VILE, R. G.; PETERS, A. M.; STEWART, J. S. Phase I-II study of pegylated liposomal cisplatin (SPI-077) in patients with inoperable head and neck cancer. **Annals of Oncology**, v. 12, p. 493-496, 2001.

HASKELL, R.J.; SHIFFLETT, J.R.; ELZINGA, P.A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: BENITA, S. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s. 1.]: Harwood academic publishers, p. 8-19, 1998.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HIRAI, M.; MINEMATSU, H.; HIRAMATSU, Y.; KITAGAWA, H.; OTANI, T.; IWASHITA, S.; KUDOH, T.; CHEN, L.; LI, Y.; OKADA, M.; SALOMON, D.S.; IGARASHI, K.; CHIKUMA, M., SENO, M. Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 274-283, 2010.

HIRSJÄRVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 488-494, 2009.

HONG, T.D.; EDGINGTON, S.; ELLIS, R.H.; MURO, M.A.; MOORE, D. Saturated salt solutions for umidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 89, p. 136-143, 2005.

INGVARSSON, P.T.; YANG, M.; NIELSEN, H.M.; RANTANEN, J.; FOGED, C. Stabilization of liposomes during drying. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 3, p. 375-388, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. 2011. Estimativa 2012: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em 10 novembro 2012.

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, p. 1-53, 2003.

JEFFS, L.B.; AMBEGIA, E.G.; GIESBRECHT, C.; EWANICK, S.; MACLACHLAN, I. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 3, 2005.

JEHN, C.F; BOULIKAS, T.; KOURVETARIS, A.; POSSINGER, K.; LÜFTNER, D. Pharmacokinetics of liposomal cisplatin (Lipoplatin) in combination with 5-FU in patients with advanced head and neck cancer: first results of phase III study. **Anticancer Research**, v. 27, p. 471-476, 2007.

JÚNIOR, A.D.C.; MOTA, L.G.; NUNAN, E.A.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; LEAL, A.L.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Erlich tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v. 80, p. 659-664, 2007.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. A célula Cancerosa. In: **A Célula Biologia Celular e Molecular**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 292-303.

KADIMI, U.S.; BALASUBRAMANIAN, D.R.; GANNI, U.R.; BALARAMAN, M.; GOVINDARAJULU, V. In vitro studies on liposomal amphotericin B obtained by supercritical carbon dioxide-mediated process. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 273-280, 2007.

KASPER, J.C.; FRIESS, W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality

attributes of biopharmaceuticals. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, n. 78, p. 248-263, 2011.

KLANG, V.; VALENTA, C.; MATSKO, N.B. Electron microscopy of pharmaceutical systems. **Micron**, v. 44, p. 45-74, 2013.

KOMPELLA, U.; KOUSHIK, K. Preparation of drug delivery systems using supercritical fluid technology. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 18, n. 2, p. 173-199, 2001.

KONDAGUNTA, G.V.; BACIK, J.; DONADIO, A.; BAJORIN, D.; MARION, S.; SHEINFELD, J.; BOSL, G. J.; MOTZER, R.J. Combination of paclitaxel, ifosfamide and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 6549-6555, 2005.

KOSTER, K.; BRYANT, G.; LYNCH, D.V. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration-vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1193, p. 143-50, 1994.

KRIEGER, M.L.; ECKSTEIN, N.; SCHNEIDER, V.; KOCH, M.; ROYER, H.D.; JAEHDE, U.; BENDAS, G. overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. **International journal of pharmaceutics**, v. 389, p. 10-17, 2010.

KUMAGAI, S.; SUGIYAMA, T.; NISHIDA, T.; USHIJIMA, K.; YAKUSHIJI, M. Improvement of intraperitoneal chemotherapy for rat ovarian cancer using cisplatin-containing microspheres, **Japanese Journal of Cancer Research**, n.87, p. 412-417, 1996.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J.C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 417, p. 120-137, 2011.

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

LE CHEVALIER, T., BRISGAND, D., DOULLIARD, J.Y. Randomized trial of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: Results of a European multicenter trial including 612 patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, p. 360-367, 1994.

LEE, M.K.; KIM, M.Y.; KIM, S.; LEE, J. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 12, p. 4808-4817, 2009.

LEITE, E.A.; GIUBERTI, C.S.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; COELHO, L.G.V.; LANA, A.M.Q.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; DE OLIVEIRA, M.C. Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. **Life Sciences**, v. 84, p. 641-649, 2009.

LEITE, E.A.; LANA, A.M.Q.; JUNIOR, A.D.C.; COELHO, L.G.V.; DE OLIVEIRA, M.C. Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, n. 8, p, 229-239, 2012.

LIU, J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. **Pharmaceutical developmente and technology**, v. 11, p. 3-28, 2006.

LUZARDO, M.C.; AMALFA, F.; NUÑEZ, A.M.; DÍAZ, S.; LOPEZ, A.C.B.; DISALVO, E.A. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 2452-2458, 2000.

MALVERN INSTRUMENTS. PCS theory. In: **Zetasizer theory manual**. Inglaterra, 1996a, p. 1.1-1.10.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential: Theory of operation. In: **Zetasizer theory manual**. Inglaterra, 1996b, p. 2.1-2.6.

MARONI, L.C.; SILVEIRA, A.C.O.; LEITE, E.A.; MELO, M.M.; RIBEIRO, A.F.C.; CASSALI, G.D.; SOUZA, C.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CALDAS, I.R.; ARAUJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**, n. 237, p. 973-984, 2012.

MARTINDALE: The Extra Pharmacopoeia, **London: The Pharmaceutical Press**, 34 ed., p. 538-539, 2005.

McMULLEN, T.P.W.; LEWIS, R.N.A.H.; McELHANEY, R.N. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. **Biochemistry**, v. 32, p. 516-522, 1993.

MEISTER, E.; SASIC, S.; GIESELER, H. Freeze-dry microscopy: impact of nucleation temperature and excipient concentration on collapse temperature data. **AAPS PharmSciTech**, n. 10, p. 582-588, 2009.

MEURE, L.A.; FOSTER, N.R.; DEHGhani, F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 798-809, 2008.

MOHAMMED, A.R.; BRAMWELL, V.W.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilization of Liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**, v. 40, p. 30-38, 2006.

MOHAMMED, A.R.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Amino acids as cryoprotectants for Liposomal delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 406-413, 2007.

MONTI, E.; GARIBOLDI, M.; MAIOCCHI, A.; MARENGO, E.; CASSINO, C.; GABANO, E.; OSELLA, D. Citotoxicity of cis-platinum(II) conjugate models. The effect of chelating

arms and leaving groups on cytotoxicity: a quantitative structure-activity relationship approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, n.3, v.48, p.857-866, 2005.

MORETTO, L.D.; CALIXTO, J. Escalonamento (Scaling-up). In: _____. **Boas práticas de desenvolvimento de produtos**. Volume 4. São Paulo:SINDUSFARMA, 2009. p. 61-67.

MOSCA, M.; CEGLIE, A.; AMBROSONE, L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, n. 167, p. 158-165, 2011.

MUGGIA, F.M.; FOJO, T. Platinums: extending their therapeutic spectrum. **Journal of Chemoterapy**, v. 16, p. 77-82, 2004.

NEW, R. R. Introduction. In: **Liposomes a practical approach**. R.R.C. New, England:Oxford University Press, Cap. 1, p. 1-31, 1990.

NEWMAN, M. S., COLBERN, G. T., WORKING, P. K., ENGBERS, C., AMANTEA, M. A. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. **Cancer Chemothererapy and Pharmacology**, v. 43, p. 1-7, 1999.

NISHIYAMA, N.; OKAZADI, S.; CABRAL, H.; MIYAMOTO, M.; KATO, Y.; SUGIYAMA, Y.; NISHIO, K.; MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Novel cisplatin incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. **Cancer research**, v. 63, p. 8977-8983, 2003.

OLIVEIRA, M. C., BOUTET, V., FATTAL, E., BOQUET, D., GROGNET, J. M., COUVREUR, P., DEVERRE, J. R., Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Sciences**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

PAPAHADJOPOULOS, D.; GABIZON, A.A. Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. In: PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. **Liposomes as tools in basic research and industry**. CRC Press. 1995. Cap. 11, p. 177-188.

PATEL, S.M.; DOEN, T.; PIKAL, M.J. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. **AAPS PharmSciTech**, n. 11, p. 73-84, 2010.

PAYNE, N.I.; TIMMINS, P.; AMBROSE, C.V.; WARD, M.D.; RIDGWAY, F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 325-329, 1986.

PEER, D.; FLORENTIN, A.; MARGALIT, R. Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1612, p. 76-82, 2003.

PHILLIPS, W.T.; MEDINA, L.A.; KLIPPER, R.; GOINS, B. A novel approach for the increased delivery of pharmaceutical agents to peritoneum and associated lymph nodes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 1, v. 3, p. 11-16, 2002.

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treatment Reviews**, n. 33, p. 9-23, 2007.

RABINOVICH-GUILLAT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K.; LAMBERT, G.; COUVREUR, P.; CHAMINADE, P. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 69-76, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; QIST, A.P.; KUMAR, S.; LAL, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy : AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. **Langmuir**, v. 22, p. 8156-8162, 2006.

RICKER, J.V.; TSVETKOVA, N.M.; WOLKERS, W.F.; LEIDY, C.; TABLIN, F.; LONGO, M.; CROWE, J.H. Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. **Biophysical Journal**, v. 84, p. 3045-3051, 2003.

ROCHA, T.G.R. **Estudo da potencialidade do uso da hidroxipropil-beta-ciclodextrina como agente solubilizante e crioprotetor no preparo de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2008.

ROSS, E.H. Frozen state transitions in relation to freeze-drying. **Journal of Thermal Analysis**, v. 48, p. 535-544, 1997.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M.A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 81-89, 2005.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, n. 24, v. 8, p. 1112-1120, 2003.

SAKAMOTO, J.H.; VAN DE VEN, A.L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R.E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S.I.; DE ROSA, E.; MARTINEZ, J.O.; SMID, C.A.; BUCHANAN, R.M.; LEE, S.Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOTTI, E.; LIU, X.; DECUZZI, P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. **Pharmacological Research**, v. 62, p. 57-89, 2010.

SCHNITZER, E.; PINCHUK, I.; LICHTENBER, D. Peroxidation of liposomal lipids. **European Biophysics Journal**, v. 36, p. 499-515, 2007

SEARLES, J.A.; CARPENTER, J.F.; RANDOLPH, T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freeze-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg' in pharmaceutical lyophilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 872-887, 2001b.

SEARLES, J.A.; CARPENTER, J.F.; RANDOLPH, T.W. The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature-Controlled Shelf. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 860-871, 2001a.

SHIRAZI, F. H., MOLEPO, J. M., STEWART, D. J., RAAPHORST, G. P., GOEL, R. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p. 211-218, 1996.

SIEGEL, D.P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. **Biophysical Journal**, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 947-965, 2004.

SKALKO-BASNET, N.; PAVELIC, Z.; BECIREVIC-LACAN, M. Liposomes containing drug and cyclodextrin prepared by the one-step spray-drying method. **Drug Delivery and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 12, p. 1279-1284, 2000.

SKELLY, J.P. Scale-up and post approval changes (SUPAC). In: SWARBRICK, J. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3 ed. Nova Iorque:Informa Healthcare, 2007. p. 3188-3192.

SORGI, F.L.; HUANG, L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 144, p. 131-139, 1996.

STARK, B.; PAST, 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**, v. 41, p. 546-555, 2010.

STATHOPOULOS, G.P.; BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M.; RIGATOS, S.K.; STATHOPOULOS, J.G. Liposomal cisplatin combined with gemcitabine in pretreated advanced pancreatic cancer patients: a phase I-II study. **Oncology Reports**, v. 15, p. 1201-1204, 2006.

STUBBS, M., Mc SHEEHY, P.M.J., GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 39, n. 1, p. 13-30, 1999.

SUNDARAMURTHI, P.; SURYANARAYANAN, R. Calorimetry and complementary techniques to characterize frozen and freeze-dried systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 64, p. 384-395, 2012.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Liposome as Pharmaceutical Dosage Forms. In: DEKKER, M. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. V. 9. New York. 1994. Cap. 1, p. 1-39.

SZOKA, F.J.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 9, p. 4194-4198, 1978.

TAMURA, T.; IMAI, J.; MATSUMOTO, A.; TANIMOTO, M.; SUZUKI, A.; HORIKIRI, T.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H.; IKE, O. Organ distribution of cisplatin after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p. 1-7, 2002.

TANG, X.; PIKAL, M.J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 191-200, 2004.

THOMPSON, J. E. Compatibilidade e estabilidade de fármacos e preparações dispensadas pelo farmacêutico. In: _____. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 429-446.

TORCHILIN, V.P. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p. 431-444, 2009.

TORCHILIN, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, p. 128-147, 2007.

TRAN, M. A.; WATTS, R. J.; ROBERTSON, G. P. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 22, p. 388-399, 2009.

TRISSEL, L. A., MARTINEZ, J. F. Compatibility of thiotepa (lyophilized) with selected drugs during simulated y-site administration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 53, p. 1041-1051, 1996.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports**, n. 2, v. 22, p. 129-150, 2002.

VAN DEN HOVEN, J.; METSELAAR, J.M.; STORM, G.; BEIJNEN, J.H.; NUIJEN, B. Cyclodextrin as Membrane Protectant in Spray-drying and Freeze-drying of PEGylated Liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 438, p. 209-216, 2012.

VAN WINDEN, E.C.A.; ZHANG, W.; CROMMELIN, D.J.A.; Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration, **Pharmaceutical Research**, v.14, n. 9, p. 1151-1160, 1997.

VAN WINDEN, E.C.A.; ZUIDAM, N.J.; CROMMELIN, D.J.A. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. In: LASIC, D.D.; PAPAHAZIOPOULOS, D. **Medical applications of liposomes**, São Francisco:Elsevier, 1998. p. 567-604.

VEGA, E.; EGEEA, M.A.; CALPENA, A.C.; ESPINA, M.; GARCÍA, M.L. Role of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1357-1371, 2012.

VELINOVA, M.J.; STAFFHORST, R.W.H.M.; MULDER, W.J.M.; DRIES, A.S.; JANSEN, B.A.J.; KRUIJFF, B.; KROON, A.I.P.M. Preparation and stability of lipid-coated nanocapsules of cisplatin: anionic phospholipid specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1663, p.135-142, 2004.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Development and characterization of a liposome preparation by a pH-gradient method. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 46, p. 778-783, 1994.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VIEIRA, F. P. **Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de cisplatina: aspectos farmacotécnicos e avaliação da atividade antitumoral**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmacia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2003.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome technology for industrial purposes. **Journal of Drug Delivery**, 2011. doi:10.1155/2011/591325.

WAGNER, A.; VORAUER-UHLB, K.; KATINGERB, H.; Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p. 213-219, 2002.

WESSMAN, P.; EDWARDS, K.; MAHLIN, D. Structural effects caused by spray- and freeze-drying of liposomes and bilayers disks. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2032-2048, 2010.

WIEBER, A.; SELZER, T.; KREUTER, J. Physico-chemical Characterisation of Cationic DOTAP Liposomes as Drug Delivery System for a Hydrophilic Decapeptide Before and After Freeze-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 8, p. 358-367, 2012.

WOODLE, M.C.; COLLINS, L.R.; SPONSLER, E.; KOSSOVSKY, N.; PAPAHAADJOPOULOS, D.; MARTIN, F.J. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. **Biophysical Journal**, v. 61, p. 902-910, 1992.

XU, P.; VAN KIRK, E.A.; LI, S.; MURDOCH, W.J.; ZHAN, Y.; ISAAK, D.D.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 829-835, 2006.

YANG, D.; ZHU, J.; ZHENG, Y.; GE, L. Preparation, characterization, pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 219-227, 2006.

YANG, T.; CUI, F.; CHOI, M.; CHO, J.; CHUNG, S.; SHIM, C.; KIM, D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 338, p. 317-326, 2007.

YANG, G. GILSTRAP, K.; ZHANG, A.; XU, L.X.; HE, X. Collapse temperature of solutions important for lyopreservation of living cells at ambient temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 106, p. 247-259, 2010.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. **Cancer Research**, v. 55, p. 3752-3756, 1995.

ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. **Journal of Liposome Research**, n. 10, v. 1, p. 73-80, 2000.