UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido
ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença
de Chagas**

Mayara Garcia Trevisani

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido
ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença
de Chagas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Mayara Garcia Trevisani

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana
Maldonado Marchetti**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 18/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Trevisani, Mayara Garcia

Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença de Chagas. Ribeirão Preto, 2014.

83p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Ácido ursólico. 2. Lipossomas. 3. Sistemas de liberação.
4. Doença de Chagas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayara Garcia Trevisani

Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença de Chagas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha família,
Em especial aos meus pais,
Pelo amor incondicional e por
Incentivarem meus estudos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À professora e orientadora Juliana Maldonado Marchetti, pela oportunidade do mestrado, sendo fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho e pela experiência e aprendizado transmitidos.

Aos amigos e colegas de laboratório pelo apoio e companheirismo. Gostaria de agradecer ao amigo e colega de trabalho Josimar de Oliveira Eloy por sua colaboração neste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de tecnologia farmacêutica da FCFRP-USP: José Orestes (pela alegre convivência), Fabíola Praça e Henrