

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**ESTUDO DO PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
E LIPOSSOMAS: ESTUDO DE VARIÁVEIS
E ENCAPSULAÇÃO DE MEDICAMENTOS DE
PRIMEIRO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Autor: Giuliana Piovesan Alves

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

Setembro de 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	AL87e
V	EX
TOMBO BC	56812
PROC	16/11/04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CN00194151-6

BIBID 309726

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

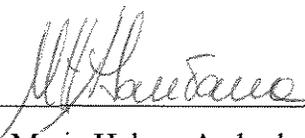
AL87e Alves, Giuliana Piovesan

Estudo do processo de produção de partículas lipídicas sólidas e lipossomas: estudo de variáveis e encapsulação de medicamentos de primeiro tratamento da tuberculose. / Giuliana Piovesan Alves. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

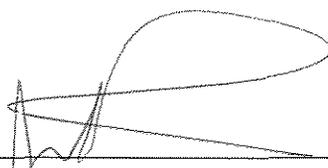
Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Secagem em spray. 2. Biomoléculas. 3. Lipídios. 4. Biotecnologia. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

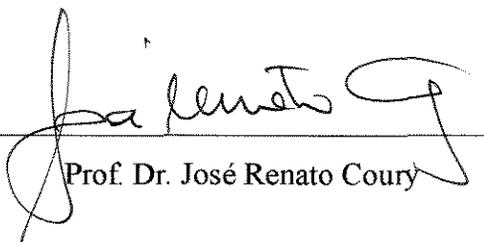
Tese de Doutorado defendida por Giuliana Piovesan Alves e aprovada em 19 de Setembro de 2003 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana



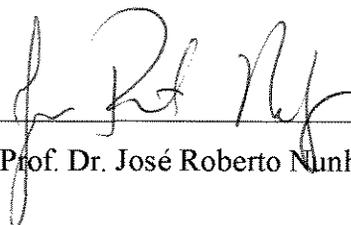
Dra. Maria Inês Ré



Prof. Dr. José Renato Coury

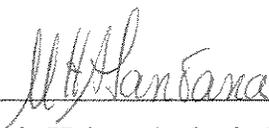


Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso



Prof. Dr. José Roberto Nunhez

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. H. Santana', is written above a horizontal line.

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela amizade, incentivo, sugestões e orientação segura e objetiva em todas as etapas do trabalho.

À Profa. Dra. Adilma Scamparini, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, que permitiu a realização dos experimentos de secagem em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, pelo ensino e sugestões nos experimentos de secagem.

Ao Prof. Dr. José Roberto Nunhez, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela valiosa contribuição e sugestões nos ensaios de agitação mecânica, assim como no desenvolvimento do modelo matemático para os ensaios de liberação.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela permissão de uso do seu laboratório, sugestões e contribuição nos cálculos de eficiência do ciclone.

Ao Prof. Dr. José Renato Coury, da Faculdade de Engenharia Química da Ufscar, pela caracterização das partículas sólidas e pelas sugestões.

À Profa. Dra. Íris Torriani, do Instituto de física da Unicamp, pelas análises de raio-X.

Às minhas irmãs Fabiana e Analiza, pela ajuda e sugestões.

Às amigas Elaine Cabral e Fernanda Martins, pelo companheirismo, ajuda e sugestões.

Aos funcionários da Unicamp Gilson, Karla, Kelly e Luís, pelo auxílio.

Aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pela convivência agradável e sugestões.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais professores, funcionários e amigos da Unicamp, que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha aprendizagem e bom andamento do trabalho.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a produção escalonável de partículas lipídicas sólidas (pós respiráveis) e lipossomas, úteis como veículos para liberação controlada de fármacos. As partículas foram produzidas pelo processo de secagem por atomização, “spray-drying”, e os lipossomas preparados por dispersão em água das partículas (pró-lipossomas) previamente produzidas com agitação de alto cisalhamento. O fosfolipídio natural hidrogenado da soja Epikuron 200SH foi utilizado como componente estrutural e o açúcar manitol como excipiente, ou material núcleo. Os tuberculostáticos Isoniazida e Pirazinamida foram incorporados em ambos os veículos, visando a produção de medicamentos de liberação controlada. A incorporação de excipientes e as condições operacionais influenciaram o rendimento mássico do processo e as propriedades das partículas sólidas, permitindo a modulação para uso em aplicações específicas. As partículas sólidas apresentaram diâmetros menores que 5 μ m e a incorporação dos fármacos variou de 20 a 100%, dependendo das condições operacionais da secagem e da formulação. Os fármacos incorporados nas partículas lipídicas sólidas foram liberados continuamente durante 24 horas, comportando-se como membranas secas. As propriedades dos lipossomas preparados foram influenciadas pelo tipo de impelidor e pela microestrutura da partícula sólida usada. Diâmetros médios da ordem de 2000nm e com distribuição homogênea de tamanhos foram obtidos com impelidor de alto cisalhamento produzido pela empresa Kroma Equipamentos Especiais Ltda.. A encapsulação da Isoniazida nos lipossomas variou de 4 a 15%, com liberação gradual de 24h e 1h, quando preparados a partir de partículas secas com microestrutura mais cristalina e mais amorfa, respectivamente. As partículas lipídicas produzidas pelo processo de secagem por atomização possuem propriedades de liberação controlada de fármacos e são úteis como pós para administração pulmonar ou como pró-lipossomas. Resultados obtidos em escala piloto demonstram a viabilidade do escalonamento do processo através da produção de partículas com características semelhantes às obtidas em escala de laboratório.

Palavras-chave: partículas lipídicas sólidas, secagem por atomização, lipossomas, liberação controlada.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ABSTRACT

This work presents scale up studies for the production of solid lipid particles (respirable powders) and liposomes, which are useful as vehicles for controlled delivery of drugs. The lipid particles were produced by spray drying, and the liposomes were prepared by hydration of the particles under high shear mixing. It was used a hydrogenated phospholipid, Epikuron 200 SH, as a structural component of the particles, and mannitol was used as excipient or core material. The tuberculosis drugs Isoniazid and Pirazinamide were incorporated in both vehicles (powder and liquid formulation). The incorporation of excipients and the operational conditions influenced the process mass yield and the solid particles properties, enabling the modulation of the particles for specific applications. The lipid particles had a diameter of less than 5 μ m, and the efficiency of drug incorporation varied from 20 to 100%, depending on the drying operational conditions and the formulation. The incorporated drugs were gradually released during 24 hours, behaving like dried membranes. The liposomes properties were influenced by the impeller type and by the solid particle microstructure. Mean diameters around 2000nm and with homogeneous size distribution were obtained using a high shear impeller produced by Kroma Equipamentos Especiais Ltda.. The Isoniazid encapsulation into liposomes varied from 4 to 15%, with a gradual release of 24 and 1 hour, when prepared by more crystalline or amorphous microstructures, respectively. The lipid particles produced by spray drying presented a controlled release of drugs, being useful as powders for pulmonary administration or pro-liposomes. Results obtained in pilot scale showed the feasibility for the scaling up of the process, through the production of particles with similar properties to the ones produced by laboratory scale.

Key words: solid lipid particles, spray drying, lipossomas, controlled release of drugs.

SUMÁRIO

Abreviatura.....	xvii
Nomenclatura.....	xix
1. INTRODUCTION.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	5
3.1. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1.1. Produção e aplicações.....	5
3.1.2. Formulações em pó para administração pulmonar.....	6
3.1.3. Transição vítrea.....	7
3.1.4. O uso de manitol como excipiente em formulações.....	8
3.1.5. Métodos para produção de partículas respiráveis.....	9
3.1.5.1. Moagem em jato de ar.....	9
3.1.5.2. Precipitação por fluido supercrítico (SCFP).....	9
3.1.5.3. Secagem por atomização.....	10
3.1.5.3.1. Considerações e aplicações.....	10
3.1.5.3.2. Processo de secagem.....	11
3.2. Material e Métodos.....	17
3.2.1. Material.....	17
3.2.2. Métodos.....	17
3.2.2.1. Cálculo da massa molar do fosfolípido Epikuron 200SH.....	17
3.2.2.2. Produção de partículas através da secagem por atomização.....	18
3.2.2.3. Planejamento Estatístico de Experimentos.....	18
3.2.2.4. Influência do diâmetro do atomizador e temperatura da solução de alimentação.....	22
3.2.2.5. Influência da concentração de manitol.....	22
3.2.2.6. Incorporação do Colesterol.....	22
3.2.2.7. Caracterização do Processo.....	23
3.2.2.7.1. Rendimento.....	23
3.2.2.7.2. Eficiência do ciclone.....	23
3.2.2.8. Caracterização das partículas.....	25
3.2.2.8.1. Concentração total de fosfolípido.....	25
3.2.2.8.2. Diâmetro geométrico e distribuição de tamanhos.....	25
3.2.2.8.3. Diâmetro aerodinâmico.....	25
3.2.2.8.4. Densidade.....	26
3.2.2.8.5. Atividade da água.....	26
3.2.2.8.6. Cristalinidade.....	26
3.2.2.8.7. Morfologia.....	26
3.2.2.8.8. Transição de fases.....	27
3.3. Resultados e Discussão.....	27
3.3.1. Influência das variáveis operacionais sobre o rendimento mássico da secagem.....	27
3.3.2. Eficiência do ciclone.....	36
3.3.3. Caracterização das partículas.....	37
3.3.3.1. Propriedades Estruturais.....	37
3.3.3.1.1. Cristalinidade das partículas secas.....	37
3.3.3.2. Propriedades físicas.....	41

3.3.3.2.1. Atividade da água	41
3.3.3.2.2. Diâmetros geométricos e aerodinâmicos e distribuição de tamanhos	42
3.3.4. Influência da concentração de manitol	43
3.3.4.1. Cristalinidade	43
3.3.4.2. Morfologia.....	45
3.3.4.3. Transição de fases.....	47
3.3.5. Incorporação do colesterol.....	49
4. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PARA LIBERAÇÃO	
<u>CONTROLADA DE FÁRMACOS</u>	51
4.1. Revisão Bibliográfica.....	51
4.1.1. Lipossomas: estrutura e função.....	51
4.1.2. Métodos de preparação dos lipossomas.....	54
4.1.2.1. Método do filme seco de lipídios	55
4.1.2.2. Injeção de solventes voláteis	55
4.1.2.3. Método da remoção de detergente.....	56
4.1.2.4. Método de secagem por atomização.....	56
4.1.2.5. Método da desidratação-rehidratação (DRV/LMLV)	57
4.1.2.6. Método do Pró-lipossoma	57
4.1.3. Métodos de redução e homogeneização de tamanhos dos lipossomas	58
4.1.4. Escalonamento da produção de lipossomas.....	59
4.1.5. Produção industrial de lipossomas	61
4.1.6. Agitação mecânica - Tipos de impelidores e regimes de mistura.....	62
4.2. Material e Métodos	64
4.2.1. Material.....	64
4.2.2. Métodos	65
4.2.2.1. Preparação de lipossomas através do método de Bangham.....	65
4.2.2.2. Hidratação das partículas secas: preparação e homogeneização dos lipossomas	65
4.2.2.2.1. Estudo da redução e homogeneização de tamanhos dos lipossomas.....	66
4.2.2.3. Caracterização dos lipossomas.....	67
4.2.2.3.1. Concentração total de lipídios (L_F).....	67
4.2.2.3.2. Medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas.....	67
4.2.2.3.3. Temperatura e energia de transição de fases	67
4.3. Resultados e Discussão	68
4.3.1. Temperatura de transição de fases do Epikuron 200SH.....	68
4.3.2. Produção de lipossomas por agitação mecânica	68
4.3.2.1. Diâmetro principal e distribuição de tamanhos.....	68
4.3.3. Incorporação de colesterol.....	70
5. INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE PRIMEIRO TRATAMENTO	
<u>DA TUBERCULOSE EM PARTÍCULAS SÓLIDAS E LIPOSSOMAS</u>	72
5.1. Revisão Bibliográfica.....	72
5.1.1. A tuberculose e a sua incidência atual.....	72
5.1.2. Fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose.....	73
5.1.3. Efeitos “in vivo” e “in vitro” de tuberculostáticos encapsulados	76
5.1.4. Modelos difusionais para a liberação controlada de medicamentos	77
5.2. Material e Métodos	79
5.2.1. Material.....	79
5.2.2. Métodos	79
5.2.2.1. Incorporação dos fármacos em partículas sólidas	79

5.2.2.1.1. Caracterização das partículas	80
5.2.2.1.2. Concentração total dos fármacos (F_F)	80
5.2.2.1.3. Eficiência de incorporação	81
5.2.2.1.4. Liberação dos fármacos.....	81
5.2.2.1.5. Determinação dos parâmetros do modelo de encapsulação utilizando-se o método da máxima verossimilhança	84
5.2.2.2. Encapsulação dos fármacos em lipossomas.....	87
5.2.2.2.1. Hidratação do filme seco de lipídios.....	87
5.2.2.2.2. Hidratação das partículas produzidas através de secagem por atomização	87
5.2.2.2.3. Caracterização dos lipossomas	88
5.2.2.3. Produção de partículas sólidas em escala piloto	90
5.3. Resultados e Discussão	91
5.3.1. Partículas sólidas	91
5.3.1.1. Incorporação dos fármacos nos sólidos processados.....	91
5.3.1.1.1. Cristalinidade.....	92
5.3.1.1.2. Morfologia e tamanhos	95
5.3.1.1.3. Eficiência de incorporação e massa de fármaco por massa de formulação	98
5.3.1.1.4. Transição de fases.....	100
5.3.1.1.5. Liberação dos fármacos do produto seco	100
5.3.2. Lipossomas	105
5.3.2.1. Propriedades dos lipossomas preparados pelo método de Bangham	105
5.3.2.1.1. Diâmetro médio e estabilidade de estocagem	105
5.3.2.1.2. Estabilidade das vesículas em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$	106
5.3.2.1.3. Desempenho da encapsulação	107
5.3.2.2. Propriedades dos lipossomas preparados por hidratação de partículas secas	110
5.3.2.2.1. Estabilidade das vesículas em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$	110
5.3.2.2.2. Desempenho da encapsulação	111
5.3.2.2.3. Liberação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida	112
5.3.2.3. Características de processo e das partículas obtidas em escala piloto.....	115
6. CONCLUSÕES	119
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	121
8. Referências Bibliográficas	122
Anexo I	128
Anexo II.....	131

ABREVIATURAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

br: solução branco

DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DOTS: tratamento diretamente observado de curta duração

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

DRV: vesículas desidratadas-rehidratadas

DSC: calorimetria diferencial de varredura

DSPC: distearoilfosfatidilcolina

Epk: epikuron 200SH

FDA: Food and Drug Administration

GL: graus de liberdade

GRAS: “Generally Recognized as Safe”

HIV: vírus da imunodeficiência humana

Iz: isoniazida

K: lipossomas preparados sob agitação mecânica no impelidor de alto cisalhamento da empresa Kroma

LMLV: vesículas multilamelares liofilizadas

LPSP: partículas lipídio-proteína-açúcar

LUV: vesículas unilamelares grandes

microDSC: micro calorimetria diferencial de varredura

MLV: vesículas multilamelares

MQ: média quadrática

OMS: Organização Mundial de Saúde

PLGA: ácido poliláctico-co-glicólico

Pz: pirazinamida

QELS: método quasi-elastic light scattering

R: lipossomas preparados sob agitação rotatória

rhDNase: deoxiribonuclease humana recombinante

RRB: distribuição de tamanhos de partículas do tipo Rosin-Rammler-Bennet

SCFP: precipitação por fluido supercrítico

SDLM: micropartículas lipídicas produzidas através de secagem por atomização

xviii

SQ: soma quadrática

SUV: vesículas unilamelares pequenas

NOMENCLATURA

- A_{H_2O} : atividade da água
- B_c : uma das dimensões do ciclone ($B_c=0,25*D_c$) [cm]
- C_{Epik} : concentração do fosfolípido epikuron [mM]
- C_{man} : concentração de manitol [mM]
- D_{atom} : diâmetro do bico do atomizador [mm]
- D' : parâmetro do modelo de distribuição de tamanhos RRB
- D_{aer} : diâmetro aerodinâmico [μ m]
- D_c : diâmetro da parte cilíndrica do ciclone [cm]
- D_{corte} : diâmetro de corte do ciclone [μ m]
- D_{princ} : diâmetro principal dos lipossomas [nm]
- E_{cic} : eficiência do ciclone [%]
- E_E : eficiência de encapsulação [%]
- E_I : eficiência de incorporação [%]
- F_0 : concentração de fármaco inicial [mM]
- F_F : concentração de fármaco final [mM]
- I: geratriz do planejamento fatorial fracionário
- Iz_0 : concentração inicial de isoniazida [mM]
- Iz_F : concentração final de isoniazida [mM]
- i_i : contrastes da variável operacional i
- L_0 : concentração de lipídios inicial [mM]
- L_F : concentração de lipídios final [mM]
- M: concentração de manitol na solução de alimentação [%]
- MM: massa molar [g/mol]
- n: parâmetro do modelo de distribuição de tamanhos RRB
- n_L : número de moles da dispersão lipídica
- n_T : número de moles de tensoativo
- “p”: parâmetro estatístico da distribuição de probabilidade t com dois graus de liberdade
- p: pressão parcial de vapor de água no substrato
- p^o : pressão parcial de vapor a mesma temperatura e pressão
- P_c : pressão crítica [bar]
- Q: vazão de ar [m^3/s]

R: rendimento mássico do processo de secagem por atomização [%]

R^2 : coeficiente de determinação

“t(2)”: parâmetro estatístico da distribuição de probabilidade t com dois graus de liberdade

T: temperatura interna da câmara de secagem [°C]

T_c : temperatura crítica [°C]

T_g : temperatura de transição vítrea [°C]

T_m : temperatura de transição de fases [°C]

T_s : temperatura da solução de alimentação [°C]

u: velocidade do ar [m/s]

URE%: umidade relativa de equilíbrio [%]

v: velocidade de agitação [rpm]

V: vazão da solução de alimentação [mL/min]

μ : viscosidade absoluta do ar [Pa.s]

ρ_s : densidade da partícula [g/cm³]

ρ : densidade do ar [g/cm³]

1. INTRODUÇÃO

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas esféricas, formadas por bicamadas de lipídios que delimitam um compartimento interno aquoso central. Essa estrutura permite a encapsulação de substâncias de natureza hidrofílica, hidrofóbica ou anfifílica, e a posterior liberação controlada do conteúdo encapsulado através da bicamada lipídica. Além disso, outras características importantes para a indústria farmacêutica são a sua biocompatibilidade, não imunogenicidade, maior interação com as células e possibilidade de administração por várias rotas.

Lipídios têm sido aplicados com sucesso para a encapsulação de bioativos de naturezas diversas, tais como aromas, enzimas, produtos cosméticos e fármacos, dentre outros. As primeiras aplicações datadas da década de 1960 utilizaram fosfolipídios para a preparação de lipossomas capazes de encapsular ativos cosméticos e fármacos. A sua eficiência como veículo carreador e promotor da liberação controlada dos compostos encapsulados deve-se a mimetização das membranas celulares e capacidade de interação com compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. A grande diversidade de lipídios naturais e sintéticos, na grande maioria biocompatíveis, faz com que os lipossomas possam ser projetados e construídos como partículas inteligentes capazes de serem direcionadas para sítios específicos no organismo humano e atenderem aos requerimentos das várias rotas de administração e de atuação dos fármacos. Apesar dos benefícios comprovados, ainda é pequena a quantidade de medicamentos comercializados em formulação lipossomal. Dentre as principais razões para isto estão as limitações de estabilidade em solução e escalonamento dos processos de produção [Lasic, 1993].

Na tentativa de contornar as limitações de estabilidade durante a estocagem, compósitos constituídos de ativos e fosfolipídios foram produzidos na forma de micropartículas para posterior utilização na preparação de lipossomas. A secagem por atomização, ou “spray-drying”, foi a técnica mais usada para a produção dessas micropartículas, e estudos envolvendo a incorporação de vários ativos têm sido descritos na literatura desde a década de 1980. Alguns exemplos incluem o processamento de ativos hidrofóbicos para aplicações cosméticas [Redziniak e Meybeck, 1985], Anfotericina B para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas [Kohane et al., 2002; Kim e Kim, 2001]. Kikuchi e colaboradores [1991], estudaram a produção de estruturas lipídicas amorfas mais

fáceis de serem hidratadas que os filmes de Bangham na preparação de lipossomas. A mesma técnica foi também estudada na secagem de lipossomas pré-formados encapsulando fármacos tal como descrito nos trabalhos de Kikuchi e colaboradores [1987]; Goldbach e colaboradores [1993i]; Goldbach e colaboradores [1993ii].

A produção de compósitos lipídicos para a administração de fármacos na forma de pós é descrita em estudos recentes apresentados em geral na forma de patentes [Bot et al., 2002; Weers et al., 2002; Kohane et al.; 2002]. Nestes estudos, as partículas foram produzidas através de secagem por atomização ou evaporação do solvente em emulsões múltiplas e coacervados simples e complexos. Estas partículas secas também foram usadas para a preparação de formulações líquidas, pastosas ou géis.

Os vários trabalhos da literatura demonstram a grande importância dos lipídios, ao lado de outros polímeros, para a veiculação de bioativos e desenvolvimento de produtos de ação mais eficaz que na sua forma livre, capazes de serem apresentados em diversas formulações e administrados por várias rotas.

Atualmente, a secagem por atomização tem sido considerada como um processo simples e eficiente para a produção de partículas incorporando bioativos para aplicações farmacêuticas e cosméticas. As principais vantagens da técnica são o baixo custo, processamento em uma única etapa e facilidade de escalonamento [Baras et al., 2000; Palmieri et al., 1994; Oneda e Ré, 2003]. Apesar da vasta literatura envolvendo a secagem por atomização na produção de partículas de polímeros, os estudos com lipídios ainda são escassos. Tanto quanto é do nosso conhecimento, não há estudos na literatura voltados para aspectos de engenharia da secagem de lipídios por esta técnica.

Este trabalho apresenta um estudo sistemático da produção de pós respiráveis e lipossomas para liberação controlada de fármacos, aplicado aos tuberculostáticos de primeiro tratamento. O estudo é apresentado em três partes, enfocando na primeira a produção de partículas lipídicas através da secagem por atomização, com avaliação da influência das variáveis operacionais sobre o rendimento mássico do processo e propriedades das partículas. Em uma segunda parte é apresentada a produção de lipossomas com propriedades controladas, a partir da dispersão em meio aquoso, com agitação mecânica de alto cisalhamento das partículas previamente preparadas. Ambos os casos visam o aumento de escala da produção de formulações farmacêuticas de liberação

controlada. Na terceira parte é apresentado o estudo da incorporação e liberação dos tuberculostáticos Isoniazida e Pirazinamida das partículas sólidas e dos lipossomas, visando beneficiar a terapia desta doença.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção escalonável de partículas lipídicas sólidas e lipossomas, úteis para liberação controlada de fármacos, pelos processos de secagem por atomização e dispersão de partículas secas em meio aquoso por agitação mecânica.

O estudo foi abordado com ênfase nos seguintes aspectos:

- Influência das condições operacionais da secagem por atomização no rendimento mássico do processo e nas propriedades das partículas produzidas, visando a modulação das suas propriedades para aplicações específicas.
- Avaliação da liberação dos fármacos incorporados nas partículas sólidas.
- Influência do tipo de agitador e das condições operacionais da agitação mecânica na dispersão das partículas secas em meio aquoso e produção de lipossomas com propriedades controladas.
- Caracterização dos lipossomas produzidos e comparação com os obtidos através da preparação pelo método laboratorial convencional de Bangham.
- Incorporação dos fármacos de primeiro tratamento da tuberculose Pirazinamida e Isoniazida em ambas as formulações, visando a produção de medicamentos de liberação controlada com maior índice terapêutico que a forma livre convencional.

3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. Produção e aplicações

Estudos envolvendo a produção de partículas sólidas de lipídios para administração de fármacos em formulações na forma de pós são recentes e descritos em geral em patentes. Bot e colaboradores [2002] produziram micropartículas lipídicas através da técnica de secagem por atomização (SDLM – “spray-dried lipid microparticles”) compostas de lipídio, agente terapêutico e ligante específico para um receptor da superfície celular, que possibilita a penetração do agente terapêutico nas células de interesse. Weers e colaboradores [2002] produziram pós de lipídios úteis para liberação de fármacos, para serem preferivelmente administrados por inalação. Os pós possuíam em sua formulação um cátion polivalente, em concentração suficiente para aumentar a temperatura de transição da fase gel para a fase líquido cristalina, resultando no aumento da dispersibilidade e na estabilidade de estocagem. Os métodos empregados para a produção dessas partículas secas foram a secagem por atomização, liofilização e evaporação do solvente de emulsão múltipla. Kohane e colaboradores [2002] desenvolveram um novo veículo para a liberação de fármacos denominado partículas de lipídio-proteína-açúcar (LPSP – “lipid protein sugar particle”). O lipídio recomendado como preferível foi o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC – “dipalmitoylphosphatidylcholine”), a proteína foi a albumina e o açúcar lactose. Essas partículas foram indicadas para a encapsulação de qualquer agente terapêutico, para diagnóstico ou profilático. Adicionalmente, a invenção fornece um veículo para a encapsulação de um agente anestésico, por exemplo a bupivacaína, o qual é liberado próximo ao nervo onde se deseja fazer a anestesia local. Além da forma de pó, essas partículas foram indicadas para uso em outras formulações tais como pastas, cremes, loções, óleos, soluções e líquidos para nebulização. As micropartículas podem ser produzidas através de várias técnicas, tais como secagem por atomização, extração de solvente, e separação de fase.

3.1.2. Formulações em pó para administração pulmonar

A questão chave relacionada à administração de fármacos para o pulmão é a dificuldade criada pela natureza para as partículas sólidas alcançarem e se depositarem nessa região. Em geral as partículas tendem a se depositar na garganta durante a inalação, ou em áreas onde são obtidos efeitos terapêuticos brandos, devido à alta umidade, ramificação progressiva e concomitante estreitamento das vias respiratórias, que proporcionam um caminho tortuoso para a partícula inalada. O diâmetro aerodinâmico é usado para descrever o pó aerolisado, considerando a morfologia, densidade e o tamanho da partícula na sua determinação. Acredita-se que o tamanho máximo de partícula adequado (diâmetro aerodinâmico) para deposição na via respiratória central seja aproximadamente $5\mu\text{m}$, mas somente partículas de $2\text{-}3\mu\text{m}$ alcançam o pulmão (alvéolos). Partículas maiores que $1\mu\text{m}$ são fagocitadas pelos macrófagos, enquanto partículas menores que $0,5\mu\text{m}$ são exaladas [Malcolmson e Embleton, 1998; O'Hara e Hickey, 2000].

Um dos problemas associados à produção de partículas na forma de pó para administração pulmonar é a dificuldade de obtenção de sólidos adequados, tais como as formas amorfas. Um sólido amorfo pode ser definido como um material que possui ordem molecular somente em pequeno alcance, não possuindo a conformação molecular bem definida de longo alcance dos cristais. O uso dos fármacos na sua forma amorfa é apreciado na área farmacêutica devido à melhora do seu desempenho, em razão da sua maior solubilidade, maior taxa de dissolução, instabilidade, e na maioria das vezes, melhor compressibilidade, se comparado com os cristais correspondentes [Yu, 2001]. Por exemplo, sabe-se que para muitos fármacos a dissolução no trato gastrointestinal é o fator limitante para a sua absorção, assim, o aumento da taxa de solubilização do fármaco conduz ao aumento da sua biodisponibilidade. Um exemplo clássico de produto farmacêutico amorfo que possui melhor propriedade de dissolução se comparado ao equivalente cristalino é a Novobiocina [Craig et al., 1999].

Entretanto, o principal problema associado aos sistemas farmacêuticos amorfos é a sua estabilidade físico-química e a biodisponibilidade do material ativo. Além disso, os materiais amorfos são termodinamicamente instáveis, e tendem a se recristalizar durante a estocagem. A água pode acelerar a cristalização, tanto agindo como plastificante aumentando a mobilidade estrutural, quanto como unidade formadora de cristais hidratados. O último caso torna-se relevante quando são usados excipientes protetores que podem

cristalizar como hidratos, tais como lactose, trealose, glicose e manitol [Yu, 2001; Craig et al., 1999]. Uma propriedade importante relacionada com a estabilidade dos sólidos amorfos e a sua cristalização é a transição vítrea, a qual influencia diretamente a vida útil do produto.

3.1.3. Transição vítrea

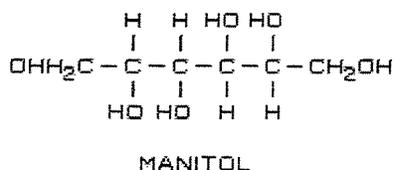
Muitos sólidos, quando aquecidos acima do seu ponto de fusão e rapidamente resfriados não se cristalizam, mas, na forma de um líquido super-resfriado, normalmente formam um sólido frágil e transparente, chamado de vidro ou sólido vítreo. O interesse no uso desses materiais na área farmacêutica vem do seu estado de alta energia, o qual resulta em altas taxas de dissolução, visto que possuem a estrutura de um líquido e o nível de energia de uma solução. Termodinamicamente, o fenômeno conhecido como transição vítrea ocorre quando materiais no estado super-resfriado sofrem mudança na capacidade calorífica, observada em gráficos de fluxo de calor versus temperatura. Apesar disso, a transição vítrea é uma grandeza cinética, pois depende do processo no qual segmentos “congelados” do material adquirem movimentação. À temperaturas abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g) os movimentos translacionais das moléculas cessam, impedindo a reorganização molecular e conseqüentemente a cristalização dos materiais. Assim, é aconselhável a estocagem dos materiais amorfos a temperaturas abaixo da temperatura de transição vítrea [Kerc e Srcic, 1995; Coleman e Craig, 1996; Craig et al., 1999].

A técnica mais usada para caracterizar a temperatura de transição vítrea, através da mudança na capacidade calorífica, é a calorimetria diferencial de varredura (DSC – “differential scanning calorimetry”). A magnitude da transição diminui com o aumento da cristalinidade dos materiais, dificultando a sua detecção em materiais com grandes porções cristalinas. Algumas substâncias, a água em particular, agem como plastificantes, aumentando a mobilidade das moléculas e diminuindo a temperatura de transição vítrea, fazendo com que os materiais se cristalizem à temperatura de estocagem. Assim, é também recomendado que o produto seja mantido em ambiente seco, sob umidade controlada [Craig et al., 1999].

3.1.4. O uso de manitol como excipiente em formulações

O manitol é um álcool hexahídrico, ou hexitol, e caracteriza-se por ser um pó seco, inodoro, de sabor adocicado e estável no estado seco ou em soluções aquosas. A Figura 1 apresenta a sua fórmula estrutural, empírica e a massa molar (MM_{man}) [Siniti et al., 1999; Kibbe, 2000]. Adicionalmente, sabe-se da literatura da existência de vários polimorfos do manitol, cada qual com propriedades físico-químicas distintas. A classificação mais antiga considera as formas α , β ou γ , enquanto classificações mais atuais utilizam a nomenclatura mod. I, II ou III [Burger et al., 2000].

Fórmula estrutural:



Fórmula empírica: $C_6H_{14}O_6$

Massa molar: 182,17g/mol

Figura 1: Fórmula estrutural, empírica e massa molar do manitol.

O manitol é largamente utilizado como excipiente em formulações farmacêuticas, por exemplo, em comprimidos de antiácidos ou vitaminas. Terapeuticamente, ele é administrado pela via parenteral (vias invasivas) como diurético osmótico, adjunto no tratamento de falhas renais agudas, agente para reduzir a pressão intracranial, para o tratamento de edemas cerebrais e redução da pressão intraocular. Administrado oralmente, o manitol não é significativamente absorvido pelo trato gastrintestinal, mas em grandes doses, superiores a 20 gramas, ele pode causar diarreia. Entretanto, a quantidade de manitol usada como excipiente é consideravelmente menor que a usada terapeuticamente, e conseqüentemente há uma baixa incidência de efeitos colaterais associada ao seu uso.

O manitol é listado na GRAS (“Generally Recognized as Safe”), aceito para uso como aditivo em alimentos na Europa, incluído na FDA (“U.S. Food & Drug Administration”) no guia de ingredientes inativos para injeções intraperitoneal,

intramuscular, intravenosa e subcutânea, assim como para infusões e comprimidos e cápsulas bucais, orais e sublinguais [Kibbe, 2000].

3.1.5. Métodos para produção de partículas respiráveis

3.1.5.1. Moagem em jato de ar

A moagem em jato de ar é o método tradicional mecânico para produção de partículas sólidas respiráveis, o qual envolve a moagem de alta intensidade. Esta técnica fornece somente um controle limitado sobre características importantes dos sólidos, tais como tamanho, forma e morfologia. A moagem intensa pode também causar uma mudança indesejável nas propriedades físico-químicas do material. Mas o principal problema relacionado a esta técnica é a produção de partículas com alta carga eletrostática, o que as torna muito coesivas e faz com que o material tenha pouca fluidez, prejudicando o seu uso em aparelhos de inalação [Malcolmson e Embleton, 1998].

3.1.5.2. Precipitação por fluido supercrítico (SCFP)

A precipitação por fluido supercrítico (SCFP – “supercritical fluid precipitation”) é uma nova técnica para a produção de partículas respiráveis. Os sólidos preparados são mais uniformes em termos de cristalinidade, morfologia, distribuição de tamanhos e forma, se comparados com os preparados através da moagem. Além disso, as partículas são menos carregadas eletrostaticamente se comparadas com as produzidas através de métodos mecânicos, o que as torna mais fluidas e mais dispersáveis, características importantes na inalação.

Embora outros fluidos supercríticos sejam disponíveis, o dióxido de carbono é o mais utilizado, devido ao seu baixo custo, não toxicidade e parâmetros críticos acessíveis ($T_c=31,1^\circ\text{C}$ e $P_c=73,8\text{bar}$). Para a produção do produto desejado, muito cuidado deve ser dispensado com respeito à natureza da droga, escolha do fluido super crítico e solvente, projeto de planta e parâmetros de operação.

Um exemplo de utilização da precipitação por fluido supercrítico para a produção de partículas de Salmeterol Xinafoato mostrou que elas fornecem maiores frações respiráveis, se comparadas com partículas produzidas através de cristalização e micronização

tradicionais. Mas, apesar das suas vantagens e potencial, a precipitação por fluido supercrítico é ainda uma tecnologia emergente, e ainda não é muito utilizada na produção de partículas para inalação [Malcolmson e Embleton, 1998].

3.1.5.3. Secagem por atomização

3.1.5.3.1 Considerações e aplicações

A secagem por atomização apresenta como vantagens a simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo e condições brandas de operação, além de ser um processo esterilizável e escalonável. Embora seja uma tecnologia bem estabelecida nas indústrias alimentícia e farmacêutica, o maior desafio é a recuperação do material atomizado em um nível economicamente viável. Apesar disso, esta técnica tem se mostrado muito atraente devido a sua aplicação na micronização de partículas farmacêuticas, tais como peptídeos e proteínas, para a distribuição na via de circulação sistêmica através da rota pulmonar. As estruturas terciárias e quaternárias complexas desses agentes terapêuticos fazem com que eles sejam muito lábeis para a micronização mecânica, e os solventes usados na precipitação por fluido supercrítico podem causar a sua desnaturação.

Peptídeos e proteínas têm sido atomizados a partir de soluções puras ou, mais usualmente, na presença de excipientes. O propósito desses materiais, normalmente açúcares, é estabilizar a biomolécula durante o processo de secagem e principalmente durante a estocagem. Entretanto, o uso de excipientes pode gerar um paradoxo entre a estabilidade bioquímica proporcionada ao material ativo às custas da estabilidade física.

Este fato é bem ilustrado no trabalho feito na Genentech Inc. sobre deoxiribonuclease humana recombinante (rhDNase). Este material foi atomizado a partir de uma solução pura e a partir de soluções contendo diferentes concentração de lactose co-dissolvida. Foi observado que a estabilidade bioquímica da rhDNase, caracterizada pela porcentagem de monômero e pela atividade relativa, aumentou com o conteúdo de açúcar, possivelmente como resultado da substituição das moléculas de água ou pelo impedimento físico proporcionado pela lactose amorfa. Entretanto, a lactose amorfa é fisicamente instável durante a estocagem na presença de umidade, a qual provoca a sua recristalização espontânea. Como resultado, os pós de rhDNase contendo mais lactose recristalizaram durante a estocagem à temperatura de 25°C e umidade mínima de 38%, o que conduziu a

um decréscimo acentuado na fração respirável *in vitro* devido a aglomeração dos cristais. A estabilidade física dos pós aumentou com o decréscimo do conteúdo de lactose, provavelmente devido à presença da proteína, que impediu o processo de cristalização. Além disso, o pó puro de rhDNase permaneceu estável quando estocado por 4 semanas a 25°C/57% de umidade. Em outro estudo, a presença de manitol também provocou a instabilidade física de pós-secos [Malcolmson e Embleton, 1998].

O problema da estabilidade física descrito acima no estudo da rhDNase provém principalmente do uso da lactose como açúcar estabilizante. Embora todos os açúcares sejam no mínimo parcialmente amorfos após a atomização, esta forma de lactose é particularmente higroscópica, e a absorção de água causa a queda na sua temperatura de transição vítrea (T_g) (item 3.1.3). Sabe-se que a lactose amorfa anidra tem uma T_g de 101°C, mas ela cai a 25°C após a absorção de 7,2% (peso/peso) de água. Uma vez que a T_g cai abaixo da temperatura ambiente, as regiões amorfas do açúcar não estão mais “congeladas” nessa temperatura, e a mobilidade molecular resultante permite que a matriz se reordene na estrutura termodinamicamente mais estável, a cristalina [Malcolmson e Embleton, 1998].

3.1.5.3.2. *Processo de secagem*

O processo de secagem por atomização envolve quatro etapas, ilustradas na Figura 2: atomização da solução de alimentação, contato entre as gotículas produzidas com o fluido de secagem (normalmente ar), evaporação do solvente e recuperação do produto.

A palavra atomização aqui empregada não tem nenhuma relação com átomos ou com a física nuclear, mas sim específica o processo que “quebra” o líquido em milhões de gotículas individuais. A energia necessária para este processo é fornecida por efeitos centrífugos, cinéticos, sônicos ou de pressão. Durante a secagem, as gotículas entram em contato com o ar quente, ocorrendo uma rápida evaporação da umidade.

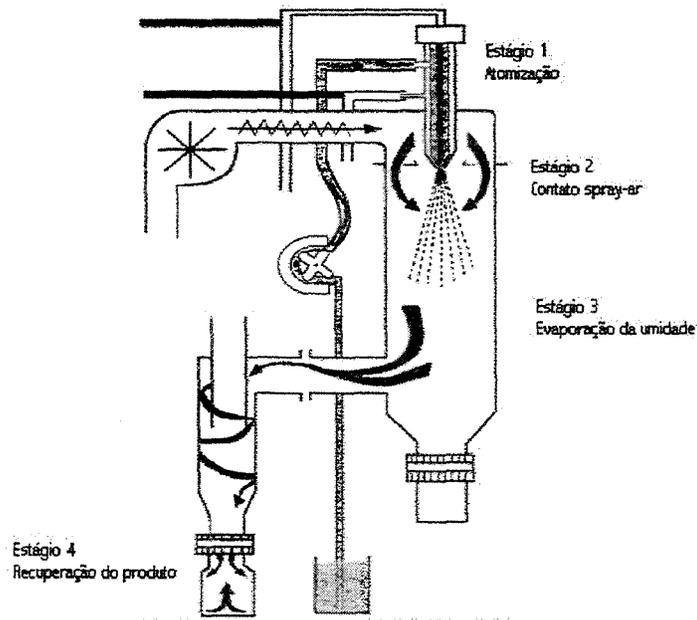


Figura 2: Etapas do processo de secagem por atomização (irtec1.irtec.bo.cnr.it/proc-spray-drying.htm).

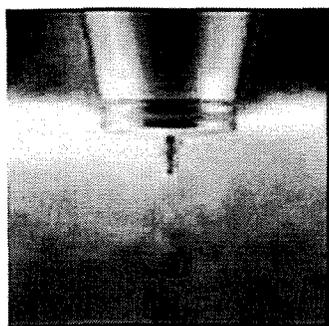
Como qualquer tipo de secador, o equipamento promove a remoção da umidade através da aplicação de calor ao produto alimentado, além do seu controle no meio de secagem. O calor é aplicado através do ar aquecido e quando a solução de alimentação é borrifada neste ambiente, ocorre a evaporação dos solventes. O controle da umidade é feito através da regulagem do fluxo de ar e da temperatura. Quando são usados solventes inflamáveis ou explosivos deve-se utilizar um gás inerte para prevenir explosões, por exemplo, o nitrogênio. Vale ainda ressaltar que quanto maior a temperatura de secagem e o conteúdo de sólidos, maior é a eficiência térmica do processo [Masters, 1972].

Etapas:

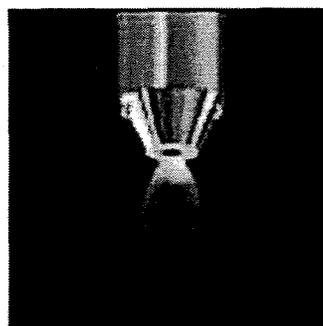
Atomização da solução de alimentação

A seleção e operação do atomizador são de extrema importância para a obtenção de produtos de alta qualidade a um baixo custo. A atomização deve criar gotículas com condições de operação ótimas, levando à obtenção de um produto seco com as características desejadas.

Os atomizadores podem ser do tipo rotatório (“rotary”) ou do tipo duplo fluido (“nozzle”), os quais podem ser observados na Figura 3. Os atomizadores rotatórios podem ser em forma de disco ou rodas, e a energia utilizada por eles é a centrífuga. Os atomizadores rotatórios do tipo roda são disponíveis para processamento de taxas de alimentação de até dezenas de toneladas por hora. Os atomizadores do tipo duplo fluido utilizam energia de pressão, sônica ou cinética, e processam taxas de alimentação inferiores aos rotatórios.



(a)



(b)

Figura 3: Atomizadores do tipo (a) rotatório, (b) duplo fluido (www.niroinc.com/html/chemical/cpilots.html).

A seleção do atomizador depende da natureza da solução de alimentação e das características desejadas para o produto seco. Para todos tipos de atomizadores, um aumento na quantidade de energia disponível para atomização do líquido resulta em gotas com tamanhos menores. Se a energia disponível para atomização é mantida constante, mas a vazão de alimentação aumenta, como resultado são formadas gotas com tamanhos maiores. O grau de atomização também depende das propriedades de fluido da solução de alimentação, onde valores maiores de viscosidade e tensão superficial resultam em gotas com tamanhos maiores, para a mesma quantidade de energia disponível para atomização.

Contato gotículas-ar

Um fator importante no projeto do secador por atomização é o modo pelo qual as gotículas atomizadas entram em contato com o ar de secagem. Este contato é determinado pelas várias posições disponíveis do atomizador em relação à entrada do ar.

O produto e o ar podem passar através da câmara de secagem em fluxos co-correntes. Este arranjo é utilizado principalmente para produtos sensíveis ao calor. A evaporação das gotas é rápida e o produto não é sujeito à degradação térmica. Atomizadores do tipo rotatório ou duplo fluido podem ser usados em secadores de fluxos co-correntes. Com os atomizadores rotatórios a trajetória radial das gotículas pode ser controlada, prevenindo o depósito de produto nas paredes da câmara.

Alternativamente, as gotículas podem entrar em contato com o ar de secagem em fluxo contra-corrente. Este arranjo fornece uma excelente utilização do calor para a secagem, e é normalmente utilizado com secadores do tipo duplo fluido.

Existem também secadores com fluxos mistos, que incorporam ambos fluxos concorrente e contra-corrente. Na Figura 4 podem ser observados os diferentes tipos de fluxos produto-ar.

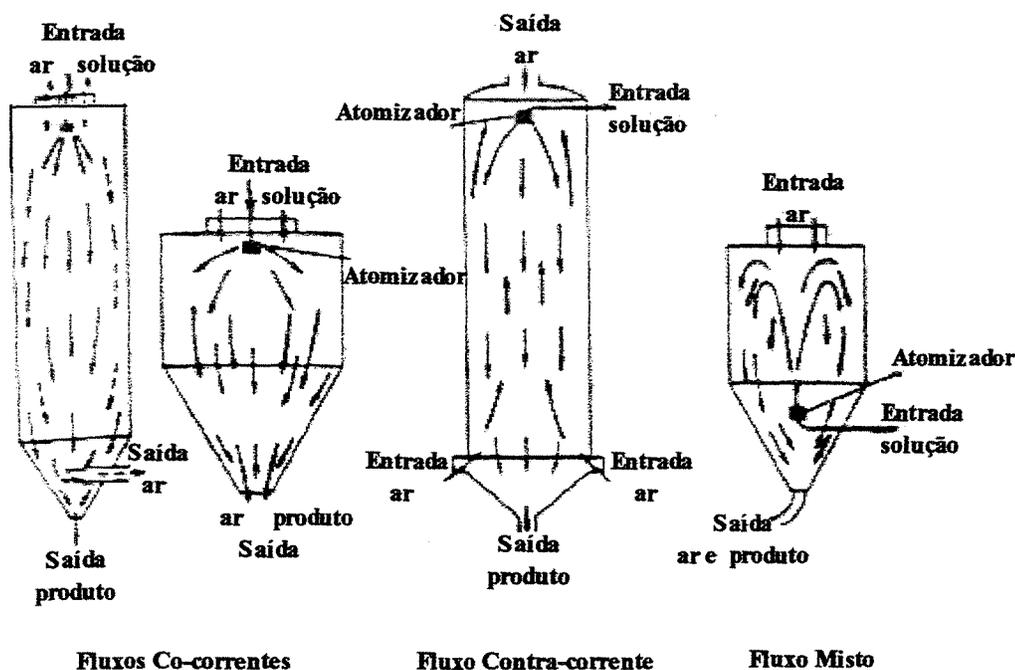


Figura 4: Fluxos produto-ar em secadores por atomização (Adaptação de Masters, 1972).

Em todos os casos o movimento do ar pré-determina a taxa e o grau de evaporação, influenciando a passagem das gotas através da zona de secagem e a concentração do produto nas paredes do secador. A seleção da melhor forma de contato gota-ar depende do

produto envolvido. Normalmente para produtos que suportam altas temperaturas é usado fluxo contra-corrente, enquanto que para produtos lábeis é usado fluxo concorrente.

Secagem

Quando as gotículas atomizadas entram em contato com o ar de secagem ocorre a evaporação do filme de vapor saturado, o qual é rapidamente fixo na superfície da gotícula. A temperatura da superfície da gota aproxima-se da temperatura do ar de secagem. A evaporação ocorre em duas etapas. Primeiro há suficiente umidade dentro da gota para reabastecer a perda da superfície. A difusão da umidade de dentro da gota mantém a superfície saturada e enquanto este processo continua, a evaporação ocorre a uma taxa constante, no chamado primeiro período da secagem. Quando o conteúdo de umidade é reduzido a um nível insuficiente para manter a condição de saturação na superfície, um ponto crítico é alcançado, e uma camada seca se forma na superfície da gota. A evaporação é então dependente da taxa de difusão da umidade através da camada da superfície seca. A espessura da camada seca aumenta com o tempo, causando um decréscimo na taxa de evaporação. Este período é chamado de final ou segundo período da secagem.

Desta forma, uma parte substancial da evaporação da gota ocorre quando a sua superfície está saturada e fria. O projeto da câmara de secagem e a taxa de fluxo de ar estabelecem o tempo de residência da gota na câmara, com a remoção da umidade desejada, e a retirada do produto do secador antes que a sua temperatura possa aumentar a temperatura de saída do ar de secagem da câmara. Portanto, há pouca probabilidade de dano térmico ao produto.

A distribuição das gotas atomizadas sofre mudanças durante a evaporação, e produtos diferentes exibem diferentes características de evaporação. Alguns produtos tendem a expandir, outros colapsam, fraturam ou se desintegram, levando a formação de partículas porosas de formato irregular. Outros permanecem com forma esférica constante ou se contraem, formando partículas mais densas. Qualquer mudança no formato da partícula está intimamente relacionada com a taxa de secagem, portanto, o projeto da câmara de secagem define a morfologia das partículas secas produzidas [Masters, 1972].

Separação do produto

A separação do produto do meio de secagem é a última etapa do processo, a qual é ilustrada na Figura 5. Esse estágio deve apresentar dois requisitos importantes, que é uma boa recuperação de sólidos, em uma forma adequada para uso, e exaustão livre de partículas. A separação do produto pode ser feita primeiramente na base da câmara de secagem e depois no equipamento coletor de partículas, que normalmente é o ciclone (Figura 5a); ou todo o produto pode ser recuperado no equipamento coletor (Figura 5b). Essa etapa é influenciada pelas características do produto em virtude do manuseio mecânico envolvido durante o estágio de separação, o qual pode resultar em produtos com alta porcentagem de partículas finas.

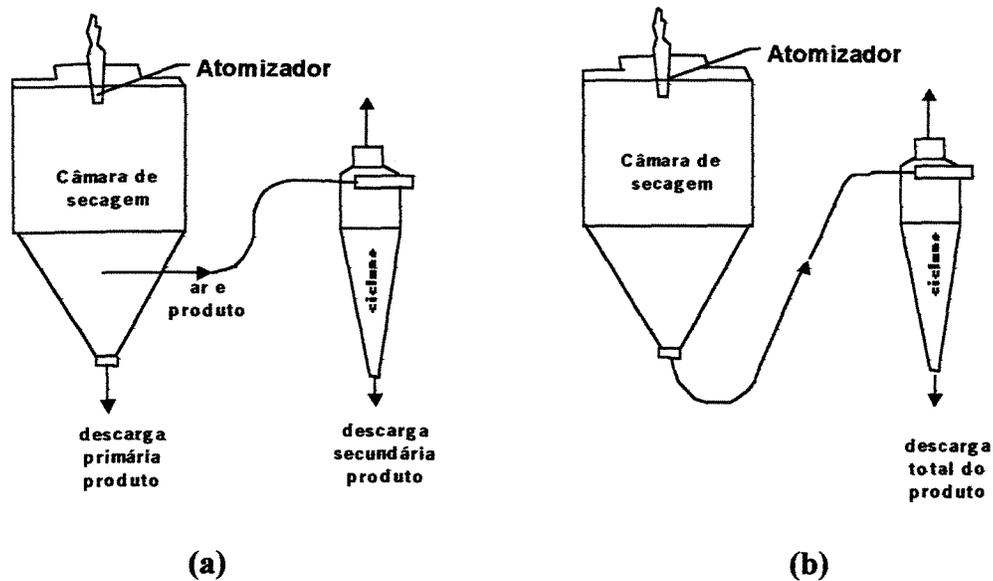


Figura 5: Descarga do produto em secadores por atomização: (a): a principal separação do produto seco ocorre na base da câmara de secagem, (b) a recuperação da fração mais fina do produto seco ocorre no equipamento de separação, normalmente o ciclone (Adaptação de Masters, 1972).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. *Material*

- Fosfatidilcolina natural da soja, purificada, hidrogenada, adquirida da Lucas Meyer: Epikuron 200SH;
- Colesterol adquirido da Sigma Chemical Co.;
- Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico P.A. adquiridos da Merck;
- Álcool etílico, cloreto de sódio P.A. e manitol adquiridos da Synth;
- Molibdato de amônio adquirido da Ecibra;
- Ácido sulfúrico P.A. adquirido da Erich Ltda.;
- Água bidestilada e deionizada em sistema milli-Q.

3.2.2. *Métodos*

3.2.2.1. Cálculo da massa molar do fosfolípido Epikuron 200SH

O fosfolípido natural da soja Epikuron 200SH é uma fosfatidilcolina purificada, hidrogenada, em forma de pó. A sua composição é de no mínimo 95% de fosfatidilcolina, e de no máximo 1% de lisofosfatidilcolina, 2,5% de outros fosfolípidos, 0,5% de mistura e 1% de óleos. A cadeia acila dos fosfolípidos é formada por 10-15% de ácido palmítico, com 16 átomos de carbono, e 85-90% de ácido esteárico, com 18 átomos de carbono. Com isso, para a obtenção do valor aproximado da massa molar deste lipídio, usada nos cálculos para a preparação das soluções, foi considerado que o Epikuron 200SH era formado por 90% de DSPC e 10% de DPPC, visto que os outros componentes não foram especificados nos dados técnicos do fosfolípido. Assim, a massa molar do Epikuron 200SH (MM_{Epk}) usada nos cálculos foi:

$$MM_{Epk} = (0,9 * MM_{DSPC}) + (0,10 * MM_{DPPC}) = (0,90 * 790,2) + (0,10 * 734,0) = 784,58 \text{ gramas}$$

3.2.2.2. Produção de partículas através da secagem por atomização

As partículas foram preparadas através de secagem por atomização em equipamento de bancada (Lab-Plant, Laboratory Instruments & Equipment, “spray drier” modelo SD-04), com fluxo co-corrente entre a solução de alimentação e o ar de secagem e atomizador do tipo duplo fluido. A vazão de ar era mantida constante a $122\text{m}^3/\text{h}$ (conforme especificação do equipamento). A solução de alimentação era composta de 250mL de álcool etílico como solvente, o lipídio Epikuron 200SH e manitol em concentrações pré-determinadas.

3.2.2.3. Planejamento Estatístico de Experimentos

Foi realizado um planejamento estatístico de experimentos com a finalidade de estudar a produção mássica das partículas sólidas em função das variáveis operacionais do processo de secagem. Como variável resposta foi usado o rendimento mássico do processo em relação ao fosfolipídio Epikuron 200SH.

Inicialmente, para a avaliação das variáveis estatisticamente significativas, foi feito um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com três pontos centrais para o cálculo do erro, o qual requer o total de 11 experimentos. Para o planejamento fatorial completo são calculados os efeitos das variáveis, mas, no caso do planejamento fatorial fracionário, são calculados os contrastes (I_j). Os valores dos contrastes são obtidos apenas com metade dos experimentos necessários para o fatorial completo, reduzindo, desta forma, tempo e custo no laboratório. As variáveis investigadas foram: a concentração de lipídio na solução de alimentação (C_{Epk}), a vazão da solução de alimentação (V), a temperatura de entrada do ar de secagem (T) e a presença de manitol na solução de alimentação (M). Os níveis escolhidos para as variáveis operacionais, determinados a partir dos limites de operação do equipamento, são apresentados na Tabela 1, e as combinações usadas para cada experimento são listadas na Tabela 2.

Tabela 1: Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com os seus respectivos níveis.

Variável	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Concentração de lipídio na solução de alimentação, C_{Epk} (mM)	15	30	45
Vazão da solução de alimentação, V (mL/min)	3	14	30
Temperatura de entrada do ar de secagem, T (°C)	90	100	110
Concentração molar de manitol, M (%)	0	15	30

Tabela 2: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com três pontos centrais para o cálculo do erro.

Ensaio	Variáveis			
	C	V	T	M
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

A geratriz do planejamento fatorial fracionário é dada por $I=+1234$, o que significa que os níveis da coluna 4 da Tabela 2, correspondente à quarta variável operacional, M, são calculados pela multiplicação das colunas 1, 2 e 3, relacionadas respectivamente às variáveis operacionais C_{Ep_k} , V e T. O emprego da meia-fração confunde os efeitos principais com as interações de terceira ordem. Por exemplo, o contraste calculado para a variável concentração de lipídio da solução de alimentação (l_{Cepk}) é na verdade a soma do efeito principal C_{Ep_k} com o efeito de interação VTM, já que a geratriz é positiva. Isto não é problemático pois, normalmente, os efeitos de terceira ordem não são significativos, sendo os contrastes calculados boas estimativas dos valores reais dos efeitos [Barros Neto et al., 1996].

Em uma segunda etapa, foram planejados mais cinco experimentos (ensaios 12 a 16), determinados a partir da trajetória de máxima inclinação da equação que descreve o modelo linear baseado nos resultados do planejamento fatorial fracionário, apresentados na Tabela 3. As variáveis operacionais temperatura de entrada do ar (T) e concentração molar de manitol (M) foram fixadas em 90°C e 30%, respectivamente.

Tabela 3: Experimentos planejados a partir da trajetória de máxima inclinação do modelo linear obtido do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Ensaio	C_{Ep_k} (mM)	V (mL/min)
12	45	20
13	60	23
14	75	26
15	90	30
16	105	33

A partir dos resultados obtidos foi feito um planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais para o cálculo do erro. O ponto central utilizado foi o de maior rendimento dentre os experimentos da Tabela 3. As variáveis analisadas foram a concentração de lipídio (C_{Ep_k}) e a vazão da solução de alimentação (V). As variáveis temperatura de entrada do ar (T) e concentração molar de manitol (M) foram fixadas em 90°C e 30%, respectivamente.

O planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais para o cálculo do erro é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais para o cálculo do erro.

Ensaio	C_{Epk} (mM)	V (mL/min)
17	85	25,5
18	95	25,5
19	85	34,5
20	95	34,5
21	90	30
22	90	30
15	90	30

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^2 , foram planejados mais quatro experimentos, que foram feitos em duplicata, para a obtenção da produção mássica máxima. Nestes experimentos o único parâmetro analisado foi a vazão da solução de alimentação, uma vez que na região de alta concentração de lipídios (85, 90 e 95mM), não houve mudanças significativas no rendimento mássico do processo. Por medida de economia, a concentração usada nos ensaios posteriores foi fixada em 85mM. A vazão da solução de alimentação (V) foi usada nos níveis: 8mL/min (ensaios 23 e 24), 14mL/min (ensaios 26 e 38), 20mL/min (ensaios 27 e 28), e 25,5mL/min (ensaios 17 e 29).

Os experimentos foram feitos em ordem aleatória e todos os cálculos dos efeitos estatísticos e do erro, assim como a estimativa do modelo e as superfícies de resposta, foram feitos através do programa computacional “Statistica 5.0”.

3.2.2.4. Influência do diâmetro do atomizador e temperatura da solução de alimentação

Nestes experimentos, a dispersão era atomizada na câmara de secagem a uma temperatura de entrada do ar de $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ (T), vazão de 20mL/min (V), concentração de lipídios de 85mM (C_{epk}) e concentração de manitol de 36mM (C_{man}). A temperatura da solução de alimentação (T_s) foi usada em 25 ou 60°C (experimentos 31 e 36, respectivamente). Para os experimentos de avaliação da influência do diâmetro do bico do atomizador (D_{atom}), a temperatura da solução de alimentação foi mantida em 60°C , para se evitar entupimentos. Os diâmetros usados foram de 0,5; 0,7 ou 1mm (experimentos 34, 33 e 36, respectivamente).

3.2.2.5. Influência da concentração de manitol

Inicialmente foram feitos experimentos para a avaliação da influência da presença do manitol na cristalinidade das partículas, sob as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada do ar $90\pm 5^{\circ}\text{C}$, concentração de lipídios 20mM, vazão da solução de alimentação 3mL/min, e concentração de manitol 0 ou 13mM (experimentos M0 e M1, respectivamente). Adicionalmente foi verificada a capacidade de incorporação de manitol pelas partículas, na mesma temperatura de entrada do ar, vazão de 20mL/min (V), concentração de lipídios de 85mM (C_{epk}). As concentrações de manitol foram de 0, 36, 170 ou 295mM (experimentos 46, 31, 43 e 44, com relação mássica lipídio/manitol de 100/0, 91/9, 68/32 e 55/45, respectivamente). Um experimento com o manitol puro a 200mM também foi feito sob as mesmas condições operacionais descritas anteriormente (experimento 47). A incorporação foi caracterizada através da cristalinidade (item 3.2.2.8.6), morfologia (item 3.2.2.8.7) e transição de fases (item 3.2.2.8.8) das partículas.

3.2.2.6. Incorporação do Colesterol

Esses experimentos foram feitos sob as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada do ar de $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ (T) e vazão de 20mL/min (V), a uma concentração de lipídios de 85mM (C_{epk}) e concentração de manitol de 36mM (C_{man}). A concentração de colesterol foi de 17 ou 25,5mM (experimentos 41 e 42, com relação mássica

lipídio/manitol/colesterol de 84/8/8 e 80/8/12, respectivamente). A incorporação foi caracterizada através da cristalinidade (item 3.2.2.8.6) e morfologia (item 3.2.2.8.7) das partículas.

3.2.2.7. Caracterização do Processo

3.2.2.7.1. *Rendimento*

O rendimento mássico do processo, (R), foi calculado através da Equação (1), na qual L_f é a massa final de lipídio, quantificada pelo método descrito por Chen et al. [1956] (item 3.2.2.8.1), e L_0 é a massa inicial pesada para a preparação da solução de alimentação:

$$R = \left(\frac{L_f}{L_0} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.2.7.2. *Eficiência do ciclone*

A eficiência do ciclone é uma variável importante para a avaliação da eficiência global do processo de secagem por atomização. Para o seu cálculo foi usado o método proposto por Massarani [1997], o qual será descrito a seguir.

Primeiramente, deve-se classificar o ciclone usado de acordo com a sua configuração. Cabe ressaltar que a configuração do ciclone caracteriza-se por uma relação específica entre suas dimensões, normalmente expressa em termos do diâmetro da parte cilíndrica do equipamento, D_c . Baseado neste critério, o ciclone usado nos experimentos foi classificado como do tipo Lapple, com um diâmetro (D_c) de 7,5cm. A configuração do ciclone Lapple é especificada na Figura 6.

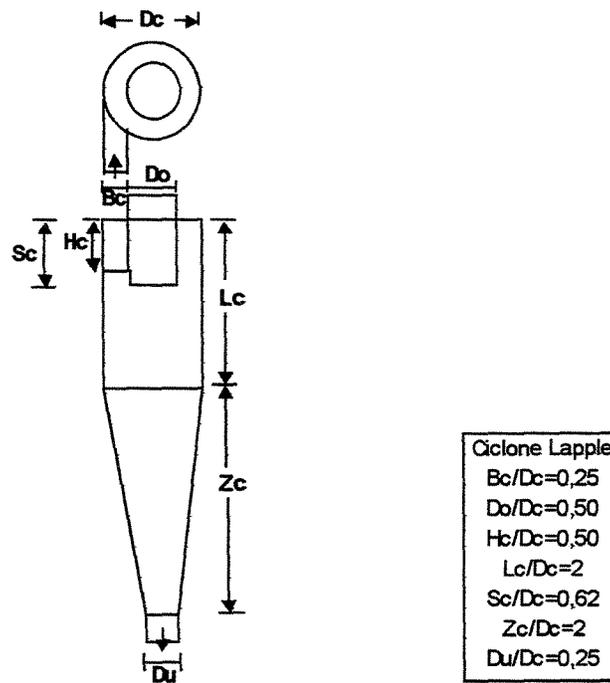


Figura 6: Configuração do ciclone Lapple [Massarani, 1997].

O método proposto determina o diâmetro de corte do ciclone (D_{corte}) através da equação (2):

$$D_{\text{corte}} = \left(\frac{9\mu B_c}{10\pi u(\rho_s - \rho)} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: μ é a viscosidade absoluta do ar, B_c é uma das dimensões do ciclone ($B_c=0,25D_c$), u é a velocidade do ar, ρ_s é a densidade da partícula e ρ é a densidade do ar. Assim, para uma vazão de ar de $3,4 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{s}$, tem-se que a velocidade do ar é 28m/s, e o diâmetro de corte do ciclone é $2,43 \mu\text{m}$. Salienta-se que este nível de velocidade encontra-se próximo ao limite de velocidade geralmente usado em ciclones do tipo Lapple ($5 < u < 20 \text{ m/s}$).

A partir do diâmetro de corte, a eficiência do ciclone pode ser calculada através da equação (3):

$$E_{\text{cic}} = \left\{ \left[\frac{(1,11 * n)/(0,118 + n)}{1,81 - (0,322 * n) + (D' / D_{\text{corte}})} \right] \right\} * (D / D_{\text{corte}}) \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde n e D' são os parâmetros do modelo de distribuição de tamanhos de partículas do tipo Rosin-Rammler-Bennet (RRB):

$$X = 1 - [\exp - (D/D')^n] \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde: X é a fração em massa das partículas com diâmetro menor que D, D' é o diâmetro de partícula que corresponde a X=0,632 e n é a dispersão.

3.2.2.8. Caracterização das partículas

3.2.2.8.1. Concentração total de fosfolipídio

As partículas secas foram caracterizadas quanto à concentração total de lipídios através do ensaio fosfato, método descrito por Chen et al. [1956]. Este método consiste na oxidação com ácido sulfúrico dos compostos de carbono a carbono elementar, que é então transformado em dióxido de carbono pelo peróxido de hidrogênio livre de fosfato. O fósforo é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com o molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra. O mesmo procedimento é feito para as soluções padrões, com concentrações conhecidas de fosfato, e para a solução isenta de fosfato (branco). Como exemplo é apresentado no Anexo I uma curva de calibração obtida através deste método.

3.2.2.8.2. Diâmetro geométrico e distribuição de tamanhos

As medidas de diâmetro de área projetada, que aqui será referido como diâmetro geométrico, e distribuição de tamanhos das partículas sólidas produzidas foram feitas através de contagem de tamanho de partículas pelo microscópio ótico Olympus, modelo BX60, acoplado a um sistema de aquisição de imagens e utilização de software computacional Image Pro-Plus.

3.2.2.8.3. Diâmetro aerodinâmico

O diâmetro aerodinâmico das partículas sólidas foi obtido através de medidas no equipamento "Aerodynamic Particle Sizer", da TSI, modelo 3320. Também foi obtida através deste método a distribuição de tamanhos das partículas. Uma observação a ser feita com relação a este equipamento é que ele só mede partículas acima de 0,5µm, portanto a primeira população da distribuição de tamanhos refere-se às partículas com diâmetro menor que este, as quais são todas colocadas em um mesmo nível de tamanho.

3.2.2.8.4. Densidade

As densidades das partículas sólidas foram obtidas no picnômetro a Hélio Accupyc 1330, da Micromeritics.

3.2.2.8.5. Atividade da água

A atividade da água foi determinada através da umidade relativa do ar em contato com a amostra quando atingido o equilíbrio. No equilíbrio a energia da água no vapor (μ_{vapor}) é igual a energia da água na amostra (μ_{amostra}). Assim:

$$\mu_{\text{amostra}} = \mu_{\text{vapor}} \Rightarrow RT \ln(A_{\text{H}_2\text{O}}) = RT \ln\left(\frac{p}{p^0}\right)$$

$$A_{\text{H}_2\text{O}} = p/p^0 = (\text{URE}\%)/100$$

Onde: $A_{\text{H}_2\text{O}}$ é a atividade da água, p é a pressão parcial de vapor da água no substrato, p^0 é a pressão parcial de vapor a mesma temperatura e pressão, e URE% é a umidade relativa de equilíbrio [Smith e Van Ness, 1980].

A amostra foi colocada em um recipiente fechado, e as medidas foram realizadas em um equipamento da Aqualab, modelo 3TE, da Decagon Devices, Inc..

3.2.2.8.6. Cristalinidade

As partículas sólidas produzidas foram caracterizadas quanto ao grau de cristalinidade através da técnica de difração de raios-X. O equipamento utilizado foi fabricado pela Philips, modelo XPERT. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, a fonte de raios-X era de cobre (Cu). A varredura foi feita a 2° por minuto, entre 35 e 10° (2 θ). Os espectros obtidos relacionam a intensidade de difração com o ângulo de varredura. A cristalinidade das amostras relaciona-se diretamente com a altura e a largura dos picos de difração, sendo quanto maior a altura (intensidade) e menor a largura, maior é o grau de cristalinidade das amostras.

3.2.2.8.7. Morfologia

As partículas sólidas foram caracterizadas quanto à sua morfologia através de microscopia eletrônica de varredura. O equipamento utilizado foi produzido pela Leica, modelo LEO 440i. Inicialmente, amostras das partículas secas foram fixadas em um porta-

amostra através de fita adesiva de dupla-face. As amostras eram então recobertas com ouro e posteriormente analisadas.

3.2.2.8.8. *Transição de fases*

As temperaturas e energias de transição de fases das estruturas sólidas foram determinada através de calorimetria diferencial de varredura (DSC), usando um calorímetro da TA Instrumentos, modelo Universal V2.3C. Poucos miligramas da amostra eram hermeticamente fechados em um cadinho de alumínio, e as medidas foram feitas sob atmosfera de argônio entre -80 e 120°C , a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. *Influência das variáveis operacionais sobre o rendimento mássico da secagem*

O propósito do planejamento fatorial fracionário inicial foi investigar o efeito das variáveis operacionais do processo de secagem sobre o rendimento mássico do processo de produção das partículas. No planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} o emprego da meia-fração confunde os efeitos principais com as interações de terceira ordem, o que não é problemático, pois, normalmente, os efeitos de terceira ordem não são significativos, sendo os contrastes calculados boas estimativas dos valores reais dos efeitos [Barros Neto et al., 1996]. A análise dos resultados foi feita a partir dos efeitos principais e das interações de segunda ordem entre as variáveis.

Os rendimentos mássicos do processo de produção das partículas, obtidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , são apresentados na Tabela 5. A Tabela 6 apresenta os valores da média e dos contrastes, estimados para a resposta rendimento mássico do processo. Os parâmetros assinalados com um asterisco são os significativos a um nível de confiança de 95%, os quais também podem ser visualizados na Figura 7, através do Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. Neste nível de confiança tem-se que $p=0,05$, assim são significativos os efeitos e interações que apresentarem valores absolutos à direita da reta onde $p=0,05$, e não significativos os efeitos e interações que apresentarem valores absolutos à esquerda desta reta.

Tabela 5: Rendimentos mássicos do processo de produção das partículas através da secagem por atomização (R) para o planeamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Ensaio	R (%)
1	7,1
2	15,1
3	11,0
4	14,9
5	5,4
6	14,7
7	8,6
8	14,2
9	13,6
10	14,2
11	14,6

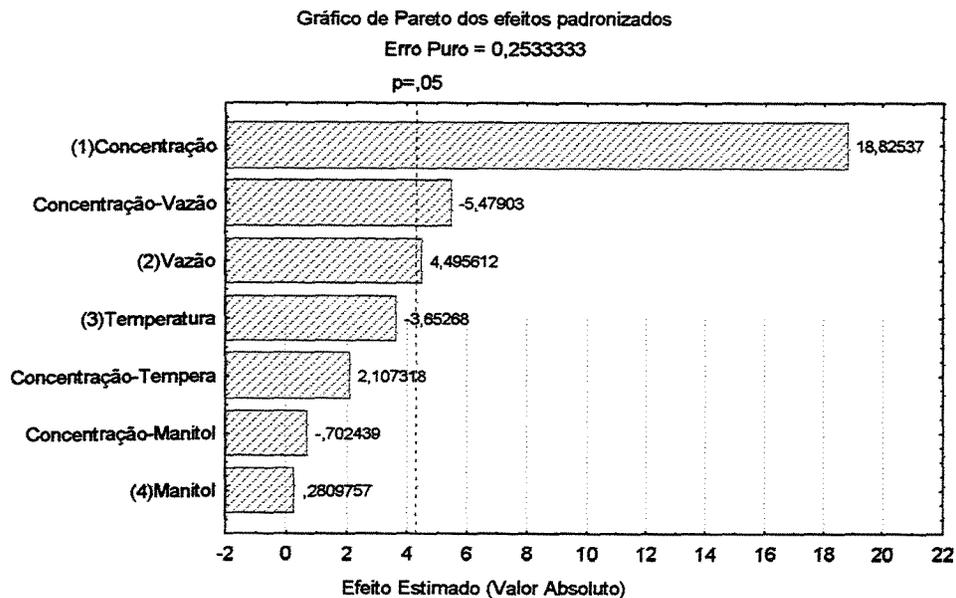


Figura 7: Gráfico de Pareto com o valor estimado dos contrastes para as variáveis e para as interações de segunda ordem entre as variáveis ao nível de 95% de confiança; $p=0,05$.

Tabela 6: Valores da média, dos contrastes e das interações de segunda ordem, estimados para a resposta rendimento mássico do processo de produção das partículas para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média	12,1273*	0,1518*	79,9122*	0,0002*
C_{Epk}	6,7000*	0,3559*	18,8254*	0,0028*
V	1,6000*	0,3559*	4,4956*	0,0461*
T	-1,3000	0,3559	-3,6527	0,0675
M	0,1000	0,3559	0,2810	0,8051
$C_{Epk}V$	-1,9500*	0,3559*	-5,4790*	0,0317*
$C_{Epk}T$	0,7500	0,3559	2,1073	0,1697
$C_{Epk}M$	-0,2500	0,3559	-0,7024	0,5551

*significativos a um nível de confiança de 95%

“t(2)” and “p” são parâmetros estatísticos da distribuição de probabilidade t com dois graus de liberdade.

$R^2=0,8623$; Erro puro= $0,2533$

Os resultados mostram claramente que as variáveis significativas são a concentração de lipídios na solução de alimentação (C_{Epk}), a vazão da solução de alimentação (V), assim como a interação entre essas duas variáveis ($C_{Epk}V$). A Tabela 7 apresenta a análise de variância do processo, e a equação (5) o modelo linear proposto para a faixa de processo estudada.

Tabela 7: Análise de variância da resposta rendimento mássico da secagem por atomização para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{CALC}	$F_{TAB(0,95;3;7)}$
Regressão	107,15	3	35,72	14,6	4,35
Resíduos	17,11	7	2,44		
Falta de ajuste	16,60	5	3,32		
Erro puro	0,51	2	0,26		
Total	124,26	10			

$$R^2 = 0,8623$$

$$F_{CALC} / F_{TAB} = 3,4$$

$$R = 12,1273 + 3,3500C_{EpK} + 0,8000V - 0,9750C_{EpK} V \quad (\text{Eq. 5})$$

Para um modelo estatístico ser válido ele não pode apresentar falta de ajuste. Os critérios usados para analisar a validade de um modelo são listados a seguir:

- (i) a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro, obtida através da tabela de análise de variância, deve ser menor que o respectivo valor tabelado ao nível de 95% de confiança e os respectivos graus de liberdade para a falta de ajuste e o erro puro [Barros Neto et al., 1996];
- (ii) o coeficiente de determinação (R^2) deve ser alto (máximo 1);
- (iii) a razão entre o F_{calc} e o F_{tab} deve ser maior que 4.

Aplicando os critérios de validade ao modelo proposto observa-se que: (i) o valor tabelado, 19,3, é maior que o valor calculado, 12,8; (ii) o valor do coeficiente de

determinação, 0,8623, é razoavelmente alto; (iii) a relação entre o F_{calc} e o F_{tab} é 3,4, valor menor que 4, mas dada a natureza do processo envolvido, o valor é aceitável. Assim, levando em consideração os critérios de validação do modelo, pode-se concluir que este se ajusta aos dados na faixa estudada.

A Figura 8 mostra a superfície de resposta para o rendimento mássico do processo de produção das partículas (R) em função da concentração de lipídios na solução de alimentação (C_{Epk}) e da vazão da solução de alimentação (V). Pode-se observar que o rendimento pode ser aumentado pelo aumento de ambas variáveis do processo, a concentração de lipídios e a vazão da solução de alimentação. A inclinação máxima do modelo proposto, 0,24, calculada através da razão entre o terceiro e o segundo coeficientes da equação (5), indica que para cada unidade avançada no eixo correspondente à variável operacional concentração de lipídios na solução de alimentação (C_{Epk}) deve-se avançar 0,24 unidades ao longo do eixo correspondente à variável operacional vazão da solução de alimentação (V). Este critério gerou os experimentos planejados da Tabela 3, e a Tabela 8 apresenta os rendimentos mássicos obtidos nesses ensaios.

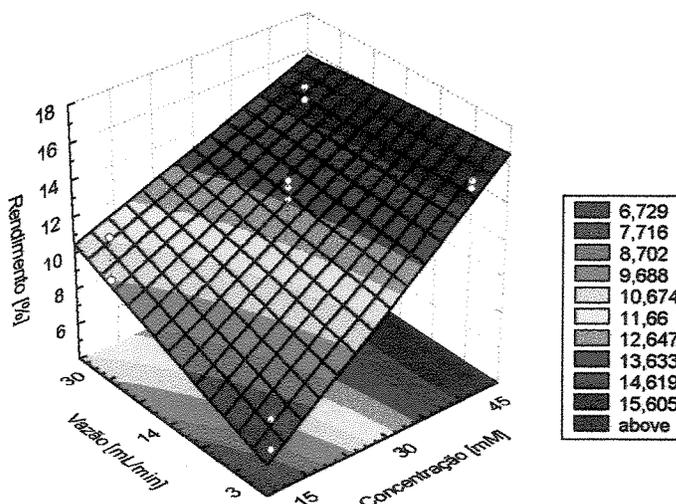


Figura 8: Superfície de resposta para o rendimento mássico do processo de produção das partículas através de secagem por atomização (R) em função da concentração de lipídios na solução de alimentação (C_{Epk}) e da vazão da solução de alimentação (V).

Tabela 8: Rendimentos mássicos (R) obtidos para os experimentos da Tabela 3.

Ensaio	R (%)
12	11,4
13	10,4
14	14,5
15	16,9
16	12,5

A partir dos resultados apresentados na Tabela 8 pode-se observar que inicialmente o rendimento aumenta, mas, após o 15^o ensaio, há uma tendência para a diminuição no rendimento. O máximo rendimento obtido foi 16,9%, o qual é 12% maior que o melhor rendimento obtido no planejamento fatorial fracionário.

A Tabela 9 apresenta os rendimentos mássicos do processo de produção das partículas para o planejamento fatorial 2². A Tabela 10 apresenta os valores da média, dos efeitos das variáveis e da interação entre elas, os parâmetros assinalados com um asterisco são os estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%. A Figura 9 apresenta o Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, sendo significativos os efeitos localizados à direita da reta onde $p=0,05$.

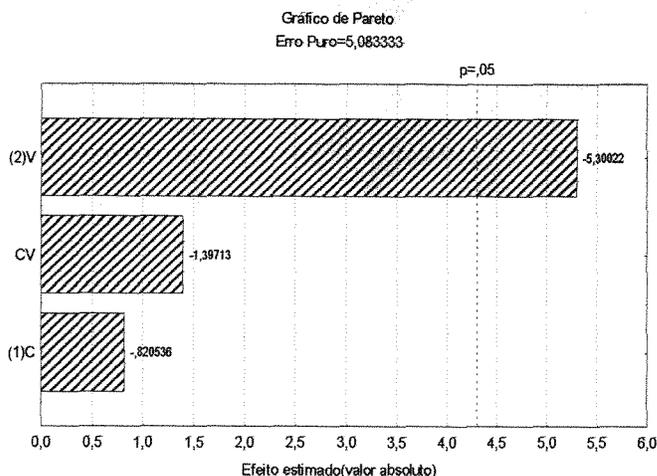
**Figura 9:** Gráfico de Pareto com o valor estimado dos efeitos das variáveis e para a interação de segunda ordem entre as variáveis ao nível de 95% de confiança; $p=0,05$.

Tabela 9: Rendimentos mássicos do processo de produção das partículas secas (R) para o planejamento fatorial fracionário 2^2 .

Ensaio	R (%)
17	23,6
18	24,9
19	14,8
20	9,8
21	14,4
22	18,9
15	16,9

Tabela 10: Valores da média, dos efeitos e da interação de segunda ordem, estimados para a resposta rendimento mássico do processo de produção das partículas para o planejamento fatorial fracionário 2^2 .

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média	17,6143*	0,8521*	20,6700*	0,0023*
C_{Epk}	-1,8500	2,2546	-0,8205	0,4981
V	-11,9500*	2,2546*	-5,3002*	0,0338*
$C_{Epk}V$	-3,1500	2,2546	-1,3971	0,2972

*significativos a um nível de confiança de 95%

“t(2)” and “p” são parâmetros estatísticos da distribuição de probabilidade t com dois graus de liberdade.

$R^2=0,9164$; Erro puro= $5,0833$

Como resultado, a única variável operacional estatisticamente significativa nesta faixa de processo é a vazão da solução de alimentação. A Tabela 11 apresenta a análise de variância do processo, e o modelo linear proposto para a faixa estudada é apresentado na Equação (6).

Tabela 11: Análise de variância da resposta rendimento mássico para o planejamento fatorial fracionário 2^2 .

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{CALC}	$F_{TAB(0,95;1;5)}$
Regressão	156,15	1	156,15	54,8	6,61
Resíduos	14,24	5	2,85		
Falta de ajuste	4,07	3	1,36		
Erro puro	10,17	2	5,08		
Total	170,39	6			

$$R^2=0,9164$$

$$F_{CALC}/F_{TAB}=8,3$$

$$R = 17,6143 - 5,9800V$$

(Eq. 6)

De acordo com os critérios de validação do modelo proposto, pode-se verificar que o modelo se ajusta aos dados na faixa de processo estudada. A Figura 10 apresenta a superfície de resposta para o rendimento mássico do processo de produção das partículas secas (R) em função da concentração de lipídios (C_{Epk}) e da vazão da solução de alimentação (V). De acordo com a figura, o rendimento pode ser aumentado diminuindo a vazão da solução de alimentação. Analisando os resultados de ambos planejamentos fatoriais, pode-se concluir que a máxima produção mássica das partículas secas deve ser obtida a uma vazão abaixo de 25,5mL/min.

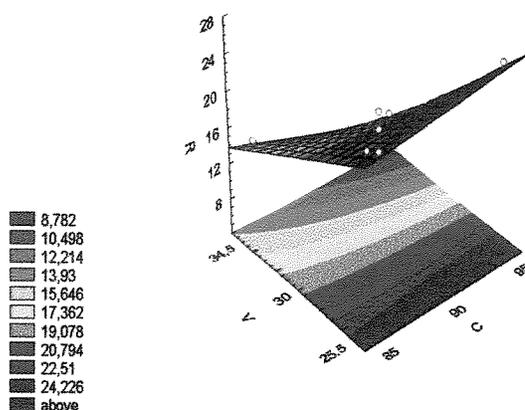


Figura 10: Superfície de resposta para o rendimento mássico do processo de produção das partículas através de secagem por atomização (R) em função da concentração de lipídios na solução de alimentação (C) e da vazão da solução de alimentação (V).

Finalmente, através da Figura 11, pode-se observar que o rendimento mássico de produção das partículas secas aumentou em função da vazão da solução de alimentação, atingindo um máximo na região de 20mL/min. A análise de variância do processo é apresentada na Tabela 12, a qual valida o modelo proposto pela equação (7). A vazão correspondente ao máximo rendimento mássico, 20mL/min, pode ser obtida igualando-se a zero a derivada dR/dV , na equação (7).

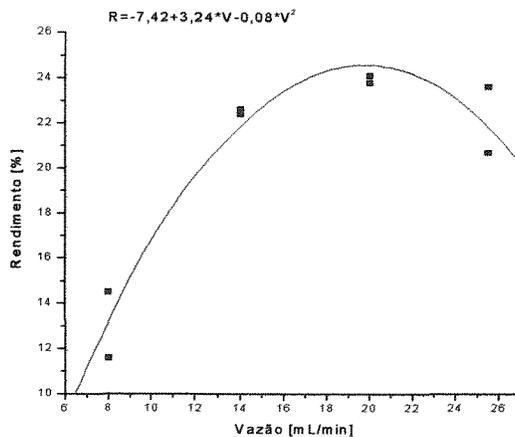


Figura 11: Rendimento mássico do processo de produção das partículas (R) em função da vazão da solução de alimentação (V) a uma concentração de lipídios de 85mM.

Tabela 12: Análise de variância da resposta rendimento mássico do processo de secagem por atomização.

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F_{CALC}	F_{TAB(0,95;2;5)}
Regressão	145,10	2	72,55	35,6	5,79
Resíduos	10,19	5	2,04		
Falta de ajuste	1,70	1	1,70		
Erro puro	8,49	4	2,12		
Total	155,29	7			

$$R^2=0,9321$$

$$F_{CALC}/F_{TAB}=6.1$$

$$R = -7,42 + 3,24V - 0,08V^2 \quad (\text{Eq. 7})$$

Tendo em vista que a utilização de equipamentos em maior escala envolve diferentes configurações, uma otimização do processo deve ser feita a partir dos resultados obtidos em escala de laboratório.

3.3.2. Eficiência do ciclone

O rendimento mássico do processo e a eficiência do ciclone em função do diâmetro aerodinâmico das partículas secas são apresentados na Tabela 13, bem como os valores dos parâmetros do modelo de distribuição de tamanhos do tipo RRB, D' e n .

Tabela 13: Rendimento mássico do processo de secagem por atomização (R), eficiência do ciclone (E_{cic}), e os parâmetros do modelo de distribuição de tamanhos do tipo RRB, D' e n , obtidos para diferentes amostras, em função do diâmetro aerodinâmico (D_{aer})

Ensaio	D_{aer} [μm]	D'	n	E_{cic} [%]	R [%]
2	1,25	1,029	1,611	25	15
31	1,42	1,217	1,629	29	24
43	1,77	1,612	1,629	35	24
44	1,71	1,609	1,810	37	31

A eficiência do ciclone variou de aproximadamente 25 a 40% e, de uma maneira geral, ela aumentou com o aumento do diâmetro das partículas, como já era esperado. Comparando-se os resultados de eficiência do ciclone e de rendimento mássico, pode-se observar que a principal perda do processo ocorre no ciclone, na etapa de separação do produto. Perdas adicionais incluem aderência de massa à parede da câmara de secagem e na tubulação de alimentação da solução de alimentação. Desses resultados conclui-se que esse tipo de ciclone não é adequado para a coleta de partículas finas tais como as produzidas pela secagem de lípidios e também que o rendimento está diretamente relacionado com o diâmetro das partículas.

3.3.3. Caracterização das partículas

3.3.3.1. Propriedades Estruturais

3.3.3.1.1. Cristalinidade das partículas secas

A cristalinidade das partículas secas é função da umidade e do arranjo estrutural dos sólidos. A Figura 12 apresenta os difratogramas de raios-X dos componentes estruturais das partículas secas, ou seja, do fosfolípido Epikuron 200SH e do açúcar manitol. Um pico principal aproximadamente em 20° caracteriza a presença das fosfatidilcolinas, tais como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e distearoilfosfatidilcolina (DSPC – “distearoyl-

phosphatidylcholine”), na composição do lipídio comercial (Figura 12(a)). Kikuchi et al. [1991] obtiveram espectros semelhantes para misturas de DPPC. Sabe-se da literatura da existência de vários polimorfos do manitol, cada qual com propriedades físico-químicas distintas. De acordo com o difratograma de raios-X apresentado na Figura 12(b), o manitol usado nos experimentos é o classificado como forma β ou mod. I [Burger et al., 2000].

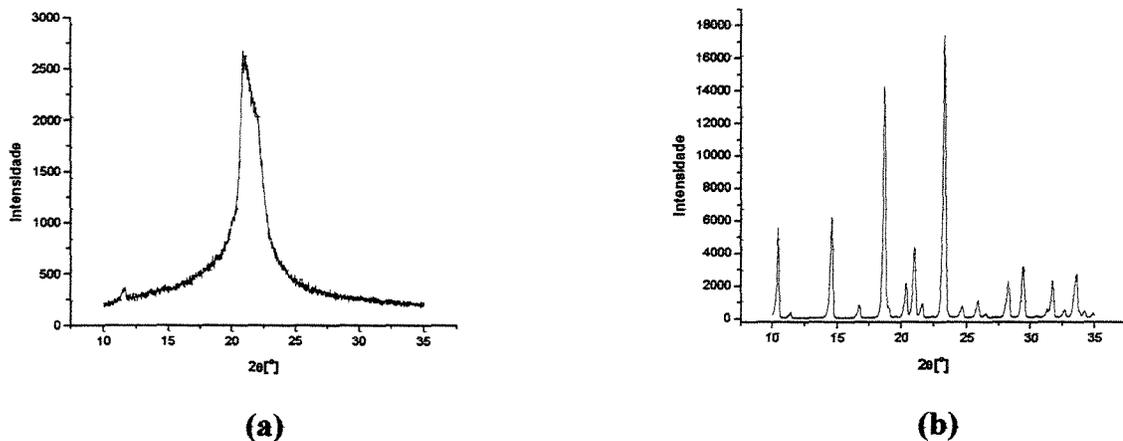


Figura 12: Difratograma de raios-X do (a) Epikuron 200SH, (b) manitol.

Efeito da concentração de lipídios e da vazão da solução de alimentação

Os difratogramas de raios-X apresentados na Figura 13 relacionam o efeito da concentração de lipídios e da vazão da solução de alimentação com a cristalinidade das partículas secas produzidas através da técnica de “spray-drying”. Duas informações importantes podem ser obtidas através desses espectros. Primeiro, a presença de somente um pico principal na região dos fosfolipídios, aproximadamente em 20°, indica a total incorporação do manitol nas estruturas sólidas, nesta faixa de concentração e vazão estudada. Em segundo lugar, a concentração de lipídios e a vazão da solução de alimentação influenciaram a cristalinidade das partículas. Estruturas mais amorfas foram obtidas nos níveis mais baixos de concentração e vazão. A cristalinidade das partículas aumentou com o aumento da vazão de 3 para 20mL/min, enquanto a concentração era 45 e 85mM, respectivamente. Um pequeno decréscimo na cristalinidade pode ser observado para maiores concentrações e vazões.

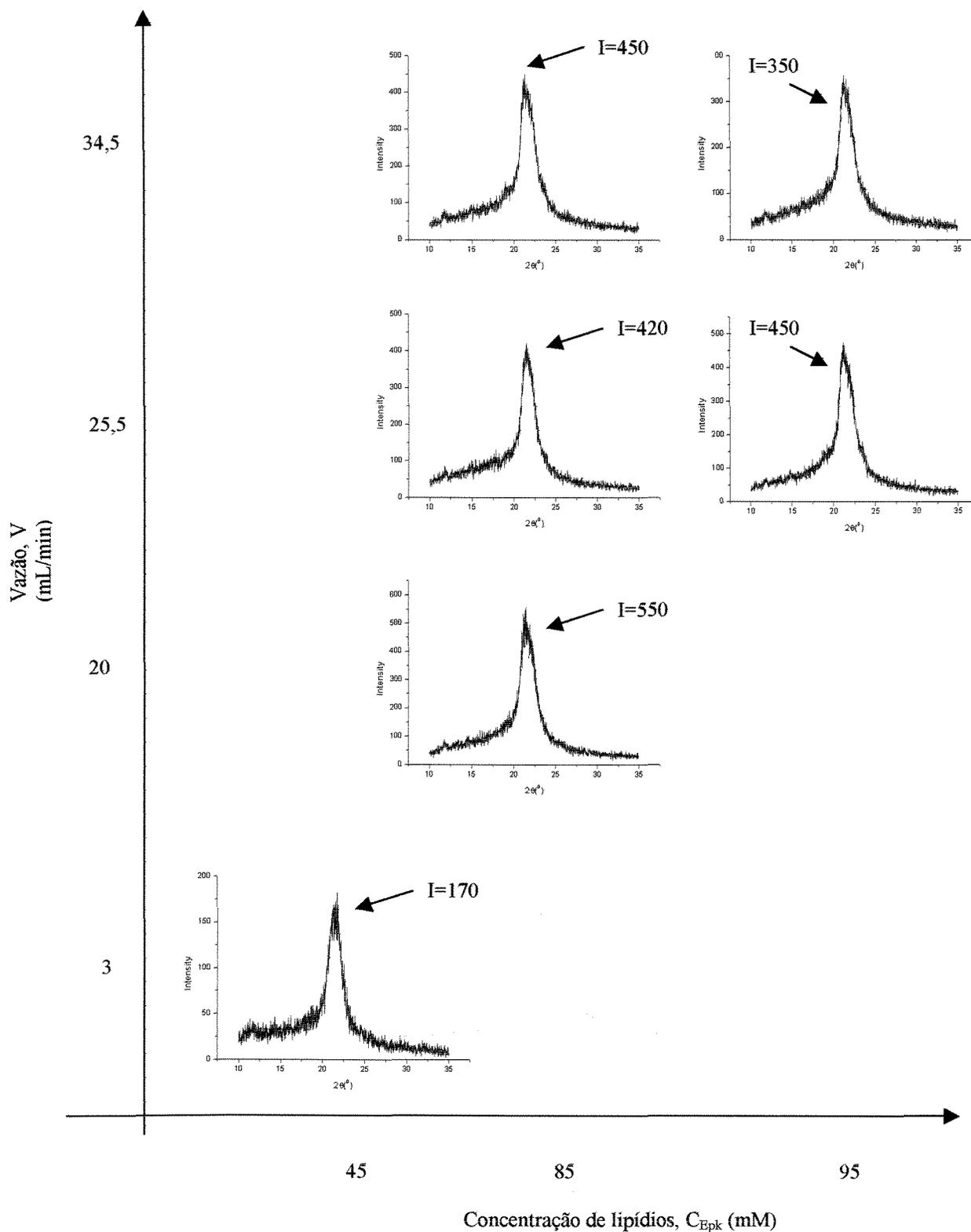


Figura 13: Efeito da concentração de lipídios e da vazão da solução de alimentação sobre a cristalinidade das partículas secas. Temperatura de entrada do ar: 90°C; concentração de manitol: 30% molar. (I é a intensidade de difração).

Estes efeitos sobre a cristalinidade são consequência de alguns fatores relacionados ao processo de secagem, tais como as propriedades da atomização, tempo de residência das gotículas na câmara de secagem e viscosidade da solução de alimentação. Influência semelhante destes fatores foi previamente observada por Masters [1972] sobre a distribuição de tamanhos, densidade, aparência e conteúdo de umidade dos sólidos.

Efeito da temperatura da solução de alimentação e do diâmetro do bico do atomizador

O efeito da temperatura da solução de alimentação sobre a cristalinidade das partículas secas é apresentado na Figura 14. Estruturas mais cristalinas foram obtidas quando a temperatura da solução de alimentação aumentou de 25 para 60°C. Este efeito é provavelmente decorrente da redução da viscosidade da solução de alimentação, resultando em uma melhor eficiência de secagem, com uma maior recuperação de sólidos, 40% maior a 60°C, e em um melhor empacotamento dos componentes na estrutura sólida. O aumento do diâmetro do bico do atomizador produziu estruturas mais cristalinas, como apresentado na Figura 15.

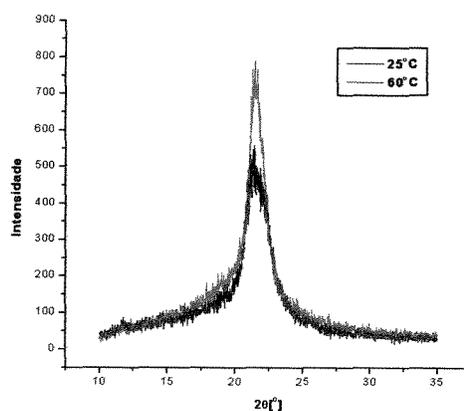


Figura 14: Efeito da temperatura da solução de alimentação sobre a cristalinidade das partículas secas. Difratogramas de raios-X para temperaturas da solução de alimentação: ___ (preto) 25°C, ___ (vermelho) 60°C. Temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lípidios 85mM; concentração de manitol 36mM; vazão da solução de alimentação 20mL/min.

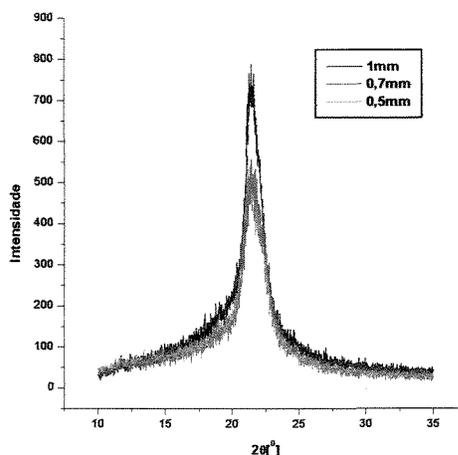


Figura 15: Efeito do diâmetro do bico do atomizador sobre a cristalinidade das partículas secas. Difratogramas de raios-X para diâmetros do bico do atomizador: ___ (preto) 1mm, ___ (vermelho) 0,7mm, ___ (verde) 0,5mm. Temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lipídios 85mM; concentração de manitol 36mM; vazão da solução de alimentação 20mL/min, temperatura da solução de alimentação 60°C.

3.3.3.2. Propriedades físicas

3.3.3.2.1. Atividade da água

Propriedades de sólidos tais como fluidez, compactação, desintegração, dissolução e dureza são influenciadas pela absorção de água pela amostra. A atividade da água está relacionada com a água livre ou disponível no sistema, e determina a estabilidade física e química de sólidos estocados. É um parâmetro importante para estruturas amorfas, pois está relacionado com a preservação da sua microestrutura, visto que a água livre age como um plastificante, reduzindo a temperatura de transição vítrea e induzindo a cristalização dos sólidos amorfos. A atividade da água das estruturas lipídicas preparadas através da técnica de secagem por atomização manteve-se entre 0,3 e 0,4 (30 e 40%). Nenhuma variação expressiva foi observada nas amostras durante 30 dias de estocagem sob refrigeração (variação máxima de 15%). Segundo a literatura, a oxidação de lipídios ocorre principalmente em valores de atividade de água acima de 0,6-0,7, devido a maior mobilidade das moléculas e a maior disponibilidade da água como reagente [<http://trc.ucdavis.Edu/srdungan/fst100a/13water2/13water2.ppt98>].

3.3.3.2.2. Diâmetros geométricos e aerodinâmicos e distribuição de tamanhos

A Tabela 14 apresenta os diâmetros geométricos, aerodinâmicos e a distribuição de tamanhos das partículas secas preparadas através da secagem por atomização.

Tabela 14: Diâmetros geométrico e aerodinâmico e distribuição de tamanhos das partículas produzidas através da secagem por atomização.

Ensaio	Diâmetro geométrico		Diâmetro aerodinâmico	
	Principal [µm]	Distribuição de tamanhos [µm]	Médio [µm]	Distribuição de tamanhos [µm] (frequência) [%]
2	3	0,5-18,5	1,25	< 0,5 (30); 0,5-3 (70)
31	4	0,5-18,5	1,42	< 0,5 (25); 0,5-3,5 (75)
43	1/4*	0,5-19,5	1,77	< 0,5 (20); 0,5-4,5 (80)
44	1/4*	0,5-19,5	1,71	< 0,5 (20); 0,5-4,5 (80)
46	1/4*	0,5-17,5	1,64	< 0,5 (20); 0,5-4 (80)

* Distribuição bimodal

Os diâmetros geométricos (pico principal) mantiveram-se entre 1 e 4µm, em uma distribuição bimodal para a maioria dos experimentos. O diâmetro aerodinâmico (médio) foi aproximadamente 1,5µm, com baixa dispersão em torno da média. Comparando estes resultados pode ser concluído que as partículas secas tem diâmetros na faixa de 1-2µm, e que elas podem formar aglomerados fracos, facilmente dispersáveis. No caso das medidas obtidas através do microscópio ótico (diâmetro geométrico), o método de dispersão das partículas sobre a lâmina de vidro foi mais suave, quando comparado com o método de dispersão usado nas medidas de diâmetro aerodinâmico, onde as partículas são succionadas de um prato giratório e aceleradas através de um Venturi, ocasionando a quebra dos aglomerados. Somando-se a esses resultados os valores de densidade obtidos (ρ), próximos de 1g/cm^3 , tem-se que os diâmetros aerodinâmicos (D_{acr}) e de Stokes (D) são muito próximos, uma vez que a relação entre eles é: $D_{\text{acr}}=D * \rho^{0,5}$.

Adicionalmente, os diâmetros aerodinâmicos das partículas sólidas apresentaram uma distribuição do tipo RRB, e foram menores que $5\mu\text{m}$ para todas as formulações, indicando que a técnica de secagem por atomização é promissora para a produção de partículas úteis para administração pulmonar.

3.3.4. Influência da concentração de manitol

A influência da concentração de manitol e a sua incorporação nas partículas foi analisada através da cristalinidade, da morfologia e da transição de fases das partículas.

3.3.4.1. Cristalinidade

A presença de manitol na dispersão lipídica produz partículas secas mais amorfas, conforme mostrado na Figura 16. De acordo com Kikuchi et al.[1991], quanto mais amorfa a estrutura sólida, mais facilmente ela é hidratada com soluções aquosas. Esta característica é desejável em partículas secas para uso farmacêutico devido à sua maior biodisponibilidade. Além do mais, a presença de manitol nas estruturas sólidas aumenta a eficiência da hidratação através do aumento da área superficial dos lipídios. Entretanto, este efeito depende da incorporação total do manitol na matriz lipídica. O pico único visualizado no difratograma de raios-X da Figura 17(a), referente à dispersão lipídica contendo 36mM e 85mM de manitol e lipídio, respectivamente, indica a total incorporação do açúcar neste nível de concentração. Os difratogramas de raios-X das Figuras 17(b) e (c), referentes a maiores concentrações de manitol, de 170 e 295mM, respectivamente, revelam a presença de açúcar não incorporado, detectado através dos picos adicionais, característicos do componente puro (Figura 12(b)). A densidade das partículas secas com manitol totalmente incorporado foi $0,94\text{g/cm}^3$, aumentando para $0,96\text{g/cm}^3$ e $1,02\text{g/cm}^3$ para concentrações de manitol de 170 e 295mM, respectivamente.

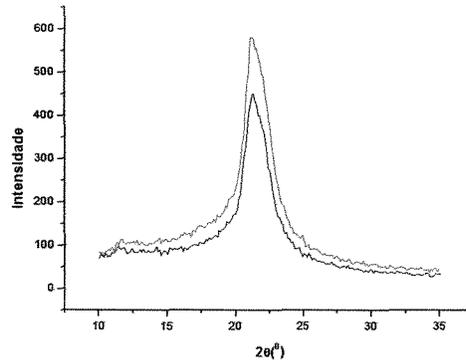


Figura 16: Efeito da presença de manitol na cristalinidade das partículas secas. Difratomogramas de raios-X: __ (preto) concentração de manitol 13mM (M1), __ (vermelho) sem manitol (M0). Temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lipídios 20mM; vazão da solução de alimentação 3mL/min.

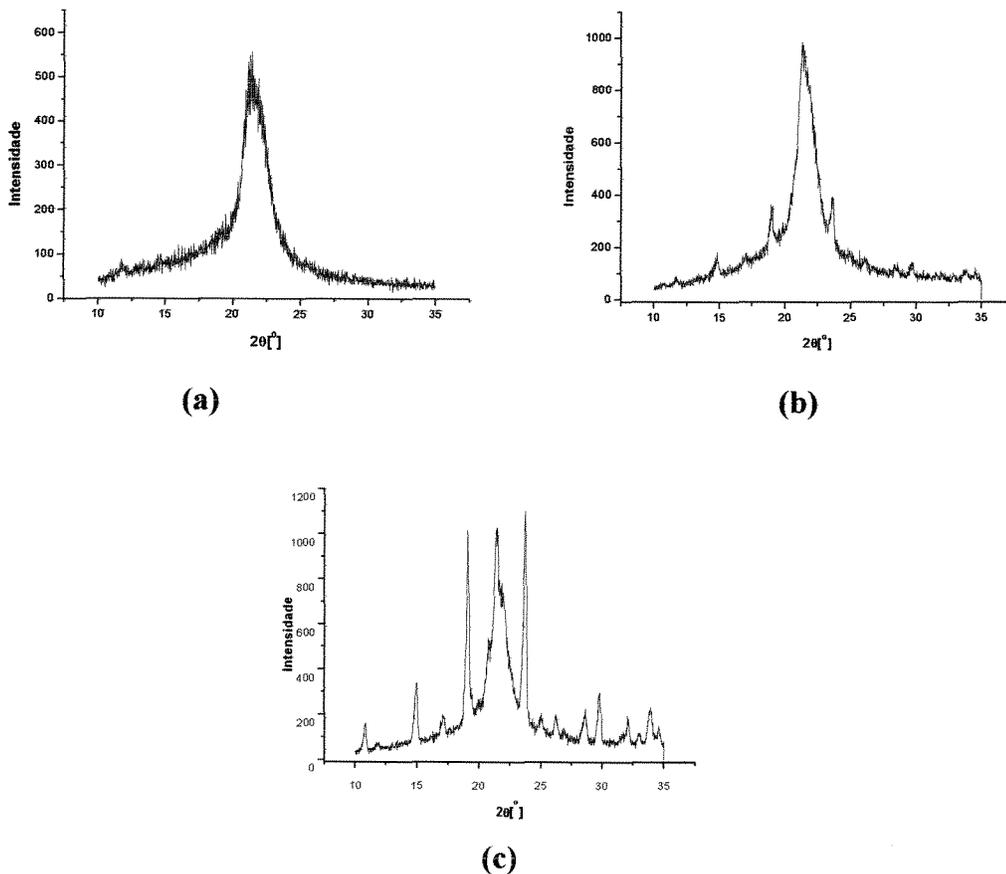


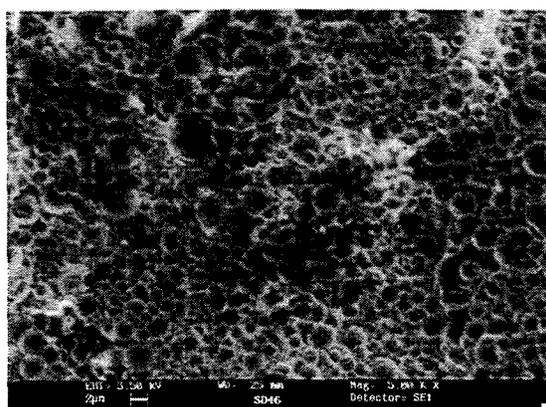
Figura 17: Efeito da concentração de manitol na cristalinidade das partículas secas. Difratomogramas de raios-X para concentrações de manitol de: (a) 36mM (experimento 31),

(b) 170mM (experimento 43), (c) 295mM (experimento 44). Temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lipídios 85mM; vazão da solução de alimentação 20mL/min.

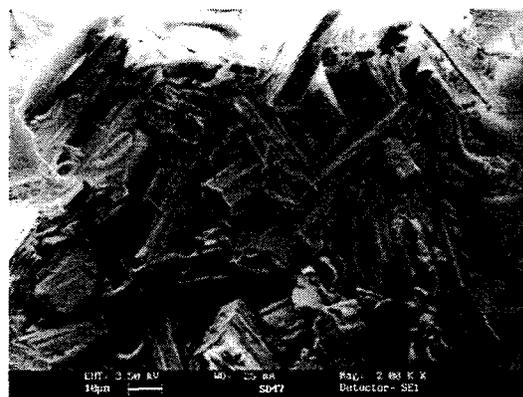
Adicionalmente, foi observado que a massa aderida à parede do ciclone foi bem menor, conduzindo a um maior rendimento do processo em relação a recuperação do fosfolipídio, de respectivamente 24 e 31% para os experimentos 43 e 44. Nestes ensaios, a relação mássica antes e após o processo de secagem por atomização entre o fosfolipídio e o manitol não se manteve constante, tendo o fosfolipídio apresentado uma maior recuperação. Isto pode ser explicado pela baixa eficiência de recuperação de partículas finas pelo ciclone.

3.3.4.2. Morfologia

As microscopias eletrônicas de varredura apresentadas na Figura 18 comparam as características morfológicas das partículas secas processadas através de diferentes condições operacionais de secagem.



(a)



(b)

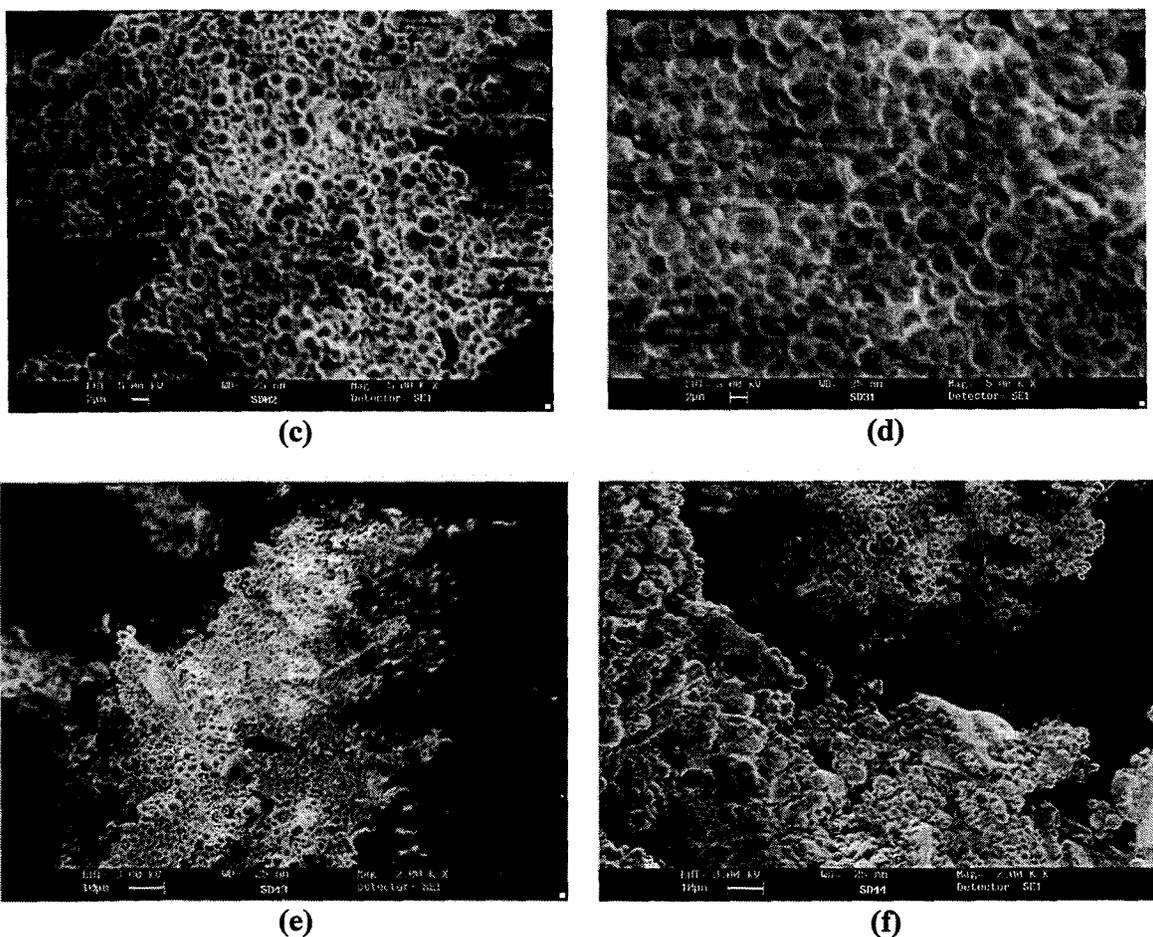


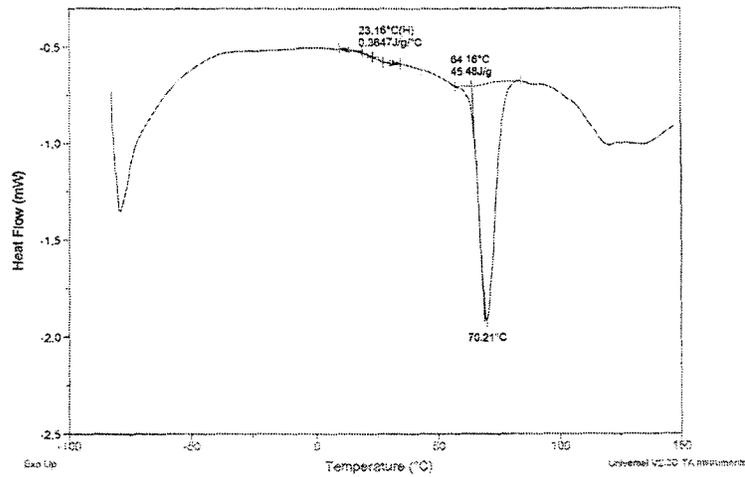
Figura 18: Microscopias eletrônicas de varredura das partículas: (a) epikuron 200SH (experimento 46: $V=20\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$), (b) manitol (experimento 47: $V=20\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$), (c) epikuron 200SH e manitol (experimento 2: $V=3\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$, $C_{\text{epk}}=45\text{mM}$, $C_{\text{Man}}=20\text{mM}$), (d) epikuron 200SH e manitol (experimento 31: $V=20\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$, $C_{\text{epk}}=85\text{mM}$, $C_{\text{Man}}=36\text{mM}$), (e) epikuron 200SH e manitol (experimento 43: $V=20\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$, $C_{\text{epk}}=85\text{mM}$, $C_{\text{Man}}=170\text{mM}$), (f) epikuron 200SH e manitol (experimento 44: $V=20\text{mL/min}$, $T=90^\circ\text{C}$, $C_{\text{epk}}=85\text{mM}$, $C_{\text{Man}}=295\text{mM}$).

As imagens mostram partículas homogêneas aproximadamente esféricas para o lipídio puro ou contendo manitol incorporado (Figuras 18(a), (c), (d)). Os tamanhos das partículas mantiveram-se principalmente entre $1\text{-}2\mu\text{m}$ (sem aglomerados), dependendo das condições operacionais do processo de secagem, como já apresentado na Tabela 14. Partículas maiores foram produzidas quando manitol foi incorporado nas estruturas

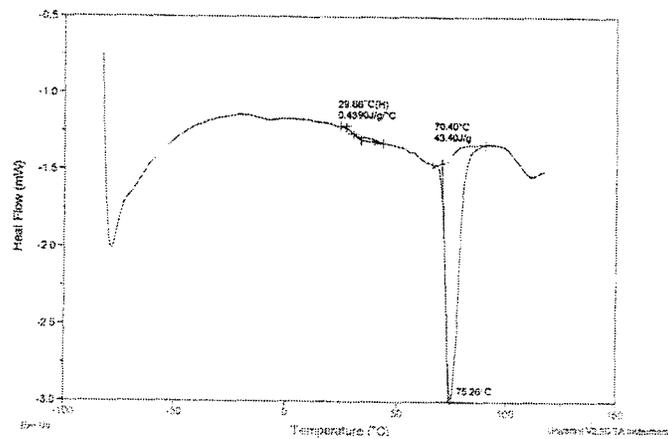
(Figuras 18(d) e 18(a)), e com o aumento da concentração e da vazão da solução de alimentação (Figuras 18(d) e 18(c)). Estes resultados estão de acordo com os obtidos através das medidas de tamanho de partículas em microscópio ótico e diâmetro aerodinâmico. A ausência dos cristais característicos do manitol puro (Figura 18(b)) nas imagens 18(c) e 18(d) confirmam a total incorporação do manitol nas microestruturas, evidenciado pelos espectros de raios-X já apresentados anteriormente. As figuras 18(e) e 18(f) apresentam as imagens para as amostras processadas com uma maior concentração de manitol. O açúcar não incorporado pode ser visualizado através das estruturas em forma de cristais nas imagens, características do componente puro (Figura 18(b)).

3.3.4.3. Transição de fases

Os espectros de DSC das partículas secas contendo ou não manitol na sua estrutura são apresentados na Figura 19. Observa-se que as temperaturas de transição principal das estruturas sólidas foram 70°C e 75°C, para as partículas contendo ou não manitol, respectivamente. Essa diferença é indicativa da incorporação do manitol na estrutura lipídica. Adicionalmente, observa-se nos perfis mudanças de capacidade calorífica da ordem de 0,4 J/g°C, típicas de transição vítrea, a temperaturas de 23°C (amostra de lipídio e manitol) e 30°C (amostra de lipídio), sugerindo a presença de transição vítrea nos sólidos amorfos. Por outro lado, sabe-se da literatura que a temperatura de transição vítrea do manitol é de aproximadamente 15°C [Yu et al. 1998], justificando a redução da suposta temperatura de transição vítrea na amostra contendo manitol. A temperaturas abaixo da transição vítrea existe uma mobilidade molecular mínima, e com isso a cristalização e a oxidação dos materiais é acentuadamente reduzida. Portanto, para estabilidade das partículas sólidas, recomenda-se a sua estocagem a temperaturas abaixo da transição vítrea.



(a)



(b)

Figura 19: Efeito da concentração de manitol sobre as propriedades térmicas das partículas secas. Espectros de DSC para: (a) concentração de manitol 36mM molar (experimento 31), (b) sem mannitol (experimento 46). Temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lipídios 85mM; vazão da solução de alimentação 20mL/min.

3.3.5. Incorporação do colesterol

A incorporação do colesterol foi analisada através da cristalinidade e da morfologia das partículas. A influência da presença de colesterol na cristalinidade das amostras foi analisada através dos espectros de raios-X apresentados na Figura 20. As amostras foram processadas sob as mesmas condições operacionais, mas com diferentes concentrações de colesterol.

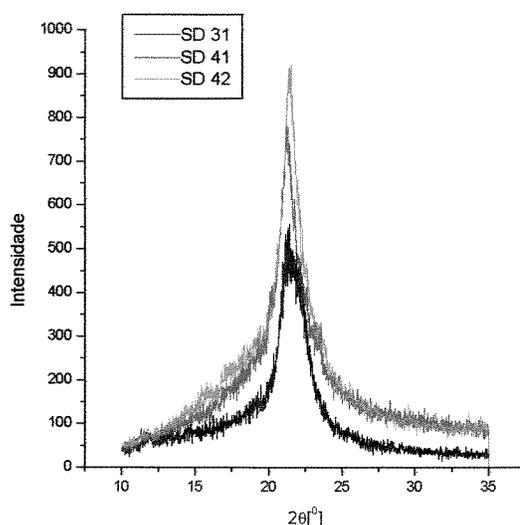


Figura 20: Difração de raios-X das amostras processadas sob as condições operacionais de secagem: concentração de lipídio 85mM, vazão da solução de alimentação 20 mL/min, temperatura de entrada do ar 90°C, concentração de manitol 36mM; com variação da razão molar de colesterol: ___ (preto) experimento 31, sem colesterol (umidade relativa do ar de 32%), ___ (vermelho) experimento 41, concentração de colesterol 17mM (umidade relativa do ar de 44%) e ___ (verde) experimento 42, concentração de colesterol 25,5mM (umidade relativa do ar de 43%).

Pode-se observar que a adição de colesterol conduziu ao aumento da cristalinidade das amostras, sendo que este efeito foi diretamente proporcional à quantidade incorporada. Isto pode ser explicado pelo preenchimento de locais anteriormente vazios na microestrutura pela molécula de colesterol.

A morfologia e as características de superfície das amostras foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 21), em amostras processadas com a adição de colesterol na solução de secagem.

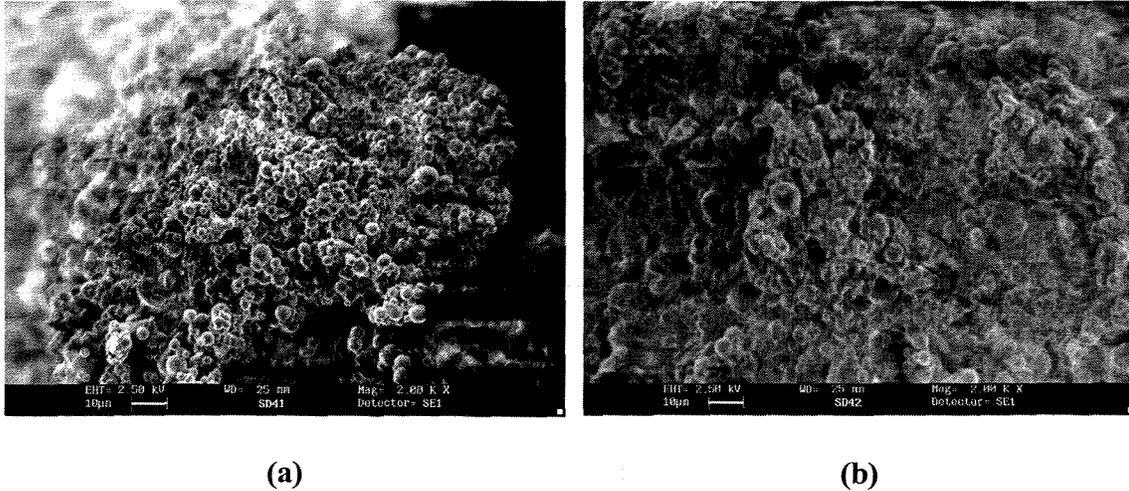


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura das amostras processadas sob as condições operacionais de secagem: concentração de lipídio 85mM, vazão da solução de alimentação 20 mL/min, temperatura de entrada do ar 90°C, concentração de manitol 36mM; com variação da concentração colesterol: (a) 17mM (experimento 41), (b) 25,5mM (experimento 42).

Através das micrografias apresentadas pode-se observar que as partículas secas são homogêneas, aproximadamente esféricas, e que houve a incorporação do colesterol.

4. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

4.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1.1. *Lipossomas: estrutura e função*

Os lipossomas pertencem a uma classe especial de cristais líquidos, que são moléculas que exibem simultaneamente, a certas temperaturas, algumas propriedades do estado líquido como a mobilidade e outras do estado sólido como o ordenamento. São compostos principalmente por uma classe especial de moléculas com atividade de superfície, chamadas de anfífilas ou anfipáticas. As principais moléculas formadoras dos lipossomas são os fosfolipídios e os esteróis [Lasic, 1993].

Os lipossomas, também chamados de vesículas lipídicas, são estruturas esféricas, compostas de bicamadas de lipídios que delimitam um compartimento aquoso interno central. Essa estrutura permite a encapsulação de compostos de naturezas hidrofílica e hidrofóbica e liberação controlada do conteúdo encapsulado através da bicamada lipídica. A Figura 22 apresenta a estrutura dos lipossomas com moléculas alojadas no seu interior e superfície. Uma propriedade adicional dessas vesículas é a flexibilidade de variação de suas propriedades através de mudanças na sua composição e no método de preparação, modulando-as para aplicações específicas.

Quanto ao número de bicamadas e tamanho, os lipossomas podem ser classificados em unilamelares pequenos (SUV – “small unilamellar vesicles”), com tamanhos da ordem de nanômetros, unilamelares grandes (LUV – “large unilamellar vesicles”) ou multilamelares (MLV – “multilamellar vesicles”), com tamanhos de até dezenas de micrômetros. A principal força que mantém as vesículas estáveis são as interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbônicas, sendo que o tamanho da cadeia é diretamente proporcional à força de interação. Outras forças responsáveis pela manutenção das estruturas são as interações eletrostáticas entre as cabeças polares, as interações de van der Waals e pontes de hidrogênio [Lasic, 1993; Scarpa e Oliveira, 1998].

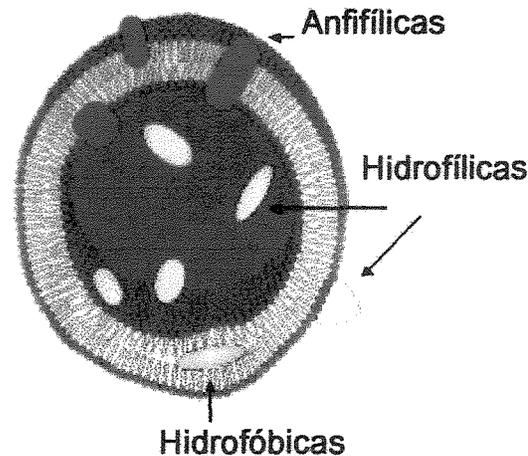


Figura 22: Associação de moléculas a lipossomas (Adaptação de Lasic, 1993).

As moléculas anfifílicas na bicamada podem estar em um estado gel, ou sólido, no qual as cadeias hidrocarbônicas exibem um empacotamento rígido e pouco movimento, ou em um estado líquido-cristalino, ou fluido, onde as cadeias hidrocarbônicas estão mais desordenadas e possuem grande mobilidade. No estado gel as moléculas encontram-se na conformação “all-trans” (Figura 23(a)) e no estado líquido cristalino a conformação é “trans-gauche”, onde as cadeias hidrocarbônicas apresentam uma pequena angulação para a esquerda, ocupando um comprimento menor e uma maior área lateral (Figura 23(b)).

A temperatura de transição da fase gel para a fase líquido-cristalina (T_m) é uma característica física importante da membrana e é, em condições isobáricas, função da composição química da membrana, força iônica e pH do meio, e presença de íons e moléculas. Durante a transição de fases ocorre um aumento na mobilidade das moléculas devido ao aumento da energia cinética, e a transformação da conformação “trans”, do estado gel, para a “gauche”, do estado líquido-cristalino. Além da transição de fases, alguns sistemas também apresentam a pré-transição de fases, alguns graus abaixo da transição principal, onde as cadeias de hidrocarbonetos adquirem certa mobilidade, mas não a mobilidade máxima. É normalmente dependente das forças eletrostáticas e, portanto, está

relacionada com a cabeça polar e não com as cadeias acilas. A energia envolvida na pré-transição de fases é inferior, se comparada com a transição principal.

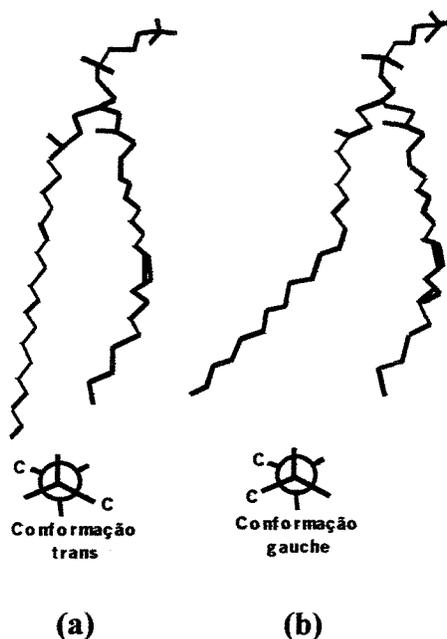


Figura 23: Conformações de uma molécula de lipídio no estado (a) gel - “trans”, (b) líquido-cristalino - “gauche” (Adaptação de Scarpa e Oliveira, 1998).

Normalmente membranas compostas de misturas de lipídios não exibem a transição de fases, enquanto sistemas sintéticos puros apresentam uma dependência da temperatura de transição de fases em relação ao comprimento e grau de saturação da cadeia hidrocarbônica, assim como da natureza da cabeça polar. Quanto maior o tamanho da cadeia hidrocarbônica, maior é a temperatura de transição de fases, pois maior é a interação entre as moléculas e, portanto, mais energia deve ser adicionada para que as cadeias adquiram fluidez. Quanto maior o grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica, menor é a temperatura de transição de fases, pois a presença de ligações duplas ou triplas causa uma menor mobilidade das cadeias, diminuindo a interação hidrofóbica e, assim, com uma menor energia as cadeias adquirem fluidez. A natureza da cabeça polar também interfere na temperatura de transição de fases, pois ligações mais fortes entre as moléculas resultam em temperaturas mais altas.

O colesterol pertence à classe dos esteróis e caracteriza-se por ser uma molécula mais hidrofóbica e volumosa, se comparada com os fosfolípidios. Com isso, a sua incorporação às vesículas aumenta a desordem na fase de baixa temperatura, fase gel, fazendo com que as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidios adquiram uma certa angulação, favorecendo a mobilidade e a fluidez, mesmo a temperaturas abaixo da transição de fases. Esta é a razão pela qual as membranas biológicas, que possuem colesterol, são fluidas a temperatura ambiente, mesmo sendo a temperatura de transição de fases dos principais constituintes dessas membranas maior que a temperatura ambiente. Já a temperaturas maiores que a de transição de fases, onde as moléculas encontram-se no estado líquido-cristalino, a presença do colesterol aumenta a ordem e diminui a fluidez, produzindo a rigidez das bicamadas. Nessa situação, as moléculas do colesterol encaixam-se entre as moléculas dos fosfolípidios, aumentando a retenção de drogas hidrofílicas, assim como a resistência à degradação do lipossoma *in vivo*. Estes fatos explicam a razão do colesterol ser muito usado em formulações farmacêuticas. O colesterol também reduz a intensidade da transição de fases, sendo que, em concentrações molares acima de 30% a transição de fases é praticamente eliminada [Grit e Crommelin, 1993].

Os lipossomas despertaram muito interesse nas áreas de química, indústria alimentícia, agricultura, ciências da vida e saúde. As suas características físico-químicas, a sua grande versatilidade estrutural e algumas propriedades fundamentais explicam a grande potencialidade e o elevado número de estudos realizados com estes sistemas. Nas aplicações médicas, características importantes são a biocompatibilidade, que se deve a sua biodegradabilidade, baixa ou nula toxicidade e ausência de imunogenicidade. Além disso, eles podem ser administrados por todas as vias, e podem ser direcionados para sítios específicos do organismo através de modificações físicas ou químicas na sua superfície [Cruz, 1996].

4.1.2. Métodos de preparação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser preparados através de diversos métodos. Muitas vezes a composição lipídica ou a sensibilidade do material a ser encapsulado impõe o procedimento de preparação a ser utilizado ou, no mínimo, exclui aqueles que podem danificar seus

constituintes. A seleção do método de preparação constitui um dos itens fundamentais do projeto de lipossomas para aplicações específicas.

Em geral, a preparação das vesículas lipídicas envolve três etapas: inicialmente há a formação de uma superfície lipídica seca, contendo geralmente uma mistura de lipídios, formada através da evaporação dos solventes orgânicos utilizados para a solubilização da mistura. A segunda etapa é a de dispersão ou hidratação dos lipídios em um meio aquoso que pode conter o material a ser encapsulado e, na última etapa, a de homogeneização, são obtidas dispersões homogêneas de lipossomas, com a formação das vesículas de interesse. A seguir serão descritos os métodos para a preparação dos lipossomas.

4.1.2.1. Método do filme seco de lipídios

Também chamado de método de Bangham, este método inicia-se com a dissolução do lipídio, ou da mistura de lipídios, em um solvente orgânico, normalmente clorofórmio. Em seguida é feita a evaporação do solvente orgânico sob vácuo, resultando na formação de um filme lipídico na parede interna do recipiente. Adiciona-se então uma solução aquosa para a hidratação do filme, mantendo o sistema a uma temperatura superior a de transição de fases dos lipídios (T_m), e sob agitação. As vesículas formadas são predominantemente multilamelares, com distribuição de tamanho heterogêneo. O filme produzido, conhecido como filme lipídico de Bangham, possui um grau de cristalinidade que limita a sua capacidade de hidratação, quando comparado com produtos mais amorfos. Este método, apesar de muito usado em laboratório, não é adequado para processos em grande escala [Lasic, 1993; Kikuchi et al., 1991].

4.1.2.2. Injeção de solventes voláteis

Neste método o lipídio é dissolvido em um solvente volátil, por exemplo etanol ou éter, e a solução rapidamente injetada em uma fase aquosa bem agitada. Como resultado, são produzidas soluções de SUV's diretamente, obtendo-se vesículas regulares monodispersas de tamanho variável, dependendo das condições de injeção do solvente [Kremer et al., 1977; Cafiso et al., 1979]. As vantagens deste método são a simplicidade, a capacidade de obtenção de vesículas unilamelares em uma só etapa, a ausência de tratamentos físicos ou químicos nocivos, além da possibilidade do aumento de escala do

processo. As desvantagens são a baixa produtividade, a etapa adicional para a remoção do solvente, e os riscos da sua presença no produto [Lasic, 1993].

4.1.2.3. Método da remoção de detergente

Trata-se de um método muito ameno, não agressivo, e, desta forma, pode ser usado com moléculas sensíveis aos outros tipos de tratamento. A solução inicial neste caso é uma solução coloidal de micelas de moléculas de detergente/fosfolipídios, onde posteriormente deve ocorrer a remoção das moléculas de detergente. A remoção pode ser feita através de diluição, diálise ou filtração em gel. Foi observado que a cinética de remoção do detergente/formação das vesículas influencia o tamanho dos lipossomas formados. A vantagem é que este método é muito flexível, permitindo a preparação de uma grande variedade de lipossomas. As desvantagens são que as concentrações de lipídio são baixas, normalmente até 20mM, o procedimento de preparação inclui várias etapas e a presença de moléculas de detergente não removidas pode causar um aumento na permeabilidade da bicamada [Lasic, 1993].

4.1.2.4. Método de secagem por atomização

Lipossomas podem ser produzidos a partir da hidratação de partículas lipídicas secas por atomização. Adicionalmente, o material a ser encapsulado pode ser adicionado à solução de alimentação, havendo a incorporação da substância na matriz sólida. As partículas formadas por este método podem ser estocadas por longos períodos em refrigerador, e sua grande área superficial e grau de cristalinidade proporcionam uma elevada eficiência de hidratação. O processo de hidratação é feito com uma solução aquosa, e a dispersão de lipossomas é formada por vesículas multilamelares. Além da estabilidade de estocagem, outras vantagens desta técnica são: o baixo custo, a pureza do produto, fácil operação do equipamento, boa reprodutibilidade, grande versatilidade na composição das vesículas, alta eficiência de encapsulação, elevada produtividade e facilidade de aumento de escala do processo. Além disso, a adição de açúcares na solução de alimentação do equipamento, tais como trealose ou manitol, aumenta o rendimento do processo, protege o material na secagem e na subsequente estocagem, assim como forma partículas secas mais amorfas e, portanto, mais facilmente hidratadas [Kikuchi et al., 1991; Lasic, 1993].

4.1.2.5. Método da desidratação-rehidratação (DRV/LMLV)

O aparecimento das vesículas desidratadas-rehidratadas (DRV – “dehydrate rehydrate vesicles”) foi o primeiro passo que permitiu aumentar as expectativas para a produção industrial de lipossomas. Essas vesículas foram desenvolvidas por Kirby e Gregoriadis [1984] e possuem características físico-químicas semelhantes as MLV's preparadas pelo método de Bangham, porém podem apresentar eficiências de encapsulação muito altas, resultando em altas concentrações de soluto no seu interior.

Este método baseia-se na liofilização de lipossomas na presença do soluto (desidratação), e na posterior rehidratação do produto liofilizado. Outro tipo de vesícula desenvolvida que também apresenta alta eficiência de encapsulação é a vesícula multilamelar liofilizada (LMLV – “lyophilized multilamellar vesicle”), que é preparada através da liofilização dos lipídios e posterior hidratação na presença dos solutos. O aumento da capacidade de incorporação nestes dois sistemas deve-se ao efeito de concentração do soluto junto aos lipossomas, ou do lipídio, durante a desidratação e rehidratação, num volume mínimo de água, e ainda ao fato da hidratação ocorrer não em um filme lipídico que funciona como barreira semi-permeável à incorporação de solutos, mas em um liofilizado.

Estes métodos são prejudicados principalmente pelos problemas envolvidos com as técnicas convencionais de liofilização, as quais são relativamente complexas e caras. Além do mais, a taxa de produção das vesículas por este processo é limitada e, dependendo da aplicação, há a necessidade de utilização de crioprotetores para que a estabilidade física dos lipossomas seja preservada [Kirby e Gregoriadis, 1984; Redziniak e Meybeck, 1985; Cruz, 1996; Scarpa e Oliveira, 1998].

4.1.2.6. Método do Pró-lipossoma

Este método é baseado na formação inicial de bicamadas lipídicas planas (pró-lipossomas), quando a porcentagem de água ou água/etanol no meio é menor que 30%. A vesiculação ocorre com a adição de excesso de água aos pró-lipossomas sob agitação mecânica, formando os lipossomas, que encapsulam qualquer ingrediente ativo dissolvido ou suspenso na fase aquosa. Este método apresenta como vantagens a facilidade de

escalonamento, o baixo custo e a simplicidade [Perrett et al., 1991; Williams, 1992; Arnaud, 1995; Ganter e Volker, 1997].

4.1.3. Métodos de redução e homogeneização de tamanhos dos lipossomas

Para a redução e homogeneização dos lipossomas multilamelares podem ser utilizadas várias técnicas. Uma delas é a extrusão, que é um tratamento mecânico, que consiste em forçar a passagem da dispersão de MLV's através de uma membrana de policarbonato, com tamanho de poro bem definido, sob alta pressão (até 100atm) e a temperaturas superiores à temperatura de transição de fases dos fosfolípidios. Este método é o mais indicado para a homogeneização de lipossomas em escala de laboratório, devido à possibilidade de aplicação para uma grande variedade de lípidios e suas misturas, e a reprodutibilidade. As vesículas obtidas possuem estreita faixa de distribuição de tamanhos e diâmetro médio semelhante ao do poro da membrana. Uma desvantagem do método é a necessidade de várias extrusões para a obtenção de vesículas unilamelares com distribuição homogênea de tamanhos.

A sonicação é um tratamento mecânico que pode ser realizado direta ou indiretamente na dispersão de MLV's. No primeiro caso a sonicação é feita diretamente nas vesículas, enquanto no segundo caso a amostra em um recipiente é colocada em um banho com sonicação. As vesículas obtidas por este método são menores que as extrudadas, e apresentam uma faixa maior de distribuição de tamanhos. Este método, no entanto, pode provocar a degradação dos lípidios [Lasic, 1993].

Na prensa francesa a solução de MLV's é forçada através de um orifício pequeno e ajustável de um cilindro, a pressões de até 25000psi e, após várias passagens, são produzidas SUV's. As desvantagens deste método são que as concentrações iniciais de lípidios devem ser baixas, inferiores a 20mM, e também as vesículas produzidas não possuem uma distribuição de tamanhos bem definida. No entanto, este método é adequado para o aumento de escala, além de ser de baixo custo.

Na microfluidização a dispersão de lipossomas circula sob alta pressão através de um pré-filtro, quando então é injetada em uma câmara de interação. Na câmara a suspensão é dividida em dois fluxos que subsequentemente colidem a velocidades extremamente altas, em micro-canais definidos dimensionalmente. A dispersão de lipossomas é reciclada até

que o tamanho das vesículas torne-se adequado. As vantagens deste método são que podem ser operados volumes desde 50mL até muitos litros, permitindo assim o aumento de escala de produção das vesículas, num intervalo de temperatura de 20 a 90°C, e pressões de 0 a 200atm, além das altas concentrações iniciais, que podem ser de até 300mM.

4.1.4. Escalonamento da produção de lipossomas

Apesar dos vários métodos existentes para a produção de lipossomas em escala de laboratório, somente a injeção de solventes voláteis, a hidratação de partículas produzidas por secagem e o método do pró-lipossoma são escalonáveis. Entre esses, os que apresentam maiores vantagens são os dois últimos.

Perrett e colaboradores [1991] caracterizaram os lipossomas formados através do método do pró-lipossoma. A mistura inicial era formada através da agitação a 60°C de lecitina do ovo (EPC – “egg phosphatidylcholine”), etanol e tampão Tris-HCl (pH 7,4). Quando a mistura era resfriada a temperatura ambiente, os pró-lipossomas eram formados. Eles observaram que a estrutura da mistura pró-lipossoma variou com a relação mássica do lipídio, etanol e tampão, assim como com o lipídio usado e a temperatura. A posterior adição de tampão levou a formação de lipossomas multilamelares, com distribuição bimodal de tamanhos entre 100 e 2000nm e diâmetro principal da ordem de 500nm. Os lipossomas apresentaram alta eficiência de encapsulação principalmente de compostos hidrofóbicos. Este método também foi descrito na patente americana dos autores Ganter e Volker [1997]. A preparação do pró-lipossoma foi feita em um agitador do tipo moinho de bolas, a partir de uma mistura composta de lecitina (50 a 90% peso), solubilizador (normalmente etanol, 15 a 50% peso), água (0 a 10% peso) e o composto hidrofílico ou lipofílico a ser incorporado (0 a 20% peso). As estruturas formadas eram lamelares longas. A preparação dos lipossomas foi feita em um agitador do tipo moinho de bolas, a partir de uma mistura composta de lecitina (1 a 30% peso), solubilizador (normalmente etanol, 1 a 15% peso), água (35 a 95% peso) e o composto hidrofílico ou lipofílico a ser incorporado (0 a 5% peso). A distribuição de tamanhos das vesículas multilamelares variou de 1 a 2µm ou de 2 a 5µm, dependendo da quantidade de água/composto da mistura (1/85,5 e 4/82,5 respectivamente). Os lipossomas unilamelares preparados a partir de pró-lipossomas apresentaram uma distribuição de tamanhos entre 50 a 100nm.

A técnica de secagem por atomização representa uma alternativa que permite a produção em grande escala de partículas amorfas, que posteriormente, após hidratação, formam os lipossomas. Este método é particularmente vantajoso quando o composto encapsulado é instável e deve ser preparado imediatamente antes do seu uso. Os equipamentos envolvidos nesta técnica são simples e baratos, além do mais, a energia necessária para a atomização da solução e evaporação do solvente é bem menor que a energia consumida pela técnica da liofilização, e não há necessidade de utilização de produtos adicionais para proteção [Redziniak e Meybeck, 1985].

Skalko-Basnet e Pavelic [2000] estudaram a secagem por atomização de lipossomas vazios de lecitina e manitol em clorofórmio. Formulações adicionais contendo β -ciclodextrina e droga também foram secas pelo mesmo método. Os lipossomas secos foram hidratados com tampão fosfato salino (PBS – “phosphate buffer saline”) e caracterizados. Eles observaram que o principal fator que influenciou o tamanho dos lipossomas foi o volume do meio aquoso usado na hidratação do produto atomizado. Não houve diferenças no tamanho ou na encapsulação em lipossomas preparados imediatamente após a produção dos pós ou após um ano de estocagem a 4°C, sendo as vesículas mais estáveis as preparadas a partir de formulações de lipídio, droga e ciclodextrina. Kim e Kim [2001] estudaram partículas compostas de fosfolípidios e Amfotericina B produzidas através de secagem por atomização. Após hidratação das partículas com tampão fosfato foram formadas estruturas na forma de vesículas bilamélares (lipossomas) além de complexos de fosfolípidios-Amfotericina B. A habilidade hemolítica das partículas foi menor, se comparada com a droga livre, e não houve perda da atividade anti-fúngica.

A secagem de vesículas multilamélares pré-formadas e subsequente reconstituição por hidratação das partículas secas foi estudada por Goldbach e colaboradores [1993i, ii]. Os lipossomas eram compostos de fosfatidilcolina da soja e lactose. Os diâmetros das partículas secas foi de 7 ou 3,5 μ m, respectivamente com o uso de atomizador rotatório ou esguicho. O tamanho das vesículas não foi significativamente afetado após rehidratação, e a estabilidade química dos fosfolípidios não foi afetada pelo processo. Foi encapsulado sulfato de atropina como modelo de droga hidrofílico, com uma eficiência de 4-6%, mas houve uma alta perda da droga encapsulada durante o processo de secagem, de 65-80%. Por outro lado, α -tocopherol foi incorporado nas vesículas com uma eficiência de 92%, e não foi observada perda da droga durante o ciclo de desidratação-rehidratação.

4.1.5. Produção industrial de lipossomas

Os primeiros produtos cosméticos contendo lipossomas foram lançados em 1986, pela L'Oreal (Niosomes®) e pela Christian Dior (Capture®) [Redziniak et al., 1995]. As patentes registradas nesta área incluem processos envolvendo emulsificação, liofilização e secagem por atomização.

Um exemplo é a patente americana nº 4508703, de 1985, registrada pela Christian Dior, na qual é desenvolvida uma metodologia para a produção de uma mistura em forma de pó de constituintes lipídicos (por exemplo, a lecitina) e hidrofóbicos (por exemplo, o colesterol) que, posteriormente, após hidratação, formam os lipossomas. O objetivo desta patente foi o de solucionar os problemas dos métodos anteriormente utilizados, tais como a utilização de agentes protetores para o congelamento dos lipossomas, incompatíveis para o uso *in vivo*, o alto custo dos equipamentos assim como o alto consumo de energia. O método proposto é simples e permite a produção contínua de grandes quantidades de misturas em forma de pó e, subseqüentemente, de lipossomas, sendo aplicável para a preparação de produtos tanto para a área cosmética quanto para a farmacêutica.

Desde 1992 estão no mercado farmacêutico dois produtos com lipossomas, os quais têm trazido vários benefícios para os pacientes. Um deles é o AmBisome o outro é o Doxil. Este último caracteriza-se por ser um lipossoma do tipo “stealth”, que contém em sua formulação polietilenoglicol. A presença do polímero aumenta a estabilidade física das vesículas, o tempo de circulação na corrente sanguínea, assim como a estabilidade da droga encapsulada. Esta formulação mostrou ser muito efetiva na terapia de vários tumores de câncer [Lasic, 1993].

Com isso, a partir da década de 80, da indústria farmacêutica à alimentícia, da química à cosmética, o número de patentes registradas aumentou, evidenciando o crescimento econômico criado pelos lipossomas e provando o impacto comercial presente e futuro. Desta forma, existem centenas de produtos no mercado que necessitam deste microveículo e, principalmente na indústria farmacêutica, há a necessidade de fabricação de lipossomas em grande escala. Muitos dos problemas associados à preparação dos lipossomas já foram solucionados, e, atualmente, pode-se considerar projetos de formulações mais sofisticados, os quais apresentam numerosas vantagens para desenvolvimentos futuros [Redziniak et al., 1995].

4.1.6. Agitação mecânica - Tipos de impelidores e regimes de mistura

A agitação é um processo que fornece movimento ao líquido, auxiliando a realização dos processos químicos ou físicos. Os equipamentos utilizados na agitação mecânica consistem normalmente em um tanque cilíndrico, impelidores e um motor. A escolha da melhor configuração do sistema de agitação é baseada na análise dos objetivos da aplicação, nas características do produto e seus componentes, bem como nos requisitos operacionais.

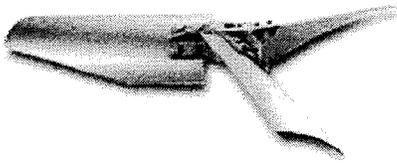
Os impelidores são responsáveis pela transferência de movimento ao fluido, e vários tipos são disponíveis para utilização em aplicações específicas. Podem gerar padrões de fluxo axial, tangencial ou radial, dependendo da direção dos componentes de velocidade em relação ao eixo do impelidor. Fluxos radiais atuam perpendicularmente, os tangenciais junto ao círculo de rotação e os axiais paralelamente ao eixo.

Os impelidores são classificados de acordo com o regime de mistura, laminar ou turbulento. No regime laminar o impelidor usado deve ter o diâmetro próximo ao do tanque, uma vez que o transporte de quantidade de movimento é baixo. Dois tipos de impelidores típicos utilizados no escoamento laminar são apresentados na Figura 24.

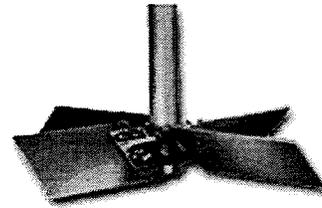


Figura 24: Impelidores utilizados no escoamento laminar.

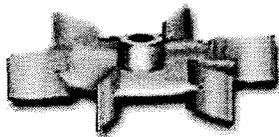
No regime de mistura turbulento, os impelidores usados possuem diâmetro menor, se comparados com os utilizados no escoamento laminar, da ordem de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do diâmetro do tanque, os quais proporcionam uma eficiente transferência de movimento. Os principais impelidores utilizados no regime turbulento são apresentados na Figura 25.



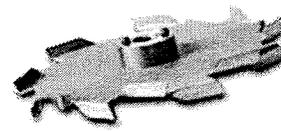
(a) tipo naval



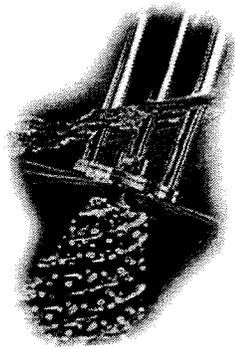
(b) tipo pás inclinadas



(c) tipo turbina



(d) tipo pá dentada



(e) impelidor de alto cisalhamento

Figura 25: Impelidores utilizados em escoamento turbulento.

Os impelidores do tipo naval formam padrão de fluxo axial e operam normalmente a altas rotações. Apresentam boa eficiência em termos de fluxo de massa por unidade de potência, sendo por isso utilizados em processos em que o bombeamento é o fator mais

importante. Os impelidores do tipo pás geram componentes de velocidade radiais e tangenciais, enquanto o movimento axial é gerado se as pás são inclinadas. Estes impelidores promovem um alto bombeamento e são utilizados principalmente para suspensão de sólidos. No caso dos impelidores do tipo pá dentada, eles também promovem alto cisalhamento. As componentes de velocidade geradas pelos impelidores do tipo turbina são radiais e tangenciais, e eles são utilizados em processos que necessitam de alta turbulência e tensões de cisalhamento. No impelidor de alto cisalhamento apresentado na Figura 25(e) a mistura é bombeada na região central e, pelo formato do impelidor, todo o líquido é forçado a passar através de furos dispostos lateralmente ao fluxo. Esse tipo de impelidor apresenta baixo bombeamento, requerendo, em alguns casos, a utilização conjunta de agitador tipo âncora. Apresenta a vantagem de fácil escalonamento, que é feito pelo simples aumento da quantidade de orifícios do impelidor utilizando-se o critério de ampliação torque/volume [Nunhez, 2002].

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. *Material*

- Fosfatidilcolina natural da soja, purificada, hidrogenada, adquirida da Lucas Meyer: Epikuron 200SH;
- Hapes, colesterol, dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) e dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) adquiridos da Sigma Chemical Co.;
- Clorofórmio, peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico P.A. adquiridos da Merck;
- Álcool etílico, álcool metílico, cloreto de sódio P.A. e manitol adquiridos da Synth;
- Molíbdató de amônio adquirido da Ecibra;
- Ácido sulfúrico P.A. adquirido da Erich Ltda.;
- Água bidestilada e deionizada em sistema milli-Q.

4.2.2. Métodos

Foram utilizados dois métodos para a preparação dos lipossomas: o método de hidratação do filme seco ou de Bangham e o método da hidratação das partículas sólidas produzidas através de secagem por atomização.

4.2.2.1. Preparação de lipossomas através do método de Bangham

Lipossomas com o fosfolípido natural Epikuron 200SH foram preparados pelo método de Bangham, para comparação das suas propriedades com os preparados a partir dos fosfolípidos sintéticos distearoilfosfatidilcolina (DSPC – “distearoylphosphatidylcholine”), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE – “dimiristoylphosphatidylethanolamine”) e colesterol (40/20/40) [Lima, 2001]. Os lipossomas foram compostos de 60% de Epikuron 200SH e 40% de colesterol (porcentagens molares), a uma concentração total de lípidios inicial (L_0) de 7,5mM. A preparação foi feita em evaporador rotatório da Fisatom e banho térmico da Yamato. A hidratação do filme seco de lípidios foi feita à 65°C, com alta velocidade de rotação, por 30 minutos, usando tampão HEPES/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4.

Após a hidratação, a dispersão de lipossomas multilamelares era sonicada por 30 minutos em banho e, após 2,5 horas de repouso, era extrudada em membrana de policarbonato com diâmetro nominal de poro de 100nm para redução e homogeneização de tamanhos. A extrusão foi realizada em um equipamento de aço inox, com volume de 10mL e camisa térmica para a circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., sob pressão de aproximadamente 15Kgf/cm² e temperatura de 65°C. Este procedimento era repetido 15 vezes para garantir a preparação de vesículas unilamelares pequenas (SUV's), com diâmetros de aproximadamente 100nm.

4.2.2.2. Hidratação das partículas secas: preparação e homogeneização dos lipossomas

As partículas secas foram hidratadas com solução tampão HEPES/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4. O produto seco foi hidratado de duas formas: através de agitação rotatória ou através de agitação mecânica. Na hidratação com agitação rotatória o produto seco foi colocado em um balão de fundo redondo (massa correspondente à concentração de

5 a 7mM), onde foi adicionada a solução tampão, e o balão foi mantido sob rotação, a 65°C, por 30 minutos.

A hidratação com agitação mecânica foi feita em duas etapas, visando uma maior eficiência de incorporação do meio aquoso. Inicialmente uma quantidade de partículas era colocada em um béquer encamisado, mantido a 65°C, e era adicionado tampão em volume correspondente a formação de fase lamelar plana (menos de 30%). A mistura com consistência pastosa era mantida sob agitação a 100 rpm durante 15 minutos com um agitador do tipo âncora (Figura 24(a)). Posteriormente, o restante do volume aquoso tamponado era adicionado (volume final de 30mL), e tinha início a segunda etapa da agitação, para a obtenção de fase lamelar com excesso de água, e formação dos lipossomas. Visando a formação e também a homogeneização e redução do tamanho dos lipossomas em uma única etapa, foi utilizado um agitador mecânico especial de alto cisalhamento, construído pela empresa Kroma Equipamentos Especiais Ltda.. Neste tipo de agitador, a mistura era bombeada na região central, e pelo formato do impelidor todo o líquido era forçado a passar através de furos de 1mm ou de 0,3mm de diâmetro dispostos lateralmente ao fluxo, causando assim alto cisalhamento (Figura 25(e)). Também foi utilizado na segunda etapa da agitação o impelidor do tipo pá dentada (Figura 25(d)).

4.2.2.2.1. Estudo da redução e homogeneização de tamanhos dos lipossomas

No estudo da redução e homogeneização de tamanhos dos lipossomas foram analisadas a influência da velocidade de agitação e as características do agitador de alto cisalhamento sobre o diâmetro médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas formados. Foram usadas velocidades de agitação de 1000, 2000, 3000 ou 4000rpm, e diâmetros de furo do agitador de 0,3 ou 1mm, no tempo de 1 hora, e temperatura de 65°C. Também foram realizados ensaios com o impelidor do tipo pá dentada nas velocidades de agitação de 2000 ou 4000rpm, no tempo de 1 hora e temperatura de 65°C.

4.2.2.3. Caracterização dos lipossomas

4.2.2.3.1. Concentração total de lipídios (L_F)

A concentração total de lipídios foi determinada através do ensaio fosfato, método descrito por Chen et al. [1956] (item 3.2.2.8.1).

4.2.2.3.2. Medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das vesículas foram determinados por espectroscopia de espalhamento de luz de alta frequência, obtida por incidência de raios laser (método quasi-elastic light scattering, QELS), em um equipamento da Malven Autosizer, modelo 4700.

4.2.2.3.3. Temperatura e energia de transição de fases

As temperaturas e energias necessárias para a transição de fases dos lipossomas foram obtidas através da técnica de microcalorimetria diferencial de varredura (microDSC). Os experimentos foram realizados em um equipamento da Microcal Inc., modelo VP-DSC microcalorimeter, com varreduras na faixa de 20 a 80°C, a uma taxa de 30°C/hora ou 0,5°C/minuto. A temperatura e energia de transição de fases foram determinadas para avaliação do empacotamento de lipídios nos lipossomas vazios de Epikuron 200SH preparados pelo método de Bangham. Para lipossomas preparados a partir das partículas secas por atomização esses parâmetros foram determinados para avaliação da incorporação de colesterol nas estruturas (condições operacionais da secagem: concentração de lipídio 85mM, concentração de manitol 36mM, vazão da solução de alimentação 20mL/min, temperatura de entrada do ar 90°C, e com variação da concentração de colesterol 17mM (experimento 41), 25,5mM (experimento 42), sem colesterol (experimento 31)).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Temperatura de transição de fases do Epikuron 200SH

A microcalorimetria diferencial de varredura do fosfolípido Epikuron 200SH é apresentada na Figura 26. Pode-se observar que a temperatura de transição de fases do Epikuron 200SH é de aproximadamente 50°C, valor este entre as temperaturas de transição de fases do DSPC e do DPPC, que são de 55°C e 41°C, respectivamente [Lasic, 1993]. Logo, a preparação dos lipossomas a temperatura de 65°C garante a presença da fase líquido-cristalina nas membranas. Adicionalmente foi obtida a energia necessária para a transição de fases, que foi de 6110 calorias ou 25540 Joules.

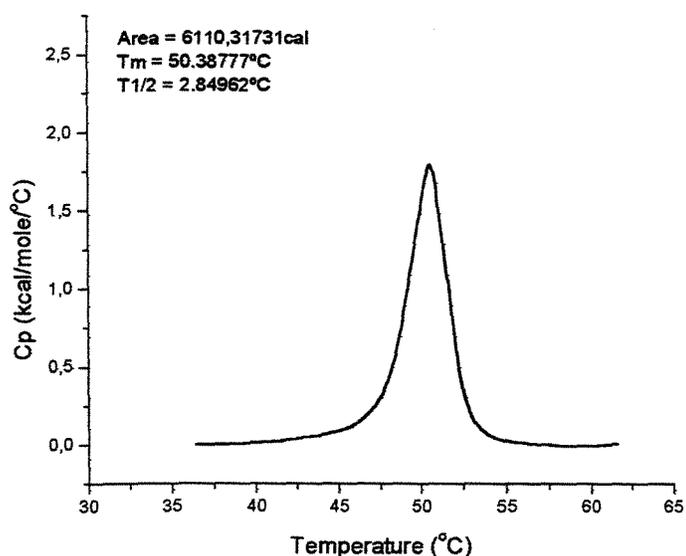


Figura 26: Análise de microcalorimetria de lipossomas vazios 7,5mM de Epikuron 200SH.

4.3.2. Produção de lipossomas por agitação mecânica

4.3.2.1. Diâmetro principal e distribuição de tamanhos

A influência do tipo de impelidor e da velocidade de agitação sobre o diâmetro principal e a faixa de distribuição de tamanho dos lipossomas é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15: Influência do tipo de impelidor e da velocidade de agitação (v) sobre o diâmetro principal e a faixa de distribuição de tamanhos dos lipossomas.

v [rpm]	Tipo impelidor	$D_{\text{principal}}$ [nm]	Distribuição tamanho [nm]
1000	Impelidor Kroma (1mm)	2640	1848-4117
	Impelidor Kroma (0,3mm)	2575	1674-3341
2000	pá dentada	2882	2038-3716
	Impelidor Kroma (1mm)	1937	1409-2347
	Impelidor Kroma (0,3mm)	2192	1416-2826
3000	Impelidor Kroma (1mm)	2843	2643-3100
	Impelidor Kroma (0,3mm)	2478	1684-3071
4000	pá dentada	4482	3398-5660
	Impelidor Kroma (1mm)	4344	4129-4652
	Impelidor Kroma (0,3mm)	2465	1761-2934

Pode-se observar que o tipo de impelidor e a velocidade de agitação influenciam o diâmetro principal e a distribuição de tamanhos dos lipossomas formados. O impelidor do tipo pá dentada produziu lipossomas maiores e com uma maior faixa de distribuição de tamanhos se comparado com os lipossomas produzidos pelos impelidores de alto cisalhamento da empresa Kroma. Nos dois casos estudados do agitador Kroma (com

diâmetros de furo de 0,3 ou 1mm), os lipossomas formados não apresentaram grandes diferenças, exceto à velocidade de 4000rpm, onde o diâmetro principal dos lipossomas, com o agitador de 1mm, foi da ordem de 4000nm, provavelmente devido à agregação das vesículas em decorrência do nível de energia imposto ao sistema.

Lipossomas com essas dimensões são úteis para aplicações imunológicas e de anestésicos, sendo que os lipossomas aqui produzidos têm a vantagem de maior uniformidade de tamanhos, se comparados com os multilamelares geralmente usados nestas aplicações, e com os produzidos através do método do pró-lipossoma [Perrett et al., 1991].

De acordo com os resultados obtidos de diâmetro médio e distribuição de tamanhos de lipossomas, optou-se por utilizar em ensaios posteriores o impelidor Kroma com diâmetro de 0,3mm, à velocidade de agitação de 2000rpm.

4.3.3. Incorporação de colesterol

As análises de microcalorimetria das partículas que continham em sua formulação colesterol (experimentos 41 e 42), assim como das partículas secas obtidas a partir do experimento 31 (sem colesterol), hidratadas sob agitação rotatória, são apresentadas na Figura 27. Pode-se observar que as temperaturas de transição de fases foram semelhantes, variando de 51,1 a 52,8°C. Também se pode observar que a energia necessária para a transição de fases diminuiu com o aumento da quantidade de colesterol incorporada. Estes resultados eram esperados, visto que a presença do colesterol em concentrações abaixo de 30% não altera a temperatura de transição de fases, mas sim a energia necessária para a transição de fases, que sofre um decréscimo diretamente proporcional à quantidade de colesterol incorporada.

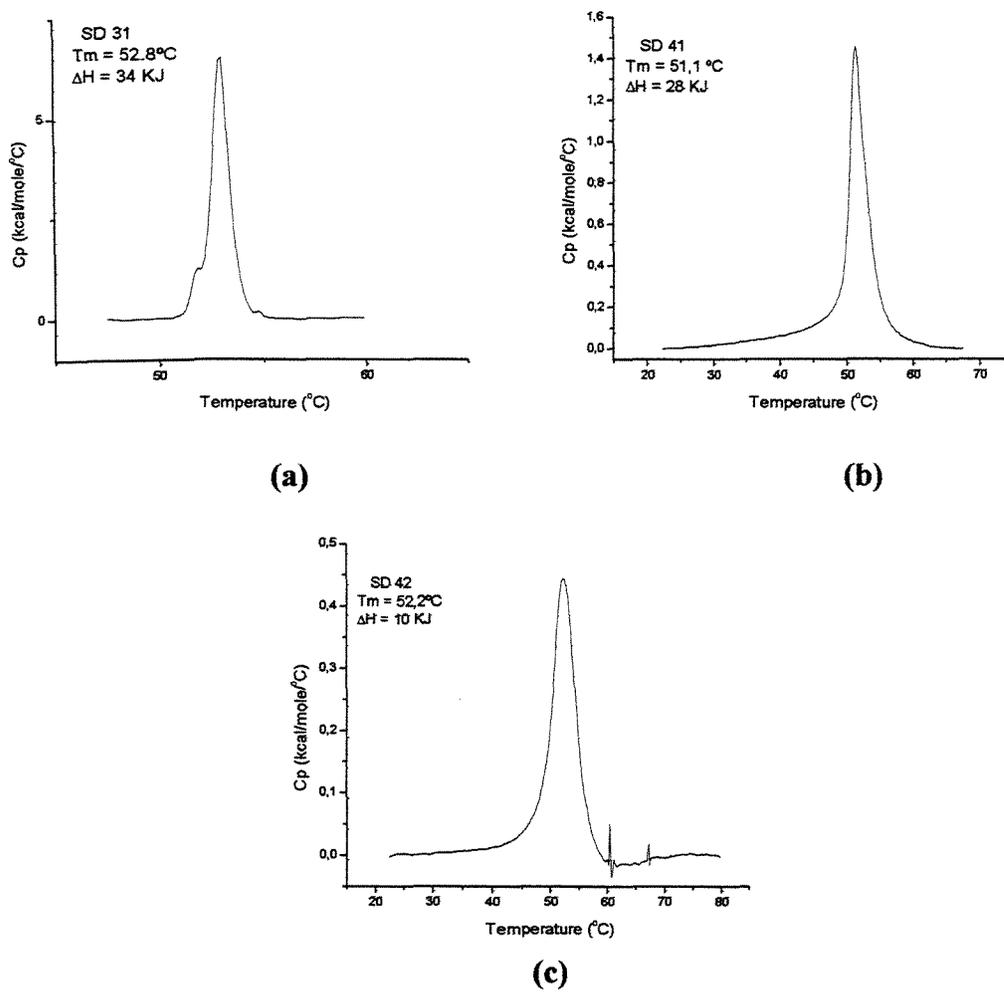


Figura 27: Análise de microcalorimetria de lipossomas vazios obtidos a partir da hidratação das partículas secas referentes aos experimentos (a) 31, (b) 41 e (c) 42.

5. INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE PRIMEIRO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE EM PARTÍCULAS SÓLIDAS E LIPOSSOMAS

5.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1.1. *A tuberculose e a sua incidência atual*

Dentre as doenças infecciosas, destaca-se o ressurgimento internacional da tuberculose, considerada a principal causa de morte devido a um único microorganismo. A magnitude do problema é tal que a Organização mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose como emergência mundial em 1993. Anualmente, no mundo todo, das 8 milhões de pessoas que desenvolvem a doença, 3 milhões morrem, e estima-se que um terço da população mundial esteja infectada mas não desenvolva a doença (pacientes assintomáticos). A tuberculose também tem se tornado uma importante doença oportunística em locais com alta incidência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) [O'Hara e Hickey, 2000].

A tuberculose é uma doença contagiosa, transmitida de pessoa para pessoa, através do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* presente no ar, geralmente quando um paciente com a doença ativa tosse, espirra, escarra ou fala. A bactéria inalada multiplica-se no pulmão, mas, na maioria dos casos, o sistema imune da pessoa infectada detém o espalhamento da infecção. O bacilo pode então permanecer dormente durante muitos anos, somente sendo reativado quando ocorrem danos ao pulmão. Nesse caso há o aparecimento de cavidades nos pulmões, com a formação de pus. Os vasos sanguíneos danificados muitas vezes se rompem, preenchendo a cavidade dos pulmões com sangue, causando a tosse acompanhada de sangramento, muito comum nos pacientes. Outros sintomas comuns da doença são dor no peito, falta de ar, febre baixa principalmente à tarde, perda de peso, falta de apetite, suores noturnos e fraqueza. A tuberculose pode ainda se espalhar quando o organismo está enfraquecido e as defesas imunológicas são vencidas, podendo afetar ainda outros órgãos, tais como rins e cérebro.

Oito entre dez pessoas atingidas pela tuberculose estão na idade economicamente ativa, na faixa etária de 15 a 59 anos, e 95% dos doentes estão nos países em

desenvolvimento, sendo as regiões mais afetadas o sudeste asiático, o oeste do Pacífico e a África. Para agravar a situação, a tuberculose formou uma parceria letal com o vírus da AIDS, o HIV. O HIV danifica as defesas naturais do organismo, o sistema imune, e acelera a velocidade de progressão da tuberculose de uma infecção inofensiva para uma ameaça mortal [Ruffino Netto, 1998].

Outro problema associado à tuberculose é a emergência de classes de microorganismos resistentes às drogas existentes. Isto ocorre em geral devido ao abandono do tratamento. Aliado a isso o aumento do uso de agentes antimicrobianos, muitas vezes em doses sub-terapêuticas e algumas vezes na forma falsificada, com níveis incorretos de ingredientes ativos, indicam que este problema tende a aumentar no futuro.

A melhor forma de combate à tuberculose é a sua detecção precoce e cura. O diagnóstico da doença é bem simples, e é realizado através do exame físico feito pelo médico, exame de escarro e radiografia dos pulmões. Como já citado, uma das razões das falhas no tratamento da tuberculose é o seu abandono pelos pacientes. Por isso, a OMS recomenda que todos os países adotem a estratégia conhecida como “tratamento diretamente observado de curta duração”, ou DOTS (“directly-observed treatment, short course”). Esta estratégia combina cinco elementos: compromisso político dos governos, descoberta dos casos pela baciloscopia do escarro, observação direta da tomada da medicação, suprimento regular dos remédios e monitoração sistemática. Esta estratégia está apresentando um sucesso marcante em vários países [WHO, 1996; Ruffino Netto, 2000; Klautt, 1996; Nakajima, 1996].

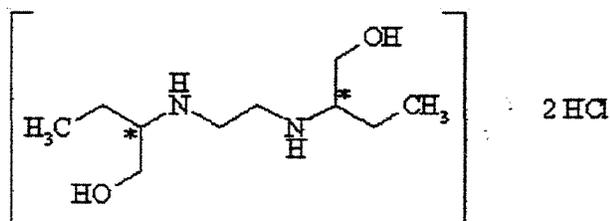
5.1.2. Fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose

Os fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose são: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol [Ruffino Netto, 1998]. A Figura 28 apresenta as fórmulas estruturais, empíricas e as massas molares destes tuberculostáticos.

Etambutol

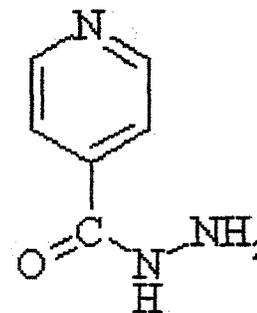
Fórmula química: $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$

Massa molar: 277,2g/mol

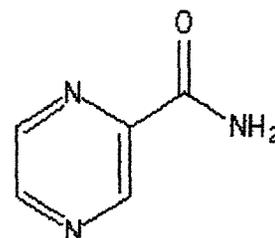


IsoniazidaFórmula química: $C_6H_7N_3O$

Massa molar: 137,1g/mol

**Pirazinamida**Fórmula química: $C_5H_5N_3O$

Massa molar: 123,1g/mol

**Rifampicina**Fórmula química: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$

Massa molar: 823g/mol

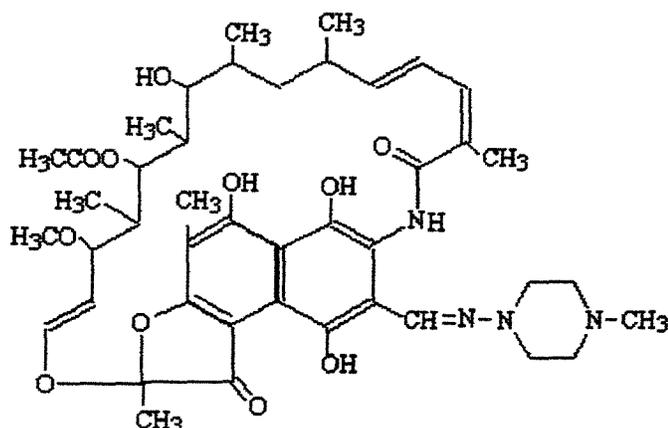


Figura 28: Fórmulas estruturais, empíricas e massas molares dos fármacos de primeiro tratamento da tuberculose.

A Isoniazida é altamente específica para o *M. tuberculosis* e apresenta pouca ou nenhuma atividade sobre as outras bactérias. É bactericida e atua por inibição da síntese de ácidos micólicos na parede celular, sendo facilmente absorvida quando administrada por via oral, mas pode apresentar sérios efeitos colaterais, inclusive danos ao fígado. A dose

diária recomendada é de 5mg/Kg do paciente, sendo a dosagem máxima de 300mg. A solubilidade da Isoniazida é de 14g/100mL de água deionizada de pureza Milli-Q, e de 12g/100mL de tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4). Seu coeficiente de partição em sistemas 1-octanol ou n-dodecano/tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4) é de 0,298 e 0,009, respectivamente, o que sugere a sua localização no meio aquoso da estrutura dos lipossomas [www.hopkins-tb.org/treatment_disease/disease_2.shtml; www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo; Lima, 2001].

A Pirazinamida foi introduzida em 1952, sendo seu mecanismo de ação desconhecido. Entretanto, sabe-se da necessidade de pH ácido para sua atividade bactericida no interior de vesículas citoplasmáticas ou lisossomas. A dose diária recomendada é de 15-30mg/Kg do paciente, sendo a dosagem máxima de 2g. O efeito colateral mais comum associado a este fármaco é a dor nas juntas. A solubilidade da Pirazinamida é de 3g/100mL de água deionizada de pureza Milli-Q, e de 1g/100mL de tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4). Seu coeficiente de partição em sistemas 1-octanol ou n-dodecano/tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4) é de 0,156 e 0,015, respectivamente, o que sugere a sua localização no meio aquoso da estrutura dos lipossomas [www.hopkins-tb.org/treatment_disease/disease_2.shtml; www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo; Lima, 2001].

O Etambutol é um fármaco efetivo e específico com atividade bacteriostática. Não apresenta nenhum efeito sobre a viabilidade e metabolismo de células que não estejam em crescimento. A dose diária recomendada é de 15-25mg/Kg do paciente, sendo a dosagem máxima de 1,5g. A solubilidade do Etambutol é de 85g/100mL tanto em água deionizada de pureza Milli-Q quanto em tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4) [www.hopkins-tb.org/treatment_disease/disease_2.shtml; www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo; Lima, 2001].

A Rifampicina tem caráter lipofílico e é de grande importância na quimioterapia da tuberculose, pois reduz o tempo de tratamento da doença. Ela é ativa contra o *M. tuberculosis*, *M. leprae* e várias outras espécies de microorganismos patogênicos. A dose diária recomendada para o tratamento da tuberculose é de 10mg/Kg do paciente, sendo a dosagem máxima de 600mg [www.hopkins-tb.org/treatment_disease/disease_2.shtml; www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo; Lima, 2001].

A toxicidade de fármacos como Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida foi determinada há duas décadas, e embora consideradas altamente tóxicas, ainda são atualmente os fármacos mais usados para o tratamento da infecção. Com isso, tem-se buscado o desenvolvimento de novas formas de administração dos medicamentos de ação já comprovada, de modo a proporcionarem melhores resultados terapêuticos. Esta estratégia possui a menor relação custo/benefício, quando comparada ao desenvolvimento de novas drogas. Dentro desta estratégia, uma alternativa é a incorporação/encapsulação dos medicamentos de ação comprovada em partículas lipídicas sólidas ou em lipossomas, visando contornar os problemas citados, aumentar o índice terapêutico e produzir liberação controlada das drogas [Lasic, 1993]. Dentro deste contexto, alguns estudos foram feitos sobre a encapsulação de drogas para o tratamento da tuberculose em lipossomas e sobre a encapsulação de rifampicina em microesferas, que serão descritos a seguir.

5.1.3. Efeitos “in vivo” e “in vitro” de tuberculostáticos encapsulados

O efeito da incorporação da rifampicina em microesferas respiráveis de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) foi estudado por O'Hara e Hickey [2000]. As partículas foram produzidas através dos métodos de evaporação do solvente ou secagem por atomização, em ambos os casos com diâmetros aerodinâmicos na faixa aceitável para administração pulmonar (<5µm). Partículas nesta faixa de tamanho se depositam nos pulmões e são fagocitadas pelos macrófagos, que é o principal local infectado pelo bacilo *M. tuberculosis*. Assim, a administração de tuberculostáticos incorporados em microesferas poliméricas biodegradáveis, na forma de aerossol, pode ser feita diretamente nos pulmões, melhorando a eficácia do tratamento da tuberculose. As partículas preparadas através da evaporação do solvente apresentaram um formato esférico e uma eficiência de incorporação do fármaco máxima de 45%. As partículas preparadas por secagem formaram estruturas heterogêneas, com uma eficiência de incorporação de 100%. A porcentagem média de fármaco liberado em tampão fosfato (pH fisiológico 7,4) durante 24 horas foi de 34 e 77% para as partículas preparadas através de evaporação do solvente e secagem, respectivamente. Taxas de liberação do fármaco menores foram obtidas a um pH de 5,2, o qual corresponde ao pH endossômico dos macrófagos alveolares.

O efeito da encapsulação de tuberculostáticos em lipossomas foi estudado por alguns grupos. Em 1982, Vladimírski e Lavigina trataram camundongos infectados com o bacilo *M. tuberculosis* com a encapsulação de estreptomicina em lipossomas de diâmetro entre 40 e 80nm. Foi observado que o tratamento com lipossomas foi mais efetivo no prolongamento do tempo de vida dos animais se comparado com a droga livre, além da redução do número de organismos no baço, mas não nos pulmões.

Em 1994, Koga e colaboradores observaram uma maior eficácia no tratamento da tuberculose através da encapsulação das drogas estreptomicina e aminacina em lipossomas, se comparado com as drogas livres. Neste mesmo ano, Agarwal e colaboradores encapsularam rifampicina em lipossomas constituídos de fosfatidilcolina do ovo. A administração dos lipossomas duas vezes por semana foi mais efetiva na redução do número de bacilos localizados no pulmão de camundongos que o tratamento contínuo, levando ao aumento de pelo menos 2000 vezes em relação à droga livre.

Kurunov e colaboradores [1995] usaram camundongos para a inalação de agentes bactericidas livres e encapsulados em lipossomas. Foi observado que uma maior eficiência no tratamento da doença foi obtida através da inalação diária de lipossomas com as drogas.

Em 2001 Lima estudou, através de testes *in vitro*, a susceptibilidade de três linhagens de *M. tuberculosis* aos lipossomas encapsulando as drogas pirazinamida, isoniazida e etambutol, e aos respectivos complexos em β -ciclodextrina. A avaliação foi feita através do método indireto de susceptibilidade de droga a partir de subculturas de três culturas primárias como inóculo [Vespal, 1981; Strong e Kubica, 1981]. O objetivo deste ensaio foi comparar o crescimento das linhagens quando em presença das drogas na forma livre ou complexadas em β -ciclodextrina nas condições mínimas inibitórias de crescimento (MIC – “minimum inhibitory concentration”). Os resultados indicaram que a ação das drogas ao bacilo é independente da encapsulação em β -ciclodextrina ou em lipossomas, tanto do tipo convencional quanto estericamente estabilizado.

5.1.4. Modelos difusionais para a liberação controlada de medicamentos

O entendimento da matemática envolvida na difusão de compostos encapsulados em partículas esféricas é de fundamental importância para a área farmacêutica, visto que formulações líquidas, sólidas, cremosas, etc, contêm partículas esféricas, e a taxa de

liberação do composto ativo depende da taxa de liberação das esferas individuais. Além das partículas sólidas, estudos da literatura têm demonstrado o potencial dos lipossomas como agentes de liberação de fármacos e, devido a sua geometria esférica, os modelos de liberação são similares aos obtidos para esferas sólidas. Assim, expressões matemáticas têm sido derivadas para descrever as taxas de liberação de fármacos de compartimentos esféricos. Guy e colaboradores [1982] aplicaram o modelo difusivo expresso pela Lei de Fick para esferas porosas para descrever os perfis de liberação de compostos do interior de lipossomas. Os experimentos que usavam sacos de diálise para a separação dos lipossomas e o meio de dissolução foram considerados sistemas multifásicos, de acordo com os ensaios conduzidos para o estudo de liberação de compostos. Foram obtidas equações matemáticas para períodos de tempo curtos e longos, considerando ou não o limite de fases, ou seja, a transferência de massa na interface da membrana de diálise. Na Tabela 16 são apresentadas as soluções das equações diferenciais para as várias situações.

Tabela 16: Soluções para a equação diferencial da segunda Lei de Fick para o modelo teórico de Guy e colaboradores [1982], para a taxa de liberação de fármacos de partículas esféricas com o seu limite de fases.

Equação	Aplicação
$M_t/M_\infty = 6\pi^{-1/2}kt^{1/2}$ $M_t/M_\infty = (1 - (6/\pi^2) \exp[-\pi^2kt])$	<p>A. Difusão em uma esfera desconsiderando a resistência na membrana interfacial:</p> <p>(1) aproximação para período curto</p> <p>(2) aproximação para período longo</p>
$M_t/M_\infty = 3Kkt$ $M_t/M_\infty = (1 - \exp[-3Kkt])$	<p>B. Difusão de uma esfera considerando a resistência na membrana interfacial:</p> <p>- baixa cinética interfacial ($k \ll 1$)</p> <p>(3) aproximação para período curto</p> <p>(4) aproximação para período longo</p>

Comparando os resultados obtidos pelas várias equações, os autores concluíram que para valores de constante de difusividade da droga menores que 1 ($k < 1$), os efeitos do limite de fases são significativos. Para valores de $k > 1$ a contribuição cinética interfacial sobre as características de liberação dos compostos pode ser desprezada.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. *Material*

- Fosfatidilcolina natural da soja, purificada, hidrogenada, adquirida da Lucas Meyer: Epikuron 200SH;
- Hepes, colesterol e os fármacos Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol adquiridos da Sigma Chemical Co.;
- Clorofórmio, peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico P.A. adquiridos da Merck;
- Álcool etílico, álcool metílico, cloreto de sódio P.A. e manitol adquiridos da Synth;
- Molibdato de amônio adquirido da Ecibra;
- Ácido sulfúrico P.A. adquirido da Erich Ltda.;
- Água bidestilada e deionizada em sistema milli-Q.

5.2.2. *Métodos*

5.2.2.1. **Incorporação dos fármacos em partículas sólidas**

A incorporação foi feita nas estruturas mais cristalinas preparadas através da secagem por atomização sob as condições operacionais: concentração de lipídio de 85mM, concentração de fármaco de 14mM, vazão da solução de alimentação de 20mL/min, temperatura de entrada do ar de $90 \pm 5^\circ\text{C}$, com 42mM de manitol (experimento 35, relação mássica de lipídio/manitol/fármaco de 87/10/3) ou sem manitol (experimento 45, relação mássica lipídio/fármaco de 97/3); e nas estruturas mais amorfas preparadas através da

secagem por atomização sob as condições operacionais: concentração de lipídio de 45mM, concentração de fármaco de 8mM, vazão da solução de alimentação de 3mL/min, temperatura de entrada do ar de $90\pm 5^{\circ}\text{C}$, concentração de manitol de 23mM (experimento 37, relação mássica de lipídio/manitol/fármaco de 87/10/3). Ensaio adicionais foram feitos sob as condições descritas para o experimento 37, com variação na concentração de Isoniazida, de 15mM e 30mM (experimentos 49 e 50, relação mássica de lipídio/manitol/fármaco de 85/10/5 e 81/10/9, respectivamente). Além da numeração dos experimentos, foram adicionadas as letras “i”, “p” ou “e” para os ensaios feitos com os fármacos Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol, respectivamente.

5.2.2.1.1. Caracterização das partículas

As partículas foram caracterizadas quanto a sua cristalinidade, morfologia, transição de fases, concentração de lipídio final, diâmetro geométrico e aerodinâmico e distribuição de tamanhos, conforme descritos anteriormente nos itens (3.2.2.8.6), (3.2.2.8.7), (3.2.2.8.8), (3.2.2.8.1), (3.2.2.8.2) e (3.2.2.8.3).

5.2.2.1.2. Concentração total dos fármacos (F_F)

Para a quantificação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida, foi adicionado 0,3mL da dispersão de lipossomas à 2,7mL de etanol e, após 2 horas de repouso, eram determinadas as absorvâncias das soluções à 260nm. A partir das curvas de calibração (Anexo I), feitas com soluções padrões dos fármacos em etanol, as quais fornecem uma relação entre a concentração do fármaco e a absorvância, foram determinadas as concentrações dos tuberculostáticos nas amostras (F_F).

Para o caso particular do fármaco Etambutol houve dificuldades quanto à precisão e reprodutibilidade dos resultados na sua determinação quantitativa usando o método indicado pela Farmacopéia. Assim, a sua utilização ficou limitada nos ensaios de incorporação, encapsulação e liberação.

5.2.2.1.3. Eficiência de incorporação

A incorporação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida nas partículas sólidas foi calculada através das razões mássicas finais e iniciais dos fármacos e do lipídio (F_f , F_0 , L_f e L_0). Como massas iniciais foram usadas as massas utilizadas na solução de alimentação do processo de secagem por atomização. A massa final de lipídio foi quantificada através do método descrito no item (3.2.2.8.1), e a massa final do fármaco através do ensaio espectrofotométrico (item 5.2.2.1.2). Assim, a eficiência de incorporação (E_I) foi calculada através da Equação 8:

$$E_I = \left[\frac{(F_f / L_f)}{(F_0 / L_0)} \right] * 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

5.2.2.1.4. Liberação dos fármacos

Os ensaios de liberação de Isoniazida e Pirazinamida foram feitos utilizando sacos de diálise Inlab (tipo envelope) com diâmetro de corte de 20Kda como membrana de separação entre a amostra sólida e o meio aquoso. Todos os ensaios foram feitos com uma massa de sólidos correspondente a uma solução 0,06mM de fármaco, e o meio aquoso composto de 300mL de solução tampão HEPES/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4 ou 5,2. A avaliação da liberação do fármaco foi feita com este em sua forma livre, com uma mistura física do fármaco, Epikuron 200SH e manitol, e com o fármaco incorporado nas partículas produzidas através de secagem (experimentos 35, 37, 45 e 50). As amostras sólidas eram colocadas em um saco de diálise, o qual era imerso no meio aquoso mantido a 37°C e sob agitação. Foram retiradas alíquotas de 3mL nos tempos: 0, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 horas. O fármaco liberado foi quantificado através da leitura direta em espectrofotômetro a 260nm, utilizando curva de calibração previamente construída (curva de calibração sem etanol encontra-se no Anexo I).

A permeação dos fármacos através das partículas foi representada matematicamente pelo modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas, descrito pela lei de Fick. No modelo, não foram consideradas as limitações interfaciais impostas pela membrana de diálise usada nos experimentos.

Em coordenadas esféricas e considerando somente a difusão na direção do raio das partículas, tem-se a equação (9) para representar o modelo:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \frac{\partial c}{\partial t} \quad (\text{Eq. 9})$$

A equação (9) foi resolvida considerando as seguintes condições de contorno:

$$\text{cc1} \rightarrow (\text{condição inicial}) \ t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad c(r,t) = c_{\text{int}}$$

$$\text{cc2} \rightarrow t > 0, \quad t > 0, \quad r = R \quad c(R,t) = c_{\infty} = 0$$

$$\text{cc3} \rightarrow c(r,t) \text{ é um valor finito para } 0 \leq r \leq R$$

A solução da equação (9) é uma série de Fourier de senos, a qual fornece a seguinte expressão para o perfil de concentração no interior das partículas representada pela equação (10):

$$c(r,t) = -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp \left[- \left(\frac{n\pi}{R} \right)^2 Dt \right] \frac{\text{sen} \left(\frac{n\pi r}{R} \right)}{\left(\frac{n\pi}{R} \right)} \quad (\text{Eq. 10})$$

A quantidade total do soluto difundido no solvente (considerando N partículas) é representada pela equação (11):

$$c(t) = N \int_0^R c(r,t) 4\pi r^2 dr = N \left[-2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp \left[- \left(\frac{n\pi}{R} \right)^2 Dt \right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \frac{\text{sen} \left(\frac{n\pi r}{R} \right)}{r} 4\pi r^2 dr \right] \quad (\text{Eq. 11})$$

De onde o perfil de concentração em função do tempo pode ser calculado pela equação (12):

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 12})$$

Expressando esse perfil em termos do fármaco liberado na solução, que é a variável medida experimentalmente, tem-se:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{c(t)}{c_{\text{int}}}, \quad \text{logo:}$$

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde $c^*(t)$ é a concentração do fármaco difundida para o meio aquoso num tempo “ t ”, c_{int} a quantidade liberada após um tempo infinito, o que corresponde à quantidade total de fármaco incorporado nas partículas no instante inicial do experimento, e “ k ” é a razão (D/R^2) , onde “ D ” é o coeficiente de difusão do fármaco na estrutura e “ R ” o raio das partículas. O detalhamento da dedução matemática do modelo é apresentado no Anexo II.

A partir do modelo proposto e dos dados experimentais obtidos foi ajustado o parâmetro de difusão “ k ” pelo método da máxima verossimilhança, utilizando um software desenvolvido por Leonardo Machado de Rosa e José Roberto Nunhez (L-CPD/FEQ/Unicamp - maiores detalhes do método podem ser obtidos no site: www.feq.unicamp.br/~nunhez/download/19313/19313.pdf). Neste método as incertezas de todas as medidas experimentais são levadas em conta no ajuste.

Os dados ajustados referem-se ao modelo de difusão e consiste matematicamente em uma função representada por uma série, onde o parâmetro a ser obtido, “ k ”, pertence a todos os termos dessa série, que varia de um a infinito. Obviamente o número de termos da série é um valor, que para propósitos práticos representa o valor exato da função. Desta forma utilizou-se 1000 termos da série. Este valor foi muito maior que o necessário, visto que após algum tempo ocorria a convergência da série, bastando apenas o primeiro termo para representar a função. O único ponto crítico é quando “ t ” tende a zero. Neste caso a série apresenta problemas de oscilação. Entretanto, no limite quando “ t ” tende a zero, a série é representada pela função:

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 3 \left(\frac{2(kt)^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}} - kt \right) \quad (\text{Eq. 14})$$

Deve-se notar que a equação (14) é a própria série do limite de “ τ ” tendendo a zero, e não uma aproximação da mesma conforme Guy e colaboradores [1982].

O coeficiente de permeabilidade das microestruturas, “ P ”, é definido pela razão entre o fluxo “ J ” e a diferença de concentração entre as soluções interna e externa, “ Δc ”.

$$P = \frac{J}{\Delta c} \quad (\text{Eq. 15})$$

Em termos da constante “ k ” usada no modelo (eq. 13), a permeabilidade pode ser expressa considerando o comprimento característico de uma esfera, ou seja, a razão V/A :

$$P = \frac{kV}{A} \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde “ V ” e “ A ” são o volume e a área superficial das partículas, respectivamente. Nos cálculos, considerou-se o diâmetro principal das partículas sólidas.

5.2.2.1.5. Determinação dos parâmetros do modelo de encapsulação utilizando-se o método da máxima verossimilhança

A obtenção dos parâmetros a partir do método da máxima verossimilhança segue o modelo descrito a seguir.

Dado um conjunto de N pontos experimentais (X_i, Y_i) , que se supõe ser representado por um modelo do tipo $F(x, y; a_1, \dots, a_p) = 0$, o objetivo do método é a determinação dos parâmetros a_j do modelo bem como os valores médios de x_i e y_i . Assume-se que tanto a variável dependente como a independente estão sujeitas a erros experimentais de distribuição Normal e desvio padrão $(\sigma_{x_i}, \sigma_{y_i})$.

O ajuste é feito pela minimização da função S dada pelas equações (17) a (20):

$$S = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [W_{X_i} \varepsilon_{X_i}^2 + W_{Y_i} \varepsilon_{Y_i}^2] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [\dots W_{X_i} (X_i - x_i)^2 + W_{Y_i} (Y_i - y_i)^2] = \text{mínimo} \quad (\text{Eq. 17})$$

$$W_{X_i} = \frac{1}{\sigma_{X_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 18})$$

$$W_{y_i} = \frac{1}{\sigma_{y_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 19})$$

$$F = (x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad (\text{Eq. 20})$$

A minimização da função S, sujeita a N restrições $F=0$, requer o uso de multiplicadores de Lagrange λ_i (equações 21-24):

$$\left(\frac{\partial S}{\partial a_j} \right) + \sum_{i=1}^N \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial a_j} \right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (\text{Eq. 21})$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 22})$$

$$\left(\frac{\partial S}{\partial x_i} \right) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 23})$$

$$\left(\frac{\partial S}{\partial y_i} \right) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 24})$$

Considerando S independente (explicitamente) dos parâmetros a_j : $\left(\left(\frac{\partial S}{\partial a_j} \right) = 0 \right)$ e considerando que cada ponto (x_i, y_i) é independente dos demais $\left(\left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i} \right) = \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i} \right) = 0, i \neq j \right)$, o sistema de equações (21-24) toma a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial a_j} \right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (\text{Eq. 25})$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 26})$$

$$-W_{y_i}(Y_i - y_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 27})$$

$$-W_{x_i}(X_i - x_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 28})$$

Para o caso de modelos, o sistema de equações (25-28) pode ser colocado na forma explícita, $F(x, y; a_1, \dots, a_p) = y - f(x; a_1, \dots, a_p) = 0$, que reescritas tomam a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \left(\frac{\partial f_i}{\partial a_j} \right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (\text{Eq. 29})$$

$$y_i - f(x_i; a_1, \dots, a_p) \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 30})$$

$$\varepsilon_{y_i} - \sum y \lambda_i = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 31})$$

$$\varepsilon_{x_i} + x \lambda_i \left(\frac{\partial f_i}{\partial X_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 32})$$

O sistema de equações para a determinação de funções implícitas em relação aos parâmetros (equações 25-28) ou explícitas em relação aos parâmetros (equações 29-32) sempre leva à resolução de um sistema de equações não linear [Draper e Smith, 1981], mesmo que o modelo seja tão simples como uma reta, contendo apenas o coeficiente angular como parâmetro a ser determinado [www.feq.unicamp.br/~nunhez/download/19313/19313.pdf].

5.2.2.2. Encapsulação dos fármacos em lipossomas

5.2.2.2.1. Hidratação do filme seco de lipídios

Os lipossomas foram preparados como descrito previamente no item (4.2.2.1), com a mesma finalidade de comparação das suas propriedades com os preparados com fosfolípidios sintéticos [Lima, 2001]. Neste caso as soluções de hidratação eram soluções dos fármacos em tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4.

Separação do fármaco não encapsulado

O fármaco não encapsulado foi separado da dispersão de lipossomas através da técnica de ultrafiltração. A célula de ultrafiltração utilizada era da Amicon, modelo 50, com volume de 50mL, e pressão de trabalho de até 5Kgf/ cm². A membrana de filtragem era de polietileno, da Microporetics, do tipo XM50, com diâmetro de corte de 50.000Da. Inicialmente a célula era preenchida com 20mL de tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4. A amostra era então colocada e o tampão adicionado até completar o volume de 50mL. A ultrafiltração tinha início, sob agitação constante e à pressão de 3Kgf/ cm². Quando o volume era reduzido a 10mL, a ultrafiltração era interrompida e a célula era novamente preenchida com tampão até o volume de 50mL. Iniciava-se uma adicional ultrafiltração e quando o volume era reduzido a 10mL a amostra era retirada, o volume era medido e armazenado para posterior caracterização.

5.2.2.2.2. Hidratação das partículas produzidas através de secagem por atomização

As partículas secas foram hidratadas com solução tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4 ou com uma solução 1mM de Isoniazida em tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4. O produto seco foi hidratado de duas formas: através de agitação rotatória ou através de agitação mecânica. Na hidratação com agitação rotatória o produto seco foi colocado em um balão de fundo redondo (massa correspondente à concentração de 5 a 7mM), onde foi adicionada a solução tampão ou a solução de Isoniazida 1mM, e o balão foi mantido sob rotação, a 65°C, por 30 minutos. A hidratação com agitação mecânica foi feita em duas etapas. Inicialmente uma quantidade de partículas secas era colocada em um béquer encamisado, mantido a 65°C, e era adicionado tampão em volume

correspondente a formação de fase lamelar plana (menos de 30%). A mistura com consistência pastosa era mantida sob agitação a 100rpm durante 15 minutos com um agitador do tipo âncora (Figura 23(a)). Posteriormente, o restante do volume aquoso tamponado era adicionado (volume final de 30mL), e tinha início a segunda etapa da agitação, para a obtenção de fase lamelar com excesso de água, e formação dos lipossomas. Foi utilizado agitador de alto cisalhamento Kroma, com furos de diâmetro de 0,3mm e velocidade de agitação de 2000rpm por 1h.

Separação do fármaco não encapsulado

O fármaco não encapsulado foi separado dos lipossomas através de centrifugação. Dispersões de lipossomas foram centrifugadas a 3000rpm, por 30 minutos. O sobrenadante, fármaco não encapsulado, foi separado e armazenado para posterior quantificação. O precipitado era então ressuspensão em tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) para a formação dos lipossomas, contendo somente o fármaco encapsulado.

5.2.2.3.3. Caracterização dos lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados quanto a concentração final de lipídios (L_F) e dos fármacos (F_F), medidas de diâmetro médio e distribuição de tamanhos e transição de fases, conforme descrito anteriormente nos itens (4.2.2.3.1), (5.2.2.1.2), (4.2.2.3.2), (4.2.2.3.3).

Estabilidade das vesículas na presença do tensoativo não iônico $C_{12}E_5$

Foi avaliada a estabilidade dos lipossomas vazios ou com os fármacos encapsulados na presença do tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ através das mudanças conformacionais sofridas pelas vesículas sob a ação do tensoativo, monitoradas por medidas de turbidez total das soluções a 340nm.

Os experimentos para a determinação da turbidez total das soluções foram feitos em placas de microtitulação de poliestireno da Corning Inc., com 96 poços de fundo redondo de 200 μ L, usando leitora de placas do tipo Elisa “Microtiter plate reader”, modelo Elx808, da Bio-Tek Instruments Inc.. As medidas foram feitas a 340nm, a temperatura ambiente,

em estado de pseudo-equilíbrio, 2 horas após o início da ação do tensoativo sobre as vesículas, com agitação branda por 3 segundos para a homogeneização antes da leitura. A cada um dos poços da placa foram adicionados 120µL de soluções estoque do tensoativo C₁₂E₅ dissolvidos em tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM) em concentrações na faixa de 3 a 96%, a 80µL de lipossomas a 2,5mM, de forma que após a mistura a concentração final da dispersão lipídica fosse 1mM. A porcentagem de tensoativo nas soluções foi definida como a razão entre o número de moles de tensoativo e o número de moles total da solução, conforme a equação 33:

$$\%tensoativo = \left[\frac{n_T}{n_T + n_L} \right] * 100 \quad (\text{Eq. 33})$$

Onde: n_T é o número de moles do tensoativo e n_L é o número de moles da dispersão lipídica.

As amostras foram analisadas em duplicata e os valores médios das absorbâncias de cada amostra foram subtraídos das soluções de mesma concentração de tensoativo na presença de tampão, sem a dispersão de lipossomas (branco). Assim, as soluções “branco”(br) eram constituídas de 120µL de solução de tensoativo e 80µL de solução tampão em substituição ao mesmo volume de solução de lipossomas. Os resultados foram analisados em termos dos perfis de absorbância versus concentração de tensoativo.

Desempenho da encapsulação

O desempenho da encapsulação foi determinado através dos perfis que relacionam as razões fármaco/lipídio inicial e final (encapsulado) e pelo parâmetro eficiência de encapsulação (E_E), calculado através da Equação (34):

$$E_E = \left[\frac{(F_e / L)_F}{(F / L)_0} \right] * 100 \quad (\text{Eq. 34})$$

A razão fármaco/lipídio final para os lipossomas preparados através do método de Bangham foi calculada através dos valores obtidos nos itens descritos anteriormente (L_F e F_F - item 5.2.2.1.3). O fármaco final encapsulado nos lipossomas preparados com as

partículas foi calculado pela diferença entre o fármaco total, quantificado antes da separação do fármaco pela centrifugação, e o não encapsulado (sobrenadante do processo de centrifugação).

Liberação dos tuberculostáticos encapsulados nos lipossomas

Os ensaios de liberação dos fármacos foram feitos utilizando sacos de diálise Inlab (tipo envelope) com diâmetro de corte de 20 KDa como membrana de separação entre a amostra e o meio aquoso. Todos os ensaios foram feitos com um volume de 2mL de dispersões de lipossomas, e o meio aquoso composto de 200mL de solução tampão HEPES/NaCl (10mM/120mM) pH 7,4. Os lipossomas foram preparados a partir dos produtos secos referentes aos experimentos 35, 37 e 45, sob agitação rotatória ou mecânica. A avaliação da liberação dos fármacos foi feita com os lipossomas contendo o fármaco encapsulado, separado conforme descrito em (5.2.2.1.2). Os lipossomas eram colocados em um saco de diálise o qual era imerso no meio aquoso mantido a 37°C e sob agitação. Foram retiradas alíquotas de 2mL nos tempos: 0, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 horas. O fármaco liberado foi quantificado através da leitura direta de absorbância a 260nm e utilização de curva de calibração previamente construída (Anexo I).

Os resultados experimentais para a liberação dos fármacos foram analisados considerando o modelo difusivo do composto no interior de esferas sólidas, representado pelos lipossomas, cujo detalhamento matemático é apresentado no item (5.2.2.1.4) e no Anexo II.

A partir do modelo de encapsulação desenvolvido, necessita-se de um modelo de ajuste aos dados experimentais. Neste trabalho foi utilizado o método da máxima verossimilhança (descrito no item 5.2.2.1.5).

5.2.2.3. Produção de partículas sólidas em escala piloto

A produção de partículas sólidas em escala piloto foi feita através de secagem por atomização utilizando equipamento fabricado pela Niro Atomizer (Copenhague, Dinamarca), designado como “Production Minor Spray Dryer”. O equipamento possui dimensões: comprimento 1750mm, largura 1675mm e altura 2500mm, operando com

secagem co-corrente, atomizador rotatório e dois pontos de descarga do produto, na câmara de secagem e no ciclone.

A solução de alimentação foi composta de 45mM de fosfolipídio Epikuron 200SH, 23mM de manitol e 8mM de Isoniazida. A água foi utilizada como solvente, pois o equipamento em escala piloto não possui circuito fechado de alimentação, sendo neste caso não indicado o uso de solventes orgânicos, os quais podem causar explosões. Além disso, seria necessário o uso de um gás inerte como meio de secagem. Devido à utilização da água como solvente, a produção de partículas sólidas foi feita também no secador de bancada, anteriormente descrito no item (3.2.2.2), para comparação entre ambas as escalas, embora os secadores possuam características diferentes, principalmente quanto ao tipo de atomizador e controle da temperatura de saída do ar.

Os volumes de dispersão lipídica alimentados nos equipamentos de escala piloto e laboratório foram respectivamente 4L e 250mL, enquanto a temperatura de entrada do ar foi de 180°C e 200°C. A temperatura de entrada do ar no equipamento de escala laboratório foi maior porque a 180°C não ocorreu a evaporação adequada da água. As vazões foram de 200mL/min e 14mL/min, sendo que em ambos experimentos a solução inicial foi alimentada em 20 minutos.

As partículas sólidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro aerodinâmico, densidade, morfologia, eficiência de incorporação e liberação do fármaco Isoniazida, conforme descrito nos itens (3.2.2.8.3, 3.2.2.8.4, 3.2.2.8.7, 5.2.2.1.3 e 5.2.2.1.4).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

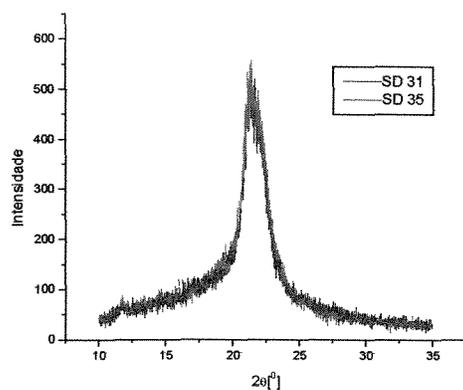
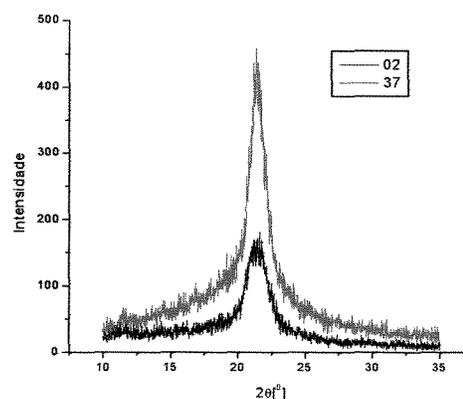
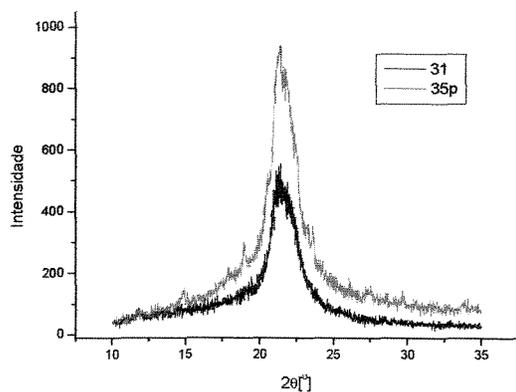
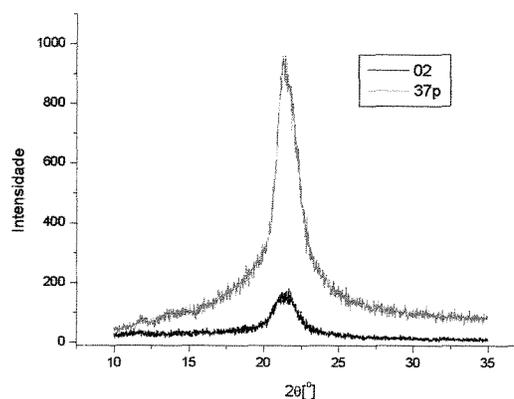
5.3.1. Partículas sólidas

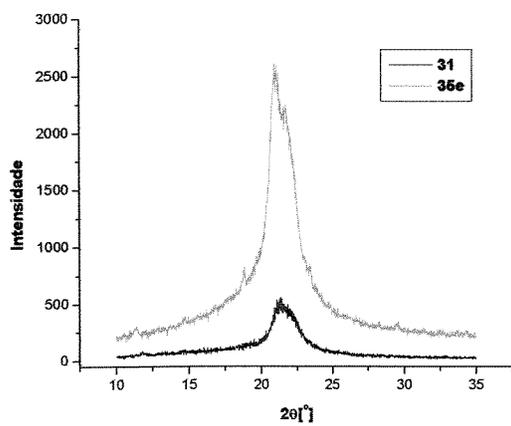
5.3.1.1. Incorporação dos fármacos nos sólidos processados

A incorporação dos fármacos foi analisada através da cristalinidade das amostras, da eficiência de incorporação do fármaco, da morfologia, da transição vítrea e da liberação gradual do fármaco em meio aquoso tamponado.

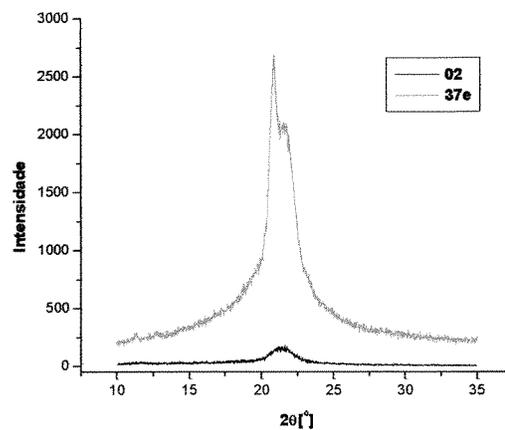
5.3.1.1.1. Cristalinidade

A cristalinidade das amostras foi analisada através de difratogramas de raios-X (Figura 29), em amostras processadas com e sem a adição dos fármacos Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol na solução de alimentação, sob condições operacionais que forneceram anteriormente amostras com diferenças expressivas no grau de cristalinidade (situação mais amorfa (b) e mais cristalina (a)), além da amostra processada sem manitol e com o fármaco Isoniazida (c), com diferentes concentrações de Isoniazida ((d) e (e)) e a Isoniazida pura (f).

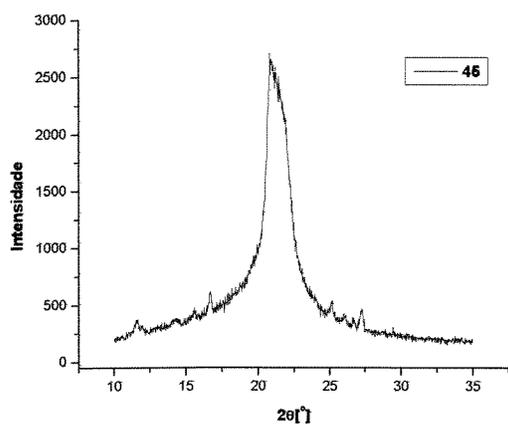
**(a)****(b)****(a)****(b)**



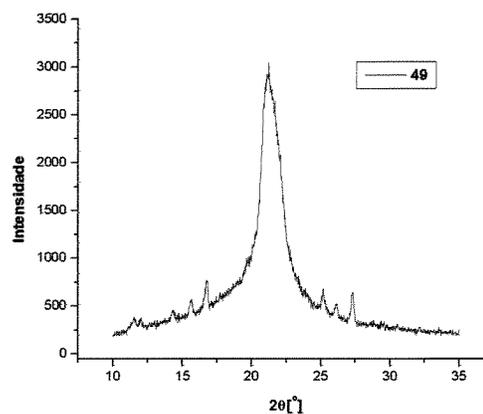
(a)



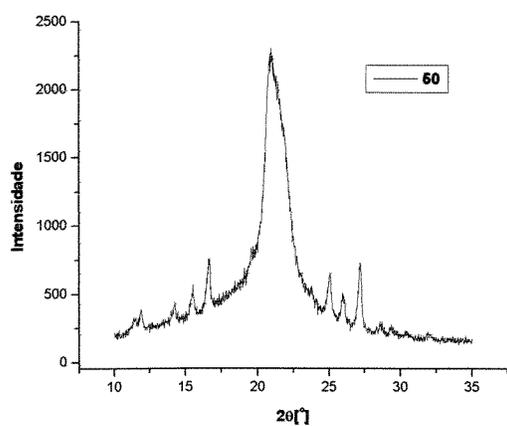
(b)



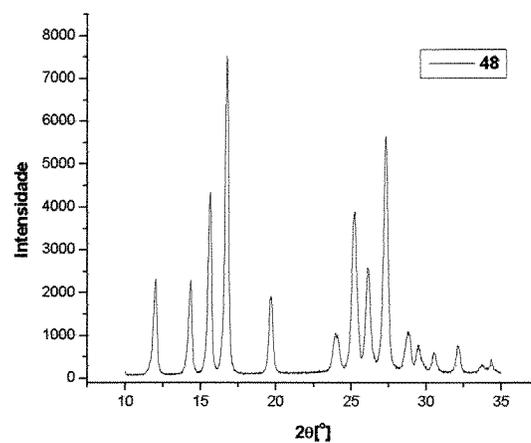
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 29: Difração de raios-X das amostras processadas sob as condições operacionais de secagem: (a) $C_{EpK}=85\text{mM}$, $V=20\text{mL/min}$, $T=90\pm 5^\circ\text{C}$, 30% de manitol; (b) $C_{EpK}=45\text{mM}$,

$V=3\text{mL}/\text{min}$, $T=90\pm 5^\circ\text{C}$, 30% de manitol; ___ (preto) sem os fármacos (experimentos 02 e 31), ___ (vermelho) com Isoniazida (experimentos 35i e 37i), ___ (azul) com Pirazinamida (experimentos 35p e 37p), ___ (verde) com Etambutol (experimentos 35e e 37e); e sob as condições: (c) $C_{\text{EpK}}=85\text{mM}$, $V=20\text{mL}/\text{min}$, $T=90\pm 5^\circ\text{C}$, 14mM de Isoniazida (experimento 45); (d) $C_{\text{EpK}}=45\text{mM}$, $V=3\text{mL}/\text{min}$, $T=90\pm 5^\circ\text{C}$, 30% de manitol e 15mM de Isoniazida (experimento 49); (e) $C_{\text{EpK}}=45\text{mM}$, $V=3\text{mL}/\text{min}$, $T=90\pm 5^\circ\text{C}$, 30% de manitol e 30mM de Isoniazida (experimento 50); (f) Isoniazida (experimento 48).

Para a situação de maior cristalinidade, apresentada na Figura 29 (a), a presença do fármaco Isoniazida não afetou a cristalinidade original da amostra, visto que os espectros foram semelhantes. Na Figura 29 (b), que representa o espectro obtido na situação mais amorfa dentre todos os ensaios, pode-se observar que a adição do fármaco à solução de alimentação conduziu ao aumento na cristalinidade das partículas. Nos casos de incorporação dos fármacos Pirazinamida e Etambutol, em ambas situações as partículas tornaram-se mais cristalinas. Nos experimentos citados (Figuras 29 (a) e (b)), a presença de um pico único nos difratogramas e o aumento da cristalinidade das partículas evidencia a total incorporação dos fármacos nos locais vazios da microestrutura do sólido, conduzindo a uma maior organização. Vale ressaltar que para as mesmas microestruturas lipídicas, os difratogramas obtidos após a incorporação apresentaram cristalinidades decrescentes quando os fármacos foram Etambutol, Pirazinamida e Isoniazida (Figuras 29 (a) e (b)).

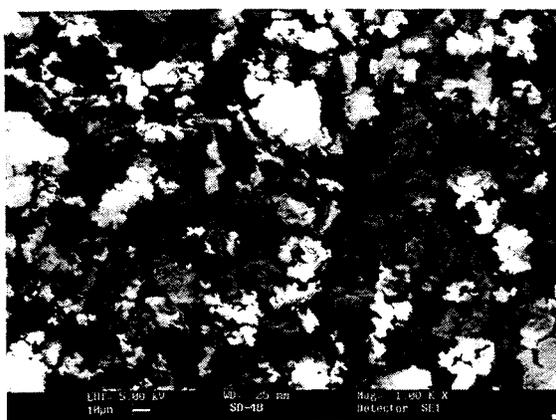
As Figuras 29 (d) e (e) apresentaram picos adicionais ao do fosfolipídio, coincidentes com os picos encontrados no difratograma da Isoniazida pura (Figura 29 (f)), indicando a presença de fármaco não incorporado na estrutura sólida. No caso da Figura 29 (c), observa-se pequenos picos adicionais, que também podem ser atribuídos ao fármaco não incorporado, apesar da concentração mássica do fármaco ser de somente 3%. Foi também verificado que a ausência de manitol nas formulações conduziu ao aumento da cristalinidade dos sólidos (Figura 29 (c)), fato anteriormente observado no item (3.3.4.1).

Estes resultados mostram que para o caso mais cristalino, para uma mesma concentração de Isoniazida (14mM), a incorporação foi total somente com a presença de manitol (42mM) nas estruturas, indicando um melhor ajuste da microestrutura da partícula com relação ao fármaco, e a capacidade de modulação da sua incorporação (Fig. 29 (a) e

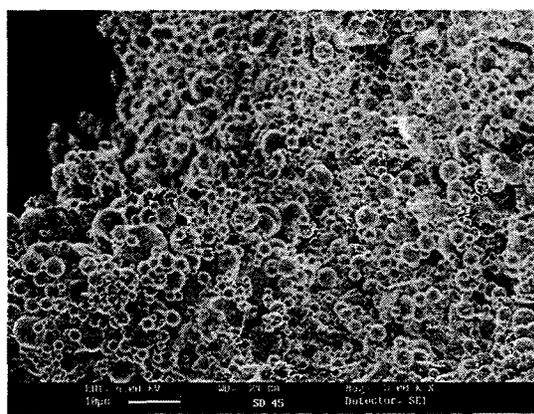
(c)). Para os sólidos classificados como mais amorfos (Fig. 29 (b), (d) e (e)) mantendo-se a mesma proporção mássica lipídio/manitol/fármaco a incorporação foi praticamente total até concentrações em torno de 15mM de Isoniazida, indicando a maior importância do ajuste da microestrutura ao ativo do que mesmo da produção de microestruturas com maior volume de vazios.

5.3.1.1.2. Morfologia e tamanhos

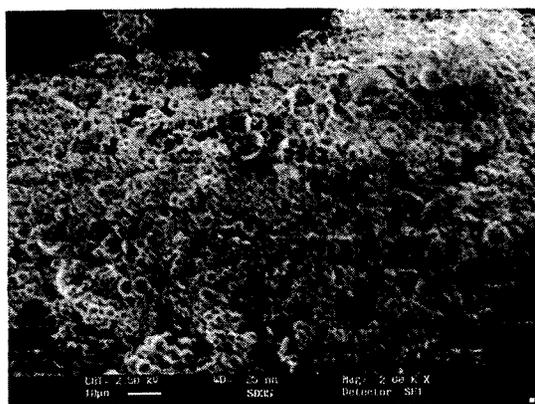
A morfologia das amostras foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 30), em amostras processadas com e sem a adição dos fármacos na solução de secagem.



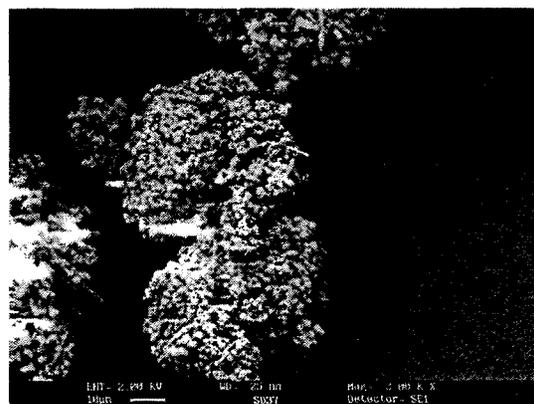
(a)



(b)



(c)



(d)

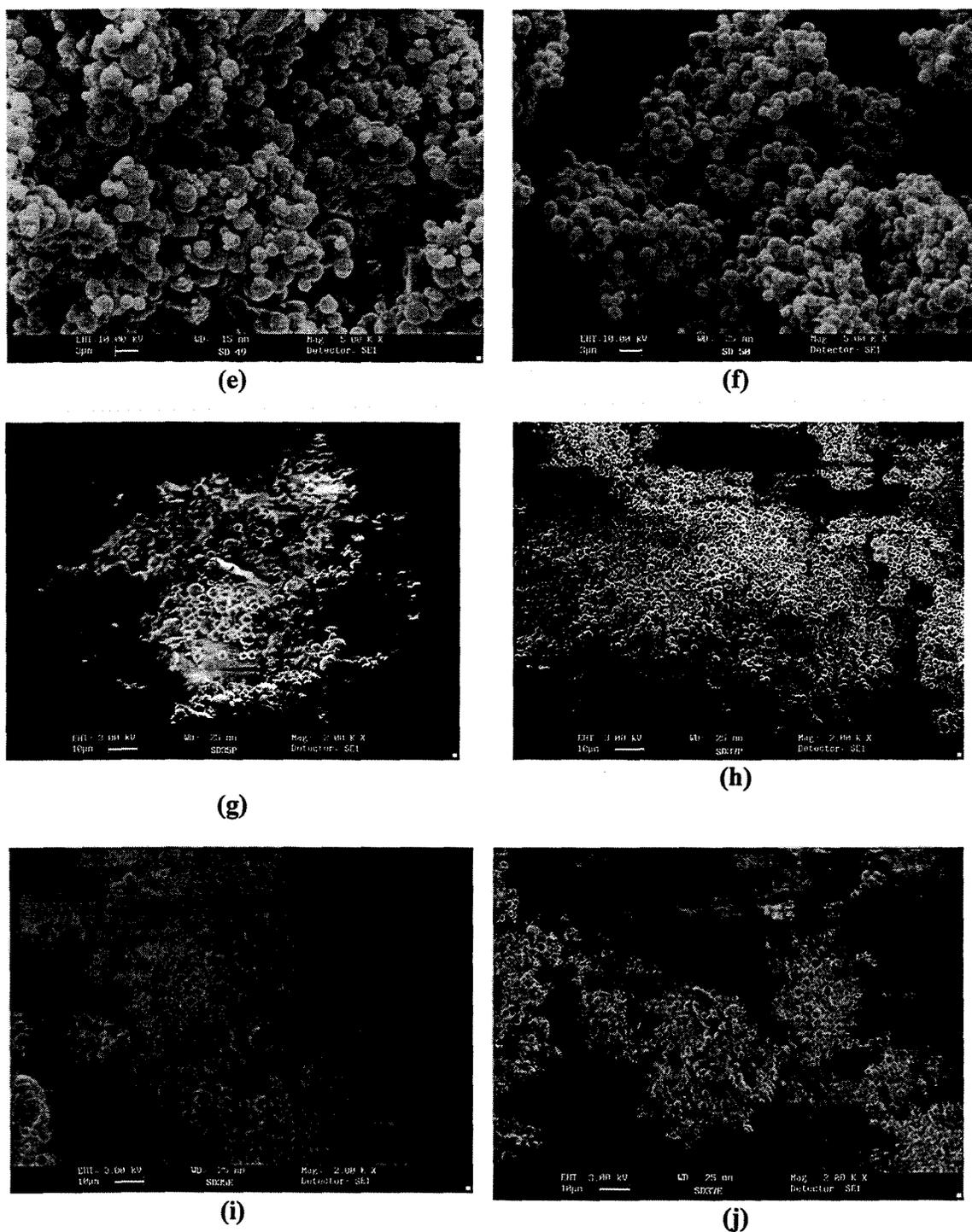


Figura 30: Microscopia eletrônica de varredura das partículas sólidas: (a) Isoniazida (experimento 48), (b) lipídio e Isoniazida (experimento 45), (c) lipídio, manitol e Isoniazida (experimento 35i), (d) lipídio, manitol e Isoniazida (experimento 37i), (e) lipídio, manitol e Isoniazida (experimento 49i), (f) lipídio, manitol e Isoniazida (experimento 50i), (g) lipídio, manitol e Pirazinamida (experimento 35p), (h) lipídio, manitol e Pirazinamida (experimento

37p), (i) lipídio, manitol e Etambutol (experimento 35e), (j) lipídio, manitol e Etambutol (experimento 37e).

As Figuras 30(b), (c), (d), (e) e (f) apresentaram partículas de formato esférico regular, características do lipídio puro ou dos compósitos lipídio/manitol. Estruturas irregulares referentes ao fármaco puro seco por atomização (Figura 31(a)), que corresponderiam ao fármaco livre (não incorporado) não foram observadas nas micrografias, embora tenham sido detectadas nos difratogramas de raios-X para as mesmas amostras. Isso mostra a menor precisão que se tem na análise de imagens, principalmente quando a quantidade de fármaco livre é pequena. Resultados semelhantes podem ser estendidos para os fármacos Pirazinamida e Etambutol.

Os diâmetros geométricos e aerodinâmicos, assim como a distribuição de tamanhos das partículas, encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Diâmetro geométrico e aerodinâmico e distribuição de tamanhos das partículas produzidas através da secagem por atomização com formulações contendo os tuberculostáticos Isoniazida (Iz), Pirazinamida (Pz) e Etambutol (Et).

Ensaio	Diâmetro geométrico principal [μm]			Diâmetro aerodinâmico médio [μm]		
	Iz	Pz	Et	Iz	Pz	Et
35	4	1	4	1,54	1,05	1,40
37	4	4	4	1,54	1,13	1,47
45	1/4*	-	-	1,47		
49	-	-	-	0,95/4,96*	-	-
50	-	-	-	4,77	-	-

* distribuição bimodal de tamanhos

O tamanho das partículas secas com o fármaco apresentou-se da ordem de $4\mu\text{m}$, com diâmetro aerodinâmico médio entre 1 e $1,5\mu\text{m}$ e distribuição de tamanhos abaixo de

5 μ m para todas as formulações, exceto para as amostras processadas com maiores concentrações de Isoniazida (ensaios 49 e 50). Essas partículas apresentaram diâmetros aerodinâmicos médios maiores, da ordem de 5 μ m, com uma distribuição de tamanhos abaixo de 10 μ m, provavelmente causados devido a sua aglomeração. Isto pode ser comprovado pelas imagens apresentadas nas Figuras 30 (e) e (f), as quais indicam respectivamente a presença de partículas esféricas com tamanho máximo de 6 e 4 μ m.

As densidades das partículas preparadas nos ensaios 35 “i”, “p” e “e” não variaram significativamente com o fármaco, sendo de respectivamente 1,1186; 1,0451 e 1,0740g/cm³. Os valores próximos da unidade novamente indicam que os diâmetros aerodinâmicos e de Stokes são próximos.

5.3.1.1.3. Eficiência de incorporação e massa de fármaco por massa de formulação

As eficiências de incorporação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida no produto seco (E_I – equação 8) e a massa de fármaco por massa de produto seco formulado, referente aos ensaios 35, 37, 45, 49 e 50, encontram-se na Tabela 18. Vale ressaltar que a incorporação do fármaco pode ocorrer em duas regiões distintas da partícula sólida: no interior ou na superfície.

Tabela 18: Eficiência de incorporação (E_I) dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida nas partículas sólidas e a massa de fármaco por massa de produto seco formulado (M_{FP}).

Experimento	E_I [%]		M_{FP} [g/g]	
	Isoniazida	Pirazinamida	Isoniazida	Pirazinamida
35	100	75	0,0283	0,0179
37	92	20	0,0253	0,0049
45	86	-	0,0249	-
49	97	-	0,0522	-
50	87	-	0,0980	-

Observa-se que a incorporação do fármaco foi alta em todas as formulações contendo Isoniazida, com um mínimo de 86%. Já nas amostras com Pirazinamida, a incorporação foi mais baixa, com um mínimo de 20%. Este comportamento reflete a ação conjunta da interação fármaco-lipídio e as condições de secagem. Pode-se também observar que para ambos fármacos a incorporação foi maior na estrutura mais cristalina (experimento 35).

A concentração inibitória mínima (MIC) é a menor concentração de um agente antimicrobiano (expressa em $\mu\text{g/mL}$) que irá inibir o crescimento de um microorganismo *in vitro* [Sherris, 1990]. A determinação do MIC fornece um resultado de sensibilidade mais estreitamente relacionado com as condições *in vivo*, proporcionando informações precisas, com as quais se podem selecionar a terapia antimicrobiana mais apropriada e assegurar dosagens e vias de administração mais prováveis para atingir a concentração inibitória *in vivo* no local da infecção. Como regra geral, na terapia antimicrobiana adota-se que a concentração do fármaco atingirá *in vivo*, com êxito, se for usado um valor de duas a quatro vezes o valor da MIC obtido *in vitro* [<http://www.pbnet.com.Br/openline/vandique/informativos.htm>].

O MIC para o bacilo *M. tuberculosis* é de $0,05\mu\text{g}$ de Isoniazida e $12,5\mu\text{g}$ de Pirazinamida por mililitro de formulação. Assim, a massa necessária da formulação em pó contendo Isoniazida produzida neste trabalho para atender ao MIC varia de $0,5$ a $2\mu\text{g}$ por mililitro de formulação, dependendo das condições de produção. Para a Pirazinamida essas massas são 700 ou $2550\mu\text{g}$, para os experimentos 35 ou 37, respectivamente. Devido à elevada incorporação dos fármacos nos sólidos produzidos, quantidades mássicas da ordem de 100 vezes maior que o MIC podem ser atingidas em volumes de sólidos compatíveis com a administração por inalação, visto que a sua massa específica é 1g/mL . Esses resultados, associados às propriedades dos sólidos produzidos, indicam a viabilidade da utilização dos tuberculostáticos Isoniazida e Pirazinamida veiculados em compósitos lipídicos para administração pulmonar, isolados ou em associações, sendo potencialmente úteis para a terapia da tuberculose.

Vale ressaltar que as massas de fármacos anteriormente referidas são inferiores às contidas nas dosagens diárias máximas recomendadas (300mg de Isoniazida e 2g de Pirazinamida) quando utilizadas formulações administradas por via oral. Porém, deve-se

considerar na administração por via pulmonar a ausência dos efeitos de primeira passagem (exposição ao trato gastrointestinal), os quais reduzem a biodisponibilidade do fármaco.

5.3.1.1.4. Transição de fases

O espectro de DSC das partículas secas contendo Isoniazida na sua estrutura é apresentado na Figura 31. Neles, a suposta temperatura de transição vítrea das partículas lipídicas sólidas foi 30°C, enquanto a temperatura de transição principal foi 74°C. Comparando este resultado com o obtido para as partículas secas processadas sem o fármaco (item 3.3.4.3, Figura 19a), observa-se que ambas as temperaturas foram maiores para as partículas contendo o fármaco, confirmando a sua incorporação na estrutura sólida.

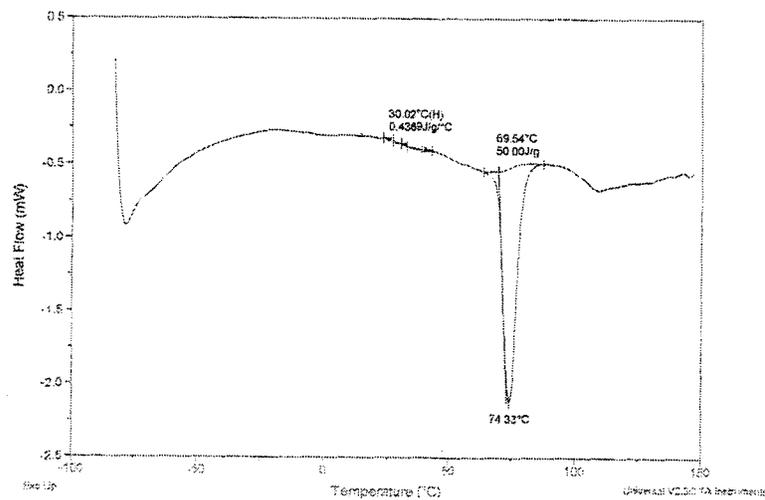


Figura 31: Efeito da presença do fármaco Isoniazida sobre as propriedades térmicas das partículas secas. Condições da secagem: temperatura de entrada do ar 90°C; concentração de lipídios 85mM; vazão da solução de alimentação 20mL/min.

5.3.1.1.5. Liberação dos fármacos do produto seco

A liberação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida das partículas sólidas nos ensaios conduzidos *in vitro* foi caracterizada a partir dos perfis de concentração do fármaco liberado com o tempo, os quais refletem a taxa de liberação e a permeabilidade da estrutura sólida.

As curvas de porcentagem de liberação versus tempo para a Isoniazida em sua forma livre, em mistura física com Epikuron e manitol e nas partículas sólidas referentes aos experimentos 35, 37, 45 (estrutura sem manitol) e 50 (maior concentração de Isoniazida) encontram-se na Figura 32.

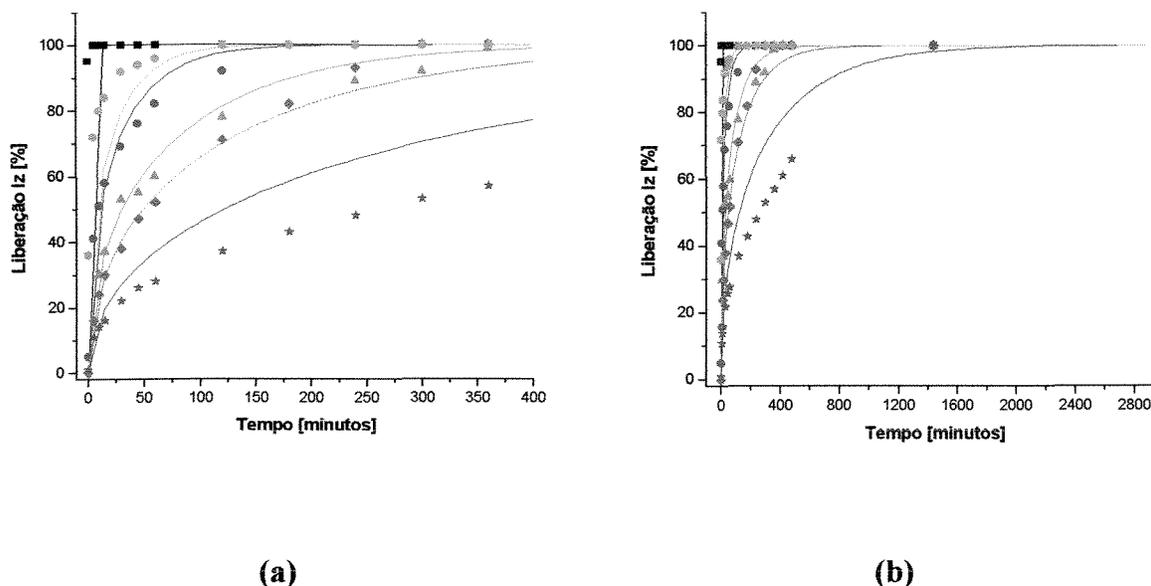


Figura 32: Perfis de liberação do fármaco Isoniazida (a) de 0 a 400 minutos, (b) de 0 a 3000 minutos; para o fármaco em sua forma livre ___ (preto), mistura física de Epk, man e Iz ___ (vermelho), ensaio 35i ___ (verde), ensaio 37i ___ (azul escuro), ensaio 45i ___ (rosa), ensaio SD50i ___ (azul claro). Os símbolos referem-se aos pontos experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

Os resultados mostram que a liberação da Isoniazida na sua forma livre foi praticamente instantânea, como esperado, visto que a membrana de diálise não apresenta resistência ao fármaco hidrofílico, que tende a se solubilizar no tampão. A Isoniazida contida na mistura física foi liberada a uma taxa um pouco mais lenta (3h), se comparada com a sua forma livre, indicando que a liberação é dependente da presença física dos outros sólidos, que retardam esta taxa. Nos produtos lipídicos a Isoniazida foi liberada gradualmente ao longo das 24 horas, indicando uma maior interação entre o ativo e o veículo quando comparado à mistura física de sólidos, evidenciando que os agregados se comportam como “membranas secas”. A amostra referente ao ensaio 50, com 30mM de

Isoniazida (maior concentração usada nos experimentos) apresentou uma taxa de liberação muito rápida (2h) maior até que a mistura física, o que pode ser explicado pela localização de considerável massa de fármaco na superfície da partícula, em relação à incorporada no seu interior, a qual não está sujeita à interferência de outros sólidos na sua liberação, apresentando portanto menor resistência.

O produto seco que não continha manitol na sua formulação foi o que apresentou a menor taxa de liberação dentre todos os casos estudados. Este resultado pode ser explicado pela alta cristalinidade da amostra, a maior obtida nos experimentos com Isoniazida (Figura 29), causando uma maior organização e empacotamento dos componentes, assim dificultando a liberação do fármaco, principalmente o localizado no interior das microestruturas. Aliado a isso, o manitol possui propriedades osmóticas, que provavelmente aceleram a liberação do fármaco, de maneira semelhante ao comportamento observado em membranas celulares, nas quais o manitol causa o deslocamento de fluidos do espaço intracelular para o espaço extracelular [Kibbe, 2000]. Assim, a formulação do veículo influencia diretamente a taxa de liberação do fármaco, havendo a possibilidade de modulação com a presença de excipientes como o manitol, e adequação das necessidades a aplicações específicas.

Da Figura 32 observa-se também que o modelo matemático de difusão ajustou-se bem aos pontos experimentais, exceto para a curva referente ao ensaio 45i, provavelmente devido à interferência da membrana de diálise, a qual torna-se maior a medida que a taxa de liberação do fármaco da partícula esférica é mais lenta.

As curvas de porcentagem de liberação de Pirazinamida versus tempo para o fármaco em sua forma livre, a mistura física de Epikuron, manitol e o fármaco e o produto seco referente aos experimentos 35 (estrutura mais cristalina) e 37 (estrutura mais amorfa) encontram-se na Figura 33.

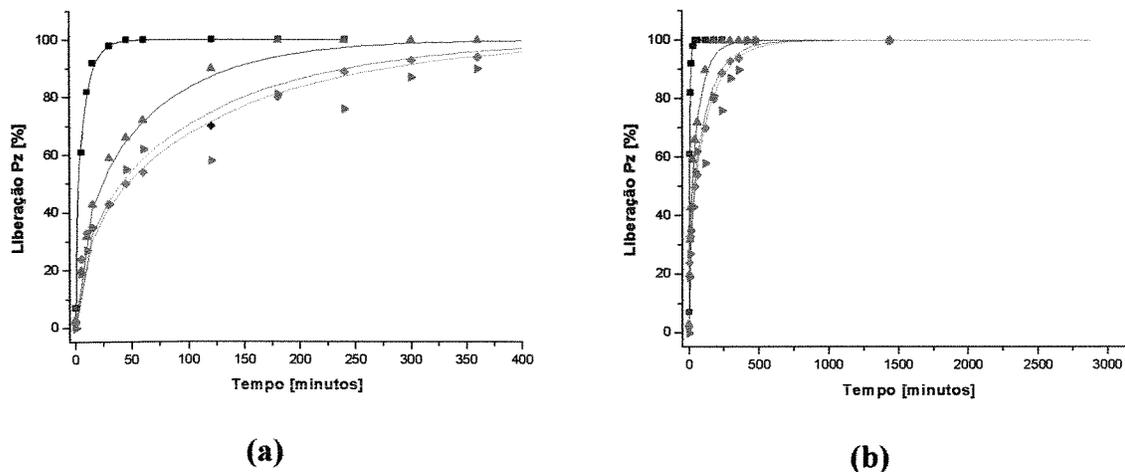


Figura 33: Perfis de liberação do fármaco Pirazinamida (a) de 0 a 400 minutos, (b) de 0 a 3000 minutos; para o fármaco em sua forma livre ____ (preto), mistura física de Epk, man e Pz ____ (vermelho), ensaio 35p ____ (azul escuro), ensaio 37p ____ (rosa). Os símbolos referem-se aos pontos experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

Neste caso também a liberação do fármaco livre foi praticamente instantânea, a mistura física um pouco mais lenta (4h), e os produtos lipídicos tiveram liberação mais lentas e graduais ao longo das 24 horas. Neste caso, o modelo matemático também se ajustou bem aos dados experimentais.

Para a avaliação da influência do pH do meio de dissolução sobre a liberação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida das partículas sólidas (ensaio 35), foram também feitos ensaios ao pH de 5,2, que é o pH endossômico dos macrófagos dos alvéolos dos pulmões. As curvas de liberação do fármaco versus tempo são apresentadas na Figura 34. Pode-se observar que para ambos fármacos a liberação foi mais lenta ao pH de 5,2, o que contribui para a ação controlada dos fármacos no local. Este resultado foi semelhante ao obtido por O'Hara e Hickey [2000].

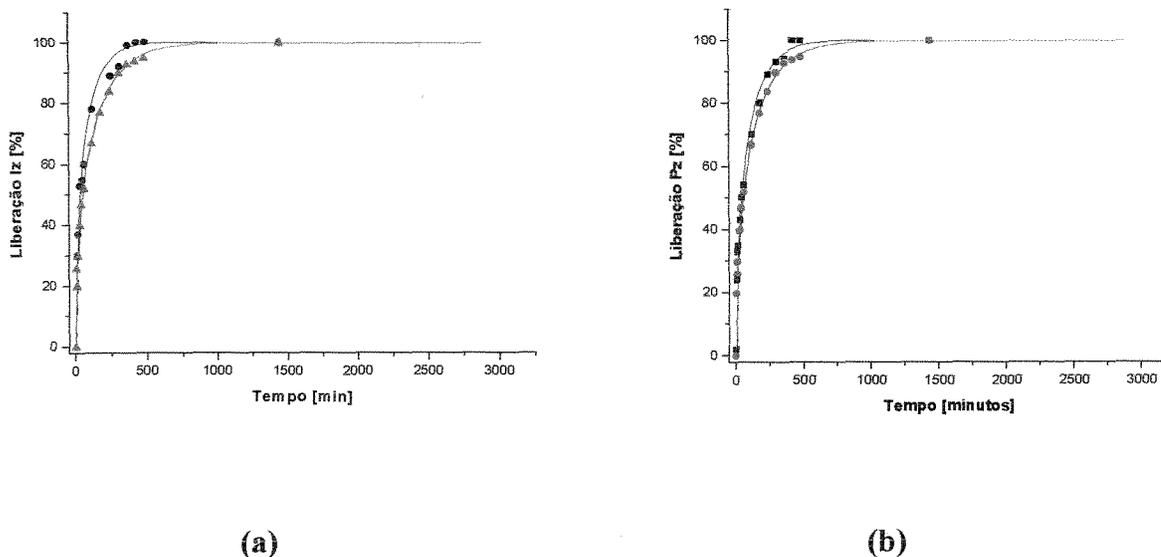


Figura 34: Perfis de liberação dos fármacos (a) Isoniazida e (b) Pirazinamida ao pH de 7,4 ____ (preto) ou 5,2 ____ (vermelho). Os símbolos referem-se aos pontos experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

A Tabela 19 apresenta os valores da constante “k” determinada pelo modelo difusivo e as permeabilidades “P” dos fármacos nas partículas esféricas sólidas.

Tabela 19: Constante “k” do modelo cinético difusivo e coeficiente de permeabilidade “P” para as partículas esféricas sólidas (equação 16).

Amostra	k [h ⁻¹]	P [cm/s]
35i (pH 7,4)	1,00*10 ⁻³	7,14*10 ⁻¹²
35i (pH 5,2)	5,99*10 ⁻⁴	4,27*10 ⁻¹²
37i	6,20*10 ⁻⁴	4,42*10 ⁻¹²
45i	1,47*10 ⁻⁴	9,98*10 ⁻¹³
50i	1,25*10 ⁻²	2,76*10 ⁻¹⁰
35p (pH 7,4)	7,61*10 ⁻⁴	3,70*10 ⁻¹²
35p (pH 5,2)	5,80*10 ⁻⁴	2,82*10 ⁻¹²
37p	6,65*10 ⁻⁴	3,48*10 ⁻¹²

Apesar do bom ajuste dos dados experimentais ao modelo, como mostrado nas figuras anteriores, os valores da constante “k” obtidos foram em todos os casos menores que a unidade. De acordo com os estudos de Guy e colaboradores [1982], para valores de “k” menores que um, os efeitos da transferência interfacial através da membrana de diálise tornam-se significativos. Isso justifica a necessidade de utilização de modelos que incluam a limitação difusiva em estudos posteriores.

5.3.2. Lipossomas

5.3.2.1. Propriedades dos lipossomas preparados pelo método de Bangham

5.3.2.1.1. Diâmetro médio e estabilidade de estocagem

Os valores dos diâmetros médios dos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural não variaram significativamente com a razão fármaco/lipídio inicial, mantendo-se em média em aproximadamente 108 ± 8 nm. Esses valores são próximos do diâmetro nominal da membrana de extrusão descrita pelo fabricante, indicando uma elevada eficiência na transformação das vesículas multilamelares em unilamelares através da extrusão. Em todos os casos a distribuição de tamanhos foi relativamente estreita, com polidispersidade em torno de 0,22. O acompanhamento dos diâmetros dos lipossomas ao longo de 16 semanas também não apresentou variação significativa, em torno de 5%, indicando que as vesículas não sofreram agregação ou desestruturação, sendo, portanto, estáveis fisicamente.

Os valores dos diâmetros médios dos lipossomas preparados a partir dos fosfolipídios sintéticos apresentaram-se na faixa de 120 ± 12 nm [Lima, 2000]. Assim, se comparados aos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural, estes valores apresentaram-se um pouco superiores. Ao longo das semanas as vesículas não sofreram mudanças significativas de tamanho [Lima, 2000], indicando que também neste caso esses sistemas são estáveis quando estocados à 5°C.

5.3.2.1.2. Estabilidade das vesículas em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$

A investigação do mecanismo de desestabilização dos lipossomas na presença de tensoativos permite a obtenção de informações sobre a integridade da bicamada lipídica, assim como do seu empacotamento. Estas informações são de fundamental importância na aplicação dos lipossomas para liberação controlada de medicamentos.

Os tensoativos têm a propriedade de solubilizar as vesículas lipídicas. A extensão da solubilização depende da facilidade de penetração deles na membrana. Assim, o empacotamento da membrana e as interações entre os tensoativos e as vesículas podem ser analisados, após incubação, através das absorvâncias das soluções de vesículas lipídicas/tensoativos, a várias concentrações de tensoativo. O perfil de absorvância versus concentração de tensoativo segue o modelo convencional de três estágios descrito para a solubilização de vesículas por tensoativo. Num primeiro estágio, a baixas concentrações de tensoativo, ocorre o inchamento inicial das vesículas. A seguir a vesícula aumenta gradativamente de tamanho devido à penetração das moléculas de tensoativo e a fusão. No estágio final, a altas concentrações de tensoativo, ocorre a ruptura das vesículas, com a formação das micelas. Vesículas mais estáveis apresentam perfis com menos distúrbios das absorvâncias iniciais após exposição aos tensoativos.

Os perfis de estabilidade dos lipossomas contendo respectivamente os fármacos Isoniazida $[(F/L)_0=26,7]$ e Pirazinamida $[(F/L)_0=13,3]$, assim como os lipossomas vazios, para efeito de comparação, na presença do tensoativo $C_{12}E_5$, são apresentados nas Figuras 35 e 36. Através dos perfis apresentados pode-se observar que houve pouca diferença entre os perfis referentes aos lipossomas contendo Isoniazida ou Pirazinamida e ao referente aos lipossomas vazios, o que leva a conclusão que a presença dos fármacos não perturba a integridade das vesículas. Tal comportamento também foi observado por Lima [2000] para os fosfolípidios sintéticos.

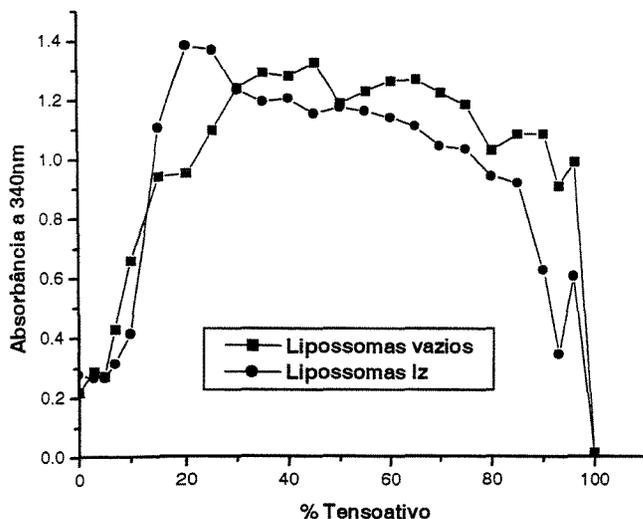


Figura 35: Estabilidade de lipossomas convencionais vazios e contendo Isoniazida $[(F/L)_0=26,7]$ em soluções de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios 1mM, a temperatura ambiente, por 2 horas.

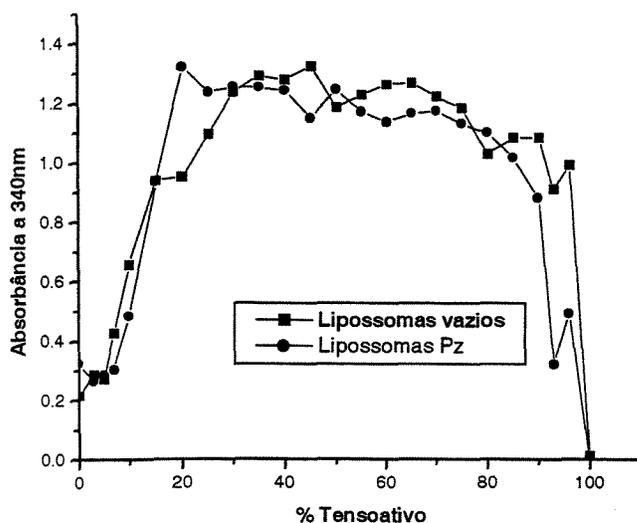


Figura 36: Estabilidade de lipossomas convencionais vazios e contendo Pirazinamida $[(F/L)_0=13,3]$ em soluções de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios 1mM, a temperatura ambiente, por 2 horas.

5.3.2.1.3. Desempenho da encapsulação

A metodologia utilizada para a quantificação dos fármacos envolveu a determinação espectrofotométrica após o rompimento das vesículas lipídicas com o solvente orgânico

etanol. O rompimento foi necessário devido à interferência das vesículas na absorvância das amostras, causada pelo espalhamento de luz provocado pelos lipossomas. Para o Epikuron 200SH, foi avaliado o efeito da presença dos lipídios na medida da absorvância das soluções após o rompimento com etanol. Assim, foram realizados ensaios utilizando 1 parte de amostra para 5 ou 9 partes de etanol. A influência dos lipídios foi desprezível quando se usou a maior diluição, padronizando-se a relação 1:9 lipossomas:etanol, para o rompimento das vesículas.

Na Tabela 20 são apresentados os valores das razões molares fármaco/lipídio final $[(F/L)_F]$, resultantes da encapsulação dos fármacos Isoniazida ou Pirazinamida nos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural Epikuron 200SH/colesterol (60/40) ou dos sintéticos DSPC/DMPE/colesterol (40/20/40) [Lima, 2000], assim como a eficiência de encapsulação (E_E), para as várias razões iniciais de fármaco/lipídio $[(F/L)_0]$.

Os resultados experimentais mostram que para razões fármaco/lipídio inicial semelhantes, a encapsulação da Isoniazida em lipossomas é maior que a encapsulação da Pirazinamida, sendo este efeito mais pronunciado nos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural. A diferença na encapsulação dos fármacos deve-se às interações destes com os lipídios, apesar da semelhança entre a Isoniazida e a Pirazinamida em termos de massa molar e dimensões.

Para a Isoniazida, a eficiência de encapsulação foi da ordem de 4% para toda a gama de razões fármaco/lipídio inicial. Para a Pirazinamida, a eficiência de encapsulação cresceu com o fármaco/lipídio inicial. No caso dos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural, após atingir valores praticamente constantes, em torno de 3%, a encapsulação diminuiu com o aumento da razão fármaco/lipídio inicial. Para todos os casos, os níveis de eficiência de encapsulação situam-se na faixa de valores obtidos para a encapsulação de drogas hidrofílicas em lipossomas preparados a partir do método de hidratação de filme seco de lipídios.

Tabela 20: Valores das razões molares fármaco/lipídio final $[(F/L)_F]$, resultantes da encapsulação dos fármacos Isoniazida ou Pirazinamida nos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural Epikuron 200SH/colesterol (60/40) ou dos sintéticos DSPC/DMPE/colesterol (40/20/40) [Lima, 2000], assim como a eficiência de encapsulação (E_E), para as várias razões iniciais de fármaco/lipídio $[(F/L)_0]$.

Fármaco encapsulado	$(F/L)_0$	$(F/L)_F$		E_E (%)	
		Fosfolipídio natural	Fosfolipídio sintético	Fosfolipídio natural	Fosfolipídio sintético
Isoniazida	3,33	0,137	0,133	4,13	3,99
	6,70	0,239	0,269	3,57	4,03
	10,0	0,458	0,413	4,57	4,13
	13,3	0,481	0,593	3,61	4,44
	26,7	1,122	0,964	4,20	3,61
Pirazinamida	3,33	0,022	0,115	0,67	3,45
	4,8	0,037	-	0,78	-
	6,7	0,348	0,166	5,20	2,49
	8,7	0,238	-	2,74	-
	10,0	0,265	0,388	2,75	3,88
	12,0	0,411	-	3,43	-
	13,3	0,133	0,734	1,00	5,50

Pode-se também observar pelos resultados apresentados na Tabela 20 que o perfil representativo das interações entre a Isoniazida e o lipídio é crescente para a razão fármaco/lipídio inicial na faixa de 0 a 26,7. Maiores valores ultrapassam o limite de solubilidade do fármaco. Para a Pirazinamida observou-se um crescimento da razão fármaco/lipídio final com a razão fármaco/lipídio inicial, mas no caso dos lipossomas preparados a partir do fosfolipídio natural, na faixa de 6 a 12 fármaco/lipídio inicial atinge-se praticamente um patamar de saturação, com fármaco/lipídio final em torno de 0,3.

Aumentando-se a razão fármaco/lipídio inicial, a razão fármaco/lipídio final cai bruscamente, devido às limitações de solubilização do fármaco.

Dos resultados obtidos pode-se considerar que os desempenhos da encapsulação de lipossomas preparados com fosfolipídios sintéticos e naturais são semelhantes para ambos os fármacos. As diferenças observadas devem ser atribuídas à presença do DMPE em maior proporção nas vesículas sintéticas.

5.3.2.2. Propriedades dos lipossomas preparados por hidratação de partículas secas

5.3.2.2.1. Estabilidade das vesículas em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$

O perfil de estabilidade dos lipossomas preparados sob agitação mecânica a partir das partículas sólidas contendo o fármaco Pirazinamida (ensaio 35) na presença do tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ é apresentado na Figura 37.

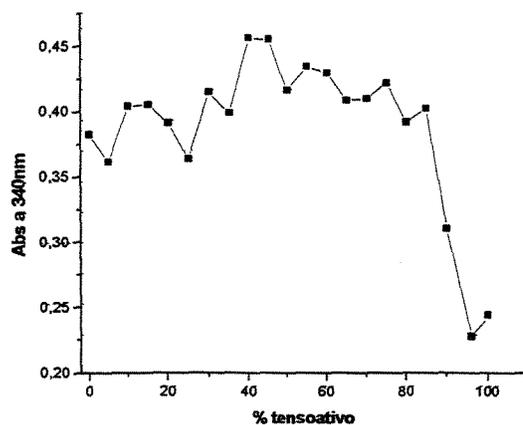


Figura 37: Estabilidade de lipossomas contendo Pirazinamida (ensaio 35) em soluções de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios 1mM, a temperatura ambiente, por 2 horas.

Pode-se observar que esse perfil tem características semelhantes ao da Figuras 35, obtido para lipossomas preparados pelo método de Bangham. Isso indica que os agregados lipídicos produzidos a partir da hidratação das partículas secas têm características de

membrana, oferecendo resistência à penetração do tensoativo seguido de ruptura e formação de micelas, à altas concentrações de tensoativo. Nesse caso, as variações de absorvâncias a baixas concentrações de tensoativo são menores, devido ao maior tamanho inicial das partículas.

5.3.2.2.2. Desempenho da encapsulação

As eficiências de encapsulação (E_E) dos lipossomas preparados a partir dos produtos secos encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21: Eficiência de encapsulação dos lipossomas preparados a partir dos produtos secos.

Método de hidratação	Experimento	E_E [%]
Agitação rotatória Solução de Iz 1mM	02	7,6
	31	4,2
	35i	4,7
	37i	5,1
Agitação rotatória Solução tampão	35i	8,7
	37i	12,9
	45i	4,2
Agitação mecânica Solução tampão	35i	9,8
	35p	9,1
	37i	15,3
	37p	10,1
	45i	3,9

Pode-se observar que a eficiência de encapsulação é dependente do método e da solução de hidratação, assim como das propriedades dos produtos secos. A agitação

mecânica produziu lipossomas com uma maior capacidade de encapsulação, da ordem de 15%, se comparado com a agitação rotatória. Comparando-se a influência da presença do fármaco na solução de hidratação, e utilizando agitação rotatória, verifica-se que as amostras hidratadas com solução tampão apresentaram uma maior capacidade de encapsulação, se comparadas com aquelas hidratadas com solução de Isoniazida 1mM, tanto para os sólidos contendo o fármaco (experimentos 35 e 37), quanto sem o fármaco (experimentos 02 e 31).

Adicionalmente ao método de hidratação, observa-se que a microestrutura dos produtos secos também influenciou a eficiência de encapsulação. Através dos difratogramas de raios-X apresentados no item (5.3.1.1.1), pode-se observar que entre as amostras referentes aos ensaios 35, 37 e 45, a mais cristalina é a 45 e a menos cristalina a 37. Assim, pode-se também concluir que em todos os casos observados uma maior encapsulação, da ordem de 40%, foi obtida nos lipossomas preparados a partir de pós-secos mais amorfos (ensaio 37), provavelmente devido à maior capacidade de hidratação das microestruturas. Para as amostras sem manitol (ensaio 45), o método de hidratação (agitação rotatória ou mecânica) não influenciou a eficiência de encapsulação, a qual apresentou valores mais baixos que as amostras contendo manitol.

5.3.2.2.3. Liberação dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida

As curvas de porcentagem de liberação de Isoniazida versus tempo para os lipossomas preparados sob agitação rotatória ou mecânica contendo o fármaco Isoniazida encapsulado podem ser observadas na Figura 38. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de liberação, calculada em relação ao fármaco total encapsulado.

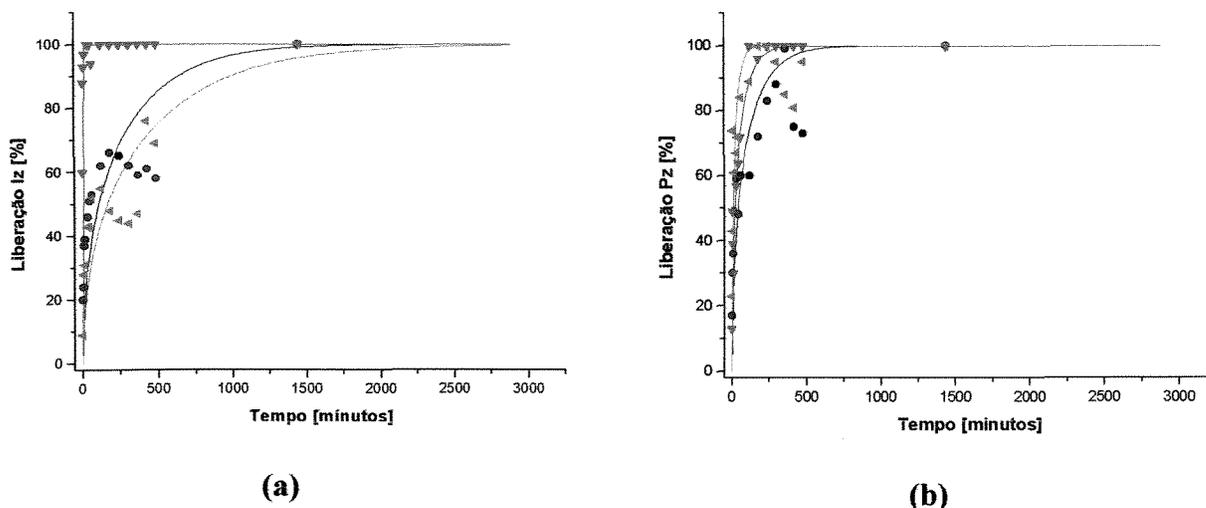


Figura 38: Perfis de liberação do fármaco Isoniazida encapsulado em lipossomas preparados sob agitação (a) mecânica, (b) rotatória. ___ (preto) ensaio 35, ___ (vermelho) ensaio 37, ___ (azul) ensaio 45. Os símbolos referem-se aos pontos experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

Pode-se observar (Figura 38) liberação gradual e dependente das características das partículas secas utilizadas e do tipo de agitação usada na preparação dos lipossomas (agitação mecânica ou rotatória).

O método de preparação dos lipossomas influenciou a taxa de liberação do fármaco, sendo que os lipossomas obtidos através de agitação rotatória (Figura 38 (b)) apresentaram taxas de liberação maiores e praticamente independentes da cristalinidade da microestrutura do composto lipídico inicial, se comparados com os preparados através de agitação mecânica (Figura 38 (a)).

Nos lipossomas preparados a partir das partículas lipídicas através de agitação mecânica, quanto mais cristalina a estrutura dos compostos lipídicos iniciais, menor a taxa de liberação do fármaco. Comparando estes resultados com os obtidos na eficiência de encapsulação (item 5.3.2.3.2), conclui-se que as partículas mais amorfas produzem lipossomas com maior eficiência de encapsulação e taxa de liberação do fármaco.

A Figura 39 apresenta a liberação do fármaco Pirazinamida do lipossoma preparado sob agitação mecânica, a partir das partículas sólidas obtidas no ensaio 35. As características observadas foram semelhantes às obtidas para o fármaco Isoniazida. Não foi possível quantificar a liberação do fármaco dos lipossomas preparados a partir das partículas obtidas no ensaio 37, devido a baixa concentração de Pirazinamida encapsulada.

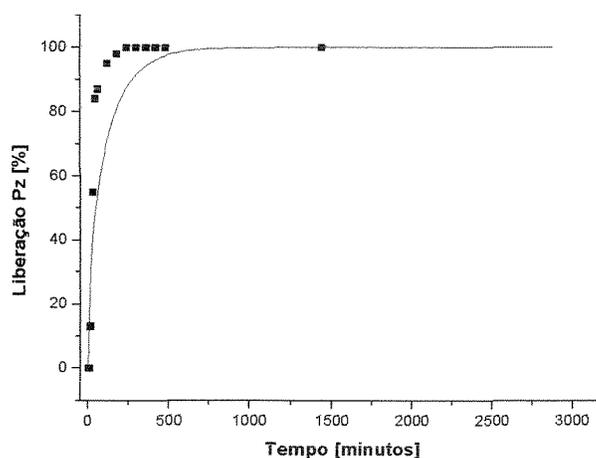


Figura 39: Perfil de liberação do fármaco Pirazinamida encapsulado em lipossomas preparados sob agitação mecânica. O símbolo refere-se aos pontos experimentais e a linha ao modelo teórico calculado.

A Tabela 22 apresenta os valores da constante “k” determinada pelo modelo difusivo e as permeabilidades dos fármacos “P” nos lipossomas. Apesar do bom ajuste dos dados experimentais ao modelo, como mostrado nas figuras anteriores, os valores da constante “k” obtidos foram em todos os casos também menores que a unidade. Como já comentado no item (5.3.1.1.5), neste caso os efeitos da transferência interfacial através da membrana de diálise tornam-se igualmente significativos, o que justifica a necessidade de utilização de modelos que incluam a limitação difusiva em estudos posteriores.

Tabela 22: Constante “k” do modelo cinético difusivo e coeficiente de permeabilidade “P” (equação 16) para os lipossomas.

Amostra		k [h ⁻¹]	P [cm/s]
Agitação rotatória	35i	7,27*10 ⁻⁴	1,04*10 ⁻¹¹
	37i	1,42*10 ⁻³	2,30*10 ⁻¹¹
	45i	3,17*10 ⁻³	5,43*10 ⁻¹¹
Agitação mecânica	35i	2,90*10 ⁻⁴	2,28*10 ⁻¹²
	35p	6,69*10 ⁻⁴	1,20*10 ⁻¹¹
	37i	2,99*10 ⁻²	3,87*10 ⁻¹⁰
	45i	1,86*10 ⁻⁴	2,50*10 ⁻¹²

Os valores de permeabilidade obtidos são da ordem de grandeza da permeabilidade de moléculas carregadas e de moléculas grandes, tais como glicose e proteínas, através de membranas de lecitina [Lasic, 1993]. Como os fármacos estudados não apresentam essas características, atribui-se os baixos valores de permeabilidade à maior resistência imposta pelo empacotamento dos lipossomas produzidos.

5.3.2.3. Características de processo e das partículas obtidas em escala piloto

O processamento de lipídios em escala piloto apresentou rendimento mássico muito baixo, menor que 10% , devido à utilização de água como solvente, o que foi comprovado com o processamento da mesma solução aquosa em escala de bancada.

A Figura 40 apresenta os perfis de liberação do fármaco Isoniazida das partículas lipídicas sólidas preparadas em equipamentos de escala piloto e laboratório a partir de soluções aquosas.

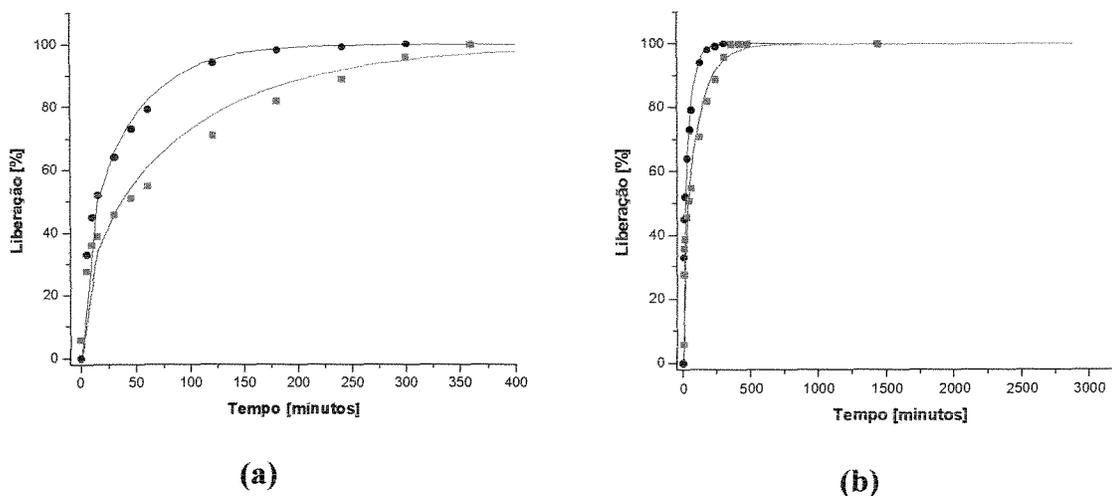


Figura 40: Perfis de liberação do fármaco Isoniazida (a) de 0 a 400 minutos, (b) de 0 a 3000 minutos; para as partículas preparadas em equipamentos escala piloto ____ (preto), e laboratório ____ (vermelho). Os símbolos referem-se aos pontos experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

Observa-se que as partículas sólidas apresentaram taxa de liberação do fármaco gradual, sendo que as preparadas em equipamento de escala laboratório apresentaram taxa de liberação menor (inicial 0,038mg/min e total em 6h) se comparadas com as preparadas em equipamento de escala piloto (inicial 0,057mg/min e total em 5h). O modelo matemático difusivo ajustou-se bem aos dados experimentais em ambos os casos.

As propriedades das partículas sólidas obtidas nos experimentos de secagem por atomização em equipamentos escala piloto e laboratório são apresentadas na Tabela 23. Ressalta-se que no equipamento em escala piloto as partículas foram coletadas na base da câmara de secagem e no ciclone.

Tabela 23: Efeito de parâmetros de escala em equipamentos de secagem por atomização sobre as propriedades das partículas sólidas.

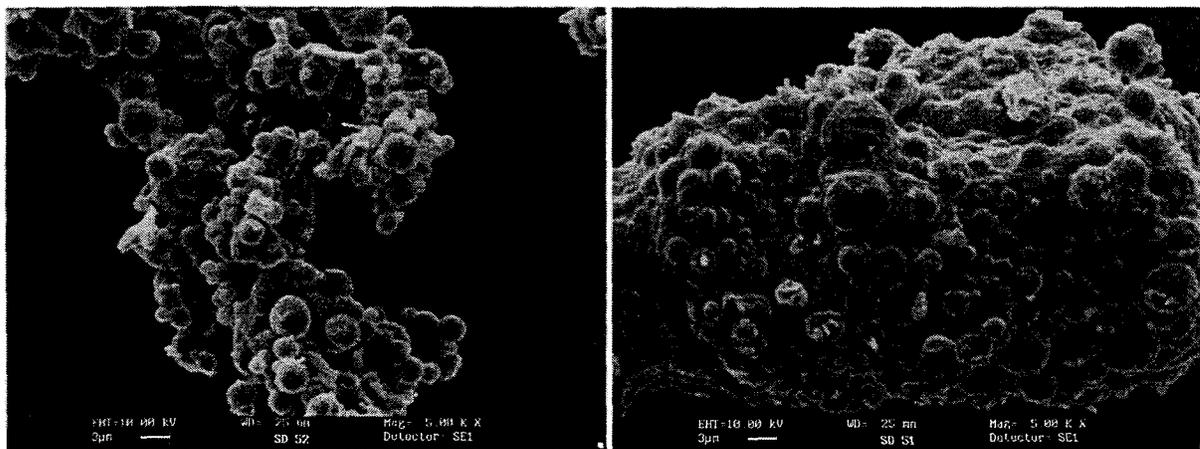
Propriedade	Escala laboratório	Escala piloto	
		câmara	ciclone
D_{aer} [μm]	1,05	0,81/4,40*	0,80
Densidade [g/cm^3]	-	1,0455	1,0723
E_I [%]	100	-	100
$M_{F/P}$ [g/g]	0,0175		0,0273
Taxa liberação inicial [mg/min]	0,038	-	0,057
Liberação total [h]	6	-	5
k [h^{-1}]	$8,55 \cdot 10^{-4}$	-	$2,11 \cdot 10^{-3}$
P [cm/s]	$4,16 \cdot 10^{-12}$	-	$7,82 \cdot 10^{-12}$

* distribuição bimodal de tamanhos

Apesar das diferenças de configurações dos equipamentos, os resultados apresentados na Tabela 23 não mostram grandes variações nas propriedades das partículas produzidas. Resultados similares foram obtidos por Johansen e colaboradores [2000]. Observa-se que em ambas as escalas a eficiência de incorporação do fármaco foi de 100%. A população da ordem de $4\mu\text{m}$ obtida na câmara de secagem do equipamento de escala piloto é formada por aglomerados de partículas. Vale ressaltar que essas partículas apresentaram-se bastante heterogêneas, não somente em relação ao tamanho, mas também à coloração e morfologia. Devido às diferentes propriedades, essas partículas não foram usadas nos ensaios de liberação do fármaco.

Observa-se também que massa de fármaco por massa de produto foi maior para a formulação obtida no equipamento escala piloto, sendo este valor semelhante ao obtido no experimento 37 (item 5.3.1.1.3), quando se usou as mesmas concentrações dos componentes da solução de alimentação. Isso mostra a influência não só do equipamento quanto do solvente.

A Figura 41 apresenta as imagens obtidas das partículas sólidas preparadas em equipamentos de escala laboratório e piloto. Em ambos os casos as partículas produzidas possuem geometria esférica, apresentando-se semelhantes nas micrografias, o que comprova os resultados da Tabela 23.



(a)

(b)

Figura 41: Microscopia eletrônica de varredura referente aos experimentos de secagem em equipamentos (a) escala laboratório, (b) escala piloto.

A partir das partículas sólidas produzidas, o aumento de escala da produção de lipossomas por hidratação é praticamente direto, pois envolve somente o aumento do número de orifícios no agitador, mantendo constante seu diâmetro.

Esses resultados mostram a viabilidade do escalonamento do processo de produção de partículas lipídicas sólidas com propriedades de incorporação e liberação controlada de fármacos, através da secagem por atomização. O aumento de escala seguro dessas formulações aponta para a perspectiva de produção de pós-respiráveis e lipossomas para o uso na terapia de várias doenças, contornando assim uma das grandes limitações da comercialização desses produtos.

6. CONCLUSÕES

As conclusões abaixo relacionadas representam as principais conclusões referentes aos tópicos abordados neste trabalho: produção e caracterização de partículas lipídicas sólidas para liberação controlada de fármacos, produção e caracterização de lipossomas para liberação controlada de fármacos e incorporação e liberação de fármacos de primeiro tratamento da tuberculose em partículas sólidas e lipossomas.

A produção mássica de sólidos através da técnica de secagem por atomização é principalmente influenciada pelas variáveis operacionais do processo concentração de fosfolipídios e vazão da solução de alimentação. A altas concentrações de fosfolipídio, foi determinado um modelo de segunda ordem relacionando o rendimento mássico do processo de produção das partículas secas com a vazão da solução de alimentação, o qual fornece um rendimento máximo de 24% a uma vazão de 20mL/min, validado experimentalmente em escala de laboratório. O rendimento mássico do processo está diretamente relacionado com o diâmetro das partículas produzidas, sendo que a principal perda de massa do processo ocorreu no ciclone, na etapa de separação produto-ar. A inclusão de um ciclone adicional para a coleta de partículas finas poderá aumentar o rendimento mássico do processo de produção das partículas sólidas.

O processo de secagem por atomização mostrou-se uma importante técnica para a preparação de partículas lipídicas sólidas, potencialmente úteis como veículos para administração de drogas. A variação das condições operacionais do equipamento, assim como o uso de excipientes, permitiu a modulação das propriedades das partículas secas, produzindo estruturas mais amorfas ou cristalinas, com diferentes diâmetros, distribuição de tamanhos e propriedades térmicas. Estruturas mais cristalinas foram obtidas com o aumento da concentração de lipídios, da vazão e da temperatura da solução de alimentação, assim como do diâmetro do atomizador. Estruturas amorfas foram produzidas com a incorporação de manitol. As partículas sólidas têm o formato esférico, e seu diâmetro aerodinâmico encontra-se na faixa indicada para administração pulmonar (menor 5 μ m). A incorporação do fármaco Isoniazida nas estruturas sólidas foi alta, com um mínimo de 86%, sendo a sua liberação gradual ao longo do tempo. A incorporação do tuberculostático Pirazinamida nas estruturas sólidas foi mais baixa, de 20 e 75% para as estruturas mais amorfas e mais cristalinas, respectivamente. A sua liberação também foi gradual ao longo do tempo.

Os lipossomas preparados a partir das partículas lipídicas secas mostraram-se dependentes do tipo de impelidor utilizado, sendo que o de alto cisalhamento Kroma produziu lipossomas menores e mais homogêneos em tamanhos, se comparados com o do tipo pá dentada. A eficiência de encapsulação do fármaco nos lipossomas mostrou-se dependente do método e da solução de hidratação, assim como das propriedades do produto seco. Lipossomas preparados a partir de sólidos mais amorfos apresentaram uma maior eficiência de encapsulação e taxa de liberação do fármaco, se comparados com lipossomas preparados a partir de sólidos mais cristalinos.

Os resultados em escala piloto mostraram a viabilidade do escalonamento do processo como um todo: com a produção de partículas sólidas com propriedades semelhantes às obtidas em escala de laboratório, e de lipossomas com a agitação de alto cisalhamento.

Conclui-se portanto, de modo geral, que o processamento de lipídios através de secagem por atomização produz de modo eficiente medicamentos de liberação controlada tanto na forma sólida (membranas secas), quanto na forma líquida (lipossomas), sendo o aumento de escala viável.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Estudar o aumento de escala da produção de partículas lipídicas sólidas com o solvente etanol, utilizando como condições operacionais iniciais aquelas obtidas em escala laboratório;
2. Otimizar o processo em equipamento de escala piloto;
3. Testar as partículas lipídicas produzidas em dispositivos de inalação sólida para verificação da eficiência de inalação;
4. Testar *in vivo* os lipossomas e as partículas lipídicas produzidas para eficiência de ação;
5. Encapsular a Rifampicina e outros tuberculostáticos para testes de associações na terapia da tuberculose;
6. Comprovar o escalonamento direto da hidratação das partículas sólidas em equipamento piloto;
7. Estudar melhor a separação partículas-ar, talvez com a inclusão de dois ciclones em série.
8. Testar impelidor de alto cisalhamento com diâmetro do rotor maior.
9. Utilizar um modelo de ajuste para a liberação dos fármacos que considere a resistência da membrana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A., KANDPAL, H., GUPTA, H.P., SINGH, N.B., GUPTA, C.M. Tuftisin-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.38, p. 588-593, 1994.
- ARNAUD, J.P. Liposomes in the agro-food industry. **Agro-Food Industry Hi-Tech**, p.30-36, Setembro-Outubro, 1995.
- BARAS, B., BENOIT, M.-A., GILLARD, J. Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, n.1, p.133-145, 2000.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.R. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.
- BOT, A., DELLAMARY, L., SMITH, D., WOODS, C.M. Engineered spray-dried lipid-based microparticles for cellular targeting. **U.S. Patent** appl. n. 20020103165, 1 de agosto de 2002.
- BURGER, A., HENCK, J.O., HETZ, S., ROLLINGER, J.M., WEISSNICHT, A.A., STÖTTNER, H. Energy/temperature diagram and compression behavior of the polymorphs of D-mannitol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, n.4, p.457-468, 2000.
- CAFISO, D.S., PETTY, H.R., Mc CONNELL, H.M. Preparation of unilamellar lipid vesicles at 37°C by vaporization methods. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.649, p.210-214, 1979.
- CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorous. **Analytical Chemistry**, v.28, n.11, p.1756-1758, 1956.
- COLEMAN, N.J., CRAIG, D.Q.M. Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.135, p.13-29, 1996.

- 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.
- CRUZ, M.E.M. Lipossomas: vesículas mágicas ou simples utopia? **Biotecnologia e Saúde**, p.3-16, 1996.
- DRAPER, N.R., SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. John Wiley &sons Inc., 2nd Edition, 1981.
- GANTER, S., VOLKER, K.M. Process for liposomes or proliposomes. **U.S.Patent appl.** n. 35035, 1997.
- GOLDBACH, P., BROCHART, H., STAMM, A. Spray-drying of liposomes for a pulmonary administration. I. Chemical stability of phospholipids. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.19, n.19, p.2611-2622, 1993i.
- GOLDBACH, P., BROCHART, H., STAMM, A. Spray-drying of liposomes for a pulmonary administration. II. Retention of encapsulated materials. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.19, n.19, p.2623-2636, 1993ii.
- GRIT, M., CROMMELIN, J.A. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. **Chemical and Physics of Lipids**, v.64, p.3-18, 1993.
- GUY, R.H., HADGRAFT, J., KELLAWAY, I.W., TAYLOR, M.J. calculations of drug release rates from spherical particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.11, p. 199-207, 1982.
- HANCOCK, B.C., ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86, n.1, p.1-12, 1997.
- JOHANSEN, P., MERKLE, H.P., GANDER, B. Technological aspects related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 413-417, 2000.
- KERK, J., SRCIC, S. Thermal analysis of glassy pharmaceuticals. **Thermochemica Acta**, v.248, p.81-95, 1995.
- KIBBE, A.H. **Handbook of Pharmaceuticals Excipients**. London: APPA, third edition, 2000.

- KIKUCHI, H., YAMAUCHI, H., HIROTA, S. A spray-drying method for mass production of liposomes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n.6, p.1522-1527, 1991.
- KIKUCHI, H., YAMAUCHI, H., YACHI, K., HIROTA, S. **Symposium in the 107th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan**, Kyoto, April 1987.
- KIM, J.C., KIM, J.D. Preparation by spray-drying of amphotericin B-phospholipid composite particles and their anticellular activity. **Drug Delivery**, v.8, p.143-147, 2001.
- KIRBY, C., GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v.2, p. 979-984, 1984.
- KLAUDT, K. TB:groups at risk. **WHO-Report on the Tuberculosis Epidemic**, Geneva, 1996.
- KOGA, H., MIYAZAKI, Y., KOHNO, S., HARA, K. A drug delivery system and biological response modifiers for the treatment of mycobacterial infection. **Kekkaku**, v.69, n.2, p.113-118, 1994.
- KOHANE, D.S., LIPP, M., LANGER, R.S. Lipid-protein-sugar particles for drug delivery. **U.S. Patent** appl. n. 20020150621, 17 de outubro de 2002.
- KREMER, J.M.H., VD ESKER, M.W.J., PATHMAMANOCHARAN, C., WIERSEMA, P.H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. **Biochemistry**, v.16, n.17, p.3932-3935, 1977.
- KURUNOV, I.U.N., URSOV, I.G., KRASNOV, V.A., PETRENKO, T.I., IAKOVCHENKO, N.N., SVISTELNIK, A.V., FILIMONOV, P.A. Effectiveness of liposomal antibacterial drugs in the inhalation therapy of experimental tuberculosis. **Problemy Tuberkuleza**, v.1, 38-40, 1995.
- LASIC, D.D. **Liposomes: from physics to applications**. Amsterdam: Elsevier, 1993.
- LIMA, H.O.S. **Estudo do encapsulamento de medicamentos para o primeiro tratamento da tuberculose em ciclodextrinas e lipossomas**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 2001. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

- MALCOLMSON, R.J., EMBLETON, J.K. Dry powder formulations for pulmonary delivery, **PSST**, vol.1, n.9, 1998.
- MASSARANI, G. **Fluidodinâmica em sistemas particulados**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1997.
- MASTERS, K. **Spray drying – an introduction to principles, operational practice and applications**. London: Leonard Hill Books, 1972.
- NAKAJIMA, H. Fighting disease fostering development. **WHO: The World Health Report**, Genebra, 1996.
- NEW, R.R.C. **Liposomes: a practical approach**. New York: IRL Press, 1989.
- NUNHEZ, J.R. **Agitação e mistura na indústria**. Campinas: FEQ, Unicamp, 2002. Curso de extensão.
- O'HARA, P., HICKEY, A.J. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.8, p.955-961, 2000.
- ONEDA, F., RÉ, M.I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. **Powder Technology**, v.130, p.377-384, 2003.
- PALMIERI, G.F., WEHRLÉ, P., STAMIN, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug-release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.20, n.18, p.2859-2879, 1994.
- PERRETT, S., GOLDING, M., WILLIAMS, W.P. A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.43, p.154-161, 1991.
- REDZINIAK, G., MEYBECK, A. Production of pulverulent mixtures of lipidic and hydrophobic constituents. **U.S. Patent** n. 4508703, appl. n. 465598, 2 de abril de 1985.
- REDZINIAK, G., PERRIER, P., MARECHAL, C. Liposomes at the industrial scale. In: PHILIPPOT, J.R., SCHUBER, F. **Liposomes as tools in basic research and industry**. Boca Raton: CRC Press, cp. 4, p. 59-67, 1995.

- RUFFINO NETTO, A. Tuberculose MDR, **Médicos (HC-FMUSP) – Doenças Emergentes e Reemergentes**, ano I, n.3, 1998.
- SCARPA, M.V., OLIVEIRA, A.G. Estrutura e propriedades físico-químicas de lipossomas. **Infarma**, v.7, p.4-7, 1998.
- SHERRIS, J.C. **Medical Microbiology: an Introduction to Infectious Disease**. Prentice Hall International, 2nd Edition, 1990.
- SINITI, M., JABRANE, S., LÉTOFFÉ, J.M. Study of the respective binary phase diagrams of sorbitol with manitol, maltitol and water. **Thermochimica Acta**, v.325, p.171-180, 1999.
- SKALKO-BASNET, N., PAVELIC, Z., BECIREVIC-LACAN, M. Liposomes containing drug and cyclodextrin prepared by the one-step spray-drying method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.12, p.1279-1284, 2000.
- SMITH, J.M., VAN NESS, H.C. **Introdução a Termodinâmica da Engenharia Química**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
- STRONG, B.E., KUBICA, G.P. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*. A guide for the level II laboratory. **Public Health Service**, Atlanta, Georgia, 1981.
- VESPAL, A.L. In: **Procedures for the isolation and identification of mycobacteria**. Center for disease control and prevention. CDC, p.8230, 1981.
- VLADIMIRSKI, M.A., LADIGINA, G.A. Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Biomedicine**, v.36, p.375-382, 1982.
- WEERS, J.G., TARARA, T.E., DELLAMARY, L.A., RIESS, J.G., SCHUTT, E.G. Phospholipid-based powders for drug delivery. **U.S. Patent appl. n. 20020037316**, 28 de março de 2002.
- WHO. **The World Health Report – Fighting Disease Fostering Development**, Genebra: World Health Organization, 1996.

- WILLIAMS, P. Liposomes and the pro-liposome method. **SÖFW Journal**, v.118, p.377-378, 1992.
- YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.48, p.27-42, 2001.
- YU, L., MISHRA, D.S., RIGSBEE, D.R. Determination of the glass properties of D-mannitol using sorbitol as an impurity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.87, n.6, p.774-777, 1998.

Anexo I

Neste anexo são apresentadas as curvas de calibração obtidas no ensaio fosfato, para a quantificação do lipídio (Figura I), e para a Isoniazida e Pirazinamida com e sem etanol, para a quantificação do fármaco nas amostras (Figuras II, III, IV e V, respectivamente).

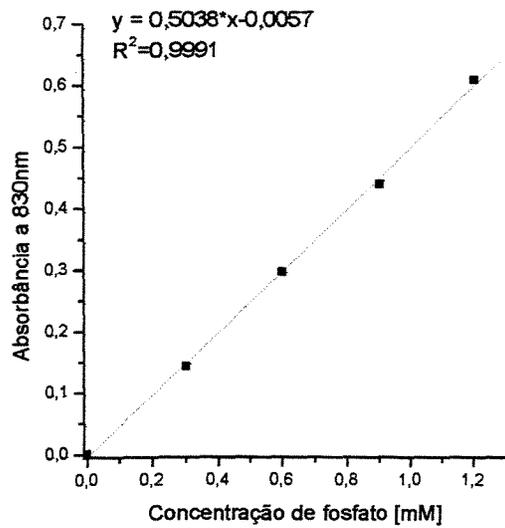


Figura I: Curva de calibração para a determinação da concentração do lipídio.

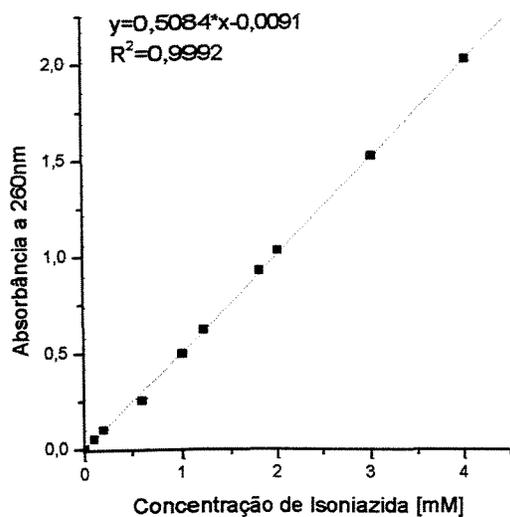


Figura II: Curva de calibração para a determinação da concentração de Isoniazida a partir da reação com etanol.

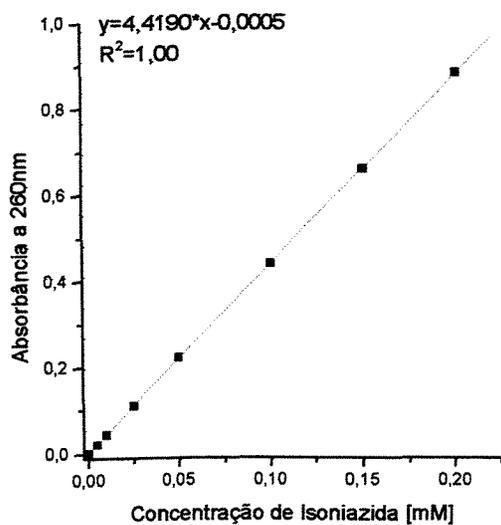


Figura III: Curva de calibração para a determinação da concentração de Isoniazida

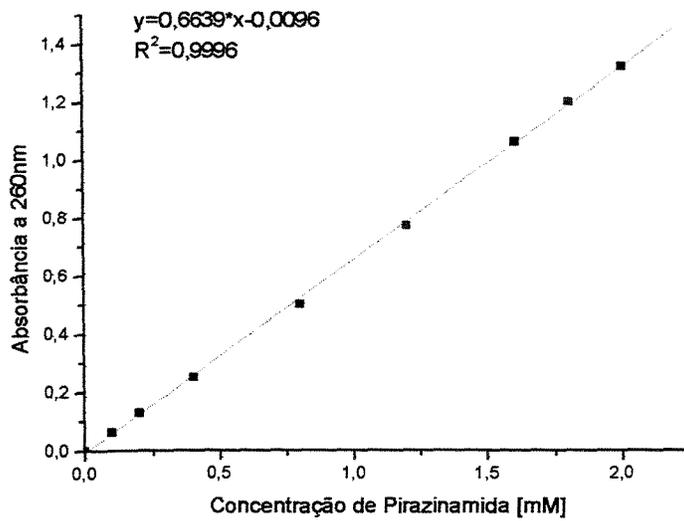


Figura IV: Curva de calibração para a determinação da concentração de Pirazinamida a partir da reação com etanol.

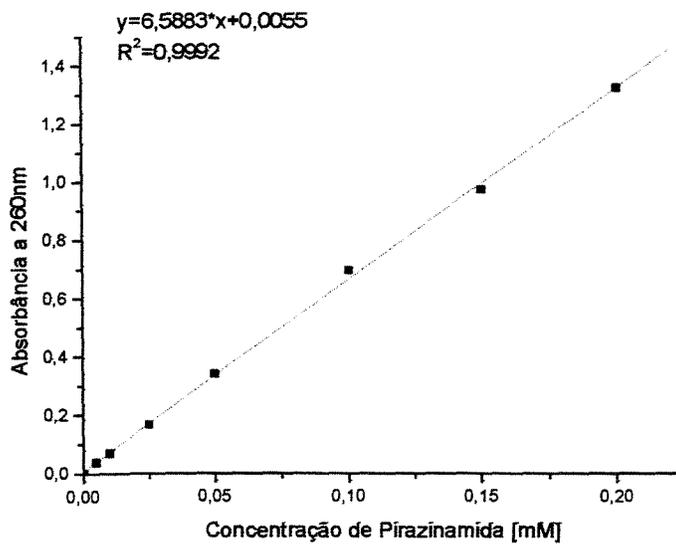


Figura V: Curva de calibração para a determinação da concentração de Pirazinamida.

Anexo II

Modelo da difusão de solutos no interior de esferas porosas

O processo de difusão dos fármacos do interior de partículas sólidas e lipossomas é apresentado na Figura VI.

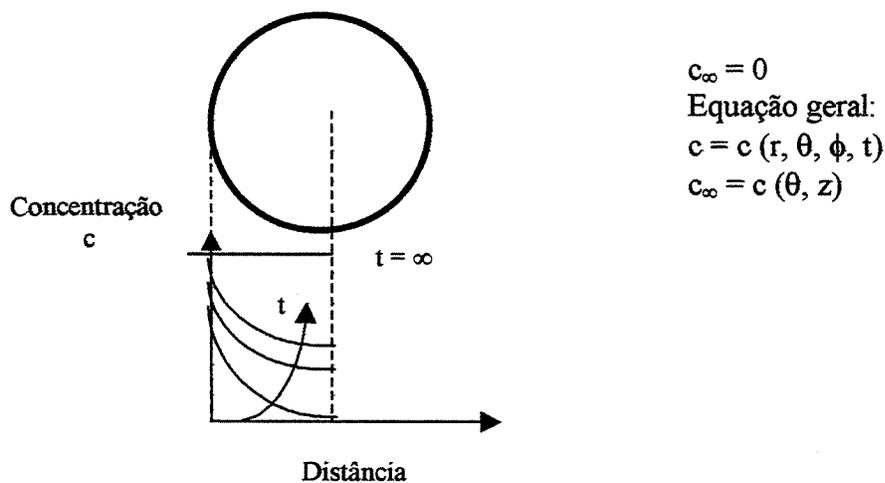


Figura VI: Modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas.

Nesse modelo considerou-se as seguintes hipóteses:

- A extração do soluto das esferas ocorre por difusão;
- A concentração do solvente não se altera e é sempre nula: $c_{\infty} = 0$ (o que significa em termos práticos que a quantidade de solvente é tão alta que o soluto extraído deixa apenas traços de concentração no solvente);
- A difusão é do interior das esferas sólidas para o solvente;
- O coeficiente de transferência de massa entre o sólido e o fluido é muito elevado;

- A concentração no exterior das esferas é igual a concentração do solvente:

$$c(r = R) = c_{\infty} = 0 \text{ (condição de contorno do modelo)}$$

- Na prática c_{∞} é constante e uniforme para uma certa esfera (e não no trecho da coluna que contém as partículas);
- Existe simetria em θ e ϕ , $\Rightarrow c = c(r, t)$;
- Propriedades físicas permanecem uniformes e constantes.

Como a difusão ocorre no interior das esferas sólidas, a equação geral para a difusão sem reação química é:

$$D\nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} + \text{div}(c \vec{v}) \quad (\text{Eq. 35})$$

Como o material é sólido: $\vec{v} = 0$, logo:

$$D\nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (\text{Eq. 36})$$

Para coordenadas esféricas:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \frac{\partial c}{\partial t} \quad (\text{Eq. 37})$$

As condições de contorno são:

$$\text{cc1} \rightarrow \text{(condição inicial)} \quad t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad c(r, t) = c_{\text{int}} \quad (\text{Eq. 38})$$

$$\text{cc2} \rightarrow t > 0, \quad t > 0, \quad r = R \quad c(R, t) = c_{\infty} = 0 \quad (\text{Eq. 39})$$

cc3 $\rightarrow c(r,t)$ é um valor finito para $0 \leq r \leq R$ (Eq. 40)

Utilizando o método de separação das variáveis:

$$c(r,t) = R(r)\theta(t) \quad (\text{Eq. 41})$$

$$\frac{\partial c}{\partial r} = R'(r)\theta(t) \quad (\text{Eq. 42})$$

$$\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = R''(r)\theta(t) \quad (\text{Eq. 43})$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = R(r)\theta'(t) \quad (\text{Eq. 44})$$

Substituindo na equação diferencial parcial (Eq. 37), tem-se:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} [r^2 R'(r)\theta(t)] = \frac{1}{D} R(r)\theta'(t) \quad (\text{Eq. 45})$$

$$\frac{1}{r^2} [2rR'\theta(t) + r^2 R''(r)\theta(t)] = \frac{1}{D} R(r)\theta'(t)$$

$$\frac{1}{r^2} [2rR'\theta + r^2 R''\theta] = \frac{1}{D} R\theta' \quad (\text{Eq. 46})$$

Dividindo por $c = RS \neq 0$, obtém-se:

$$\frac{1}{r^2} \frac{1}{R} [2rR' + r^2 R''] = \frac{1}{D} \frac{\theta'}{\theta} = -\lambda \quad (\text{constante}) \quad (\text{Eq. 47})$$

λ é uma constante, $\lambda > 0$, porque $\lim_{t \rightarrow \infty} c(t)$ é valor finito. Pode-se então separar as equações:

$$r^2 R'' + 2rR' + \lambda^2 r^2 R = 0 \quad (\text{Eq. 48})$$

$$\theta' + \lambda D\theta = 0 \quad (\text{Eq. 49})$$

A partir da equação (49):

$$\theta(t) = A \exp(-\lambda Dt) \quad (\lambda > 0 \text{ pela cc3}) \quad (\text{Eq. 50})$$

$$\text{Quando: } \lambda = 0 \Rightarrow \theta(t) = A \text{ (constante).} \quad (\text{Eq. 51})$$

A partir da equação (48):

$$r^2 \frac{d^2 R}{dr^2} + 2r \frac{dR}{dr} + \lambda r^2 R = 0 \quad (\text{Eq. 52})$$

$$\text{Definir } y = rR \Rightarrow R(r) = \frac{y(r)}{r} \quad (\text{Eq. 53})$$

$$\frac{dR}{dr} = \frac{1}{r} y' - \frac{1}{r^2} y \quad (\text{Eq. 54})$$

$$\frac{d^2 R}{dr^2} = \frac{1}{r} y'' - \frac{2}{r^2} y' + \frac{2}{r^3} y \quad (\text{Eq. 55})$$

Substituindo as equações (53), (54) e (55) na equação (52), tem-se:

$$r^2 \left(\frac{1}{r} y'' - \frac{2}{r^2} y' + \frac{2}{r^3} y \right) + 2r \left(\frac{1}{r} y' - \frac{1}{r^2} y \right) + \lambda r^2 \frac{y}{r} = 0 \quad (\text{Eq. 56})$$

$$ry'' - 2y' + \frac{2y}{r} + 2y' - \frac{2y}{r} + \lambda ry = 0 \quad (\text{Eq. 57})$$

$$y'' + \lambda y = 0 \quad (\text{Eq. 58})$$

$$\text{Para } \lambda = 0, \quad y = B_0 r + c_0 \quad \text{ou} \quad Rr = B_0 r + c_0 \Rightarrow R = B_0 + \frac{c_0}{r} \quad (\text{Eq. 59})$$

$$\lambda > 0, \quad y = B_\lambda \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \text{cos}(\sqrt{\lambda} r) \quad (\text{Eq. 60})$$

$$\text{ou } R = \frac{1}{r} [B_\lambda \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \text{cos}(\sqrt{\lambda} r)] \quad (\text{Eq. 61})$$

Pela condição de contorno cc3 $\Rightarrow C(r,t)$ é finita.

$$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{1}{r} = +\infty \quad \text{e} \quad \lim_{r \rightarrow 0} \text{sen} \frac{(\sqrt{\lambda} r)}{r} = \sqrt{\lambda} \quad (\text{Eq. 62})$$

$$\text{Portanto: } c_0 = 0 \text{ e } c_\lambda = 0 \quad (\text{Eq. 63})$$

Logo:

$$c(r,t), \quad A_0 = B_0 A \quad (\lambda = 0) \quad (\text{solução em regime permanente}) \quad (\text{Eq. 64})$$

$$A_\lambda \exp(-\lambda Dt) \frac{1}{r} \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) \quad (\lambda > 0) \quad (\text{solução em regime transiente}) \quad (\text{Eq. 65})$$

Como num tempo infinito a concentração no interior da esfera é nula, então $A_0 = 0$.

$$\text{Pela cc1, } t = 0 \quad \forall r \quad c(r,0) = c_{\text{int}} \quad (\text{Eq. 66})$$

$$\text{Pela cc2, } t > 0 \quad r = R \quad c(R,t) = 0 \quad (\text{Eq. 67})$$

$$\text{Ou, } A_\lambda \exp(-\lambda Dt) \frac{1}{R} \text{sen}(\sqrt{\lambda} R) = 0 \quad (\text{Eq. 68})$$

$$\text{Para a solução não trivial isto só é possível se } \sqrt{\lambda} R = n\pi, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{Eq. 69})$$

$$\lambda = \left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{Eq. 70})$$

$$c(r, t) = A_n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{Eq. 71})$$

Pela superposição das soluções:

$$c(r, t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \quad (\text{Eq. 72})$$

$$\text{Pela cc1: } c(r, 0) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) = c_{\text{int}} \quad (\text{Eq. 73})$$

Multiplicando por “r”:

$$\sum_{n=1}^{\infty} A_n \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{a}\right) = c_{\text{int}} r \quad 0 \leq r \leq a \quad (\text{Eq. 74})$$

A solução da equação (74) é uma série de Fourier de senos, onde:

$$A_n = \frac{2}{R} \int_0^R (c_{\text{int}} r) \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{a}\right) dr = \frac{-2Rc_{\text{int}}(-1)^n}{n\pi} \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{Eq. 75})$$

$$c(r, t) = -\sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{2R}{n\pi} c_{\text{int}} \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \quad (\text{Eq. 76})$$

Ou, rearranjando:

$$c(r, t) = -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{\frac{n\pi r}{R}} \quad (\text{Eq. 77})$$

Considerando “N” partículas, a quantidade total do soluto difundido no solvente é dada por:

$$c(t) = N \int_0^R c(r, t) 4\pi r^2 dr = N \left[-2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{r} 4\pi r^2 dr \right] \quad (\text{Eq. 78})$$

De (78) tem-se que:

$$c(t) = -N 8\pi c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) r dr \quad (\text{Eq. 79})$$

$$= -8\pi c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \left[\frac{-r \cos\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{\frac{n\pi}{R}} - \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2} \right]_0^R \quad (\text{Eq. 80})$$

$$= -8\pi N c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \left[\frac{-R \cos n\pi}{\frac{n\pi}{R}} \right] \quad (\text{Eq. 81})$$

$$= 8\pi N c_{\text{int}} R^3 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{2n} \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right]}{n^2 \pi^2} \quad (\text{Eq. 82})$$

$$= \frac{8\pi N c_{\text{int}} R^3}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 83})$$

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = A^* \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 84})$$

$$\text{Quando } t = 0 \quad \frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = 1 = A^* \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \quad (\text{Eq. 85})$$

Significa que todo o solvente está no interior das "N" esferas, logo

$$c(t) = c_{\text{int}} \quad \text{e sendo:} \quad \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} = \frac{\pi^2}{6}$$

$$1 = A^* \frac{\pi^2}{6}, \quad \text{logo} \quad A^* = \frac{6}{\pi^2} \quad (\text{Eq. 86})$$

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 87})$$

A concentração de fármaco difundido ao meio será:

$$c^*(t) = \frac{4\pi R^3 [c_{\text{int}} - c(t)] N}{3V} \quad (\text{Eq. 88})$$

A concentração total de fármaco no interior das esferas, expressa por unidade de volume do meio, é:

$$c^*_{\text{int}} = c_{\text{int}} \left(\frac{4\pi R^3 N}{3V} \right) \quad (\text{Eq. 89})$$

Onde: V = volume do meio e N = número de esferas do meio, logo:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 90})$$

A equação (90) corresponde ao modelo já calculado por Guy e colaboradores [1982].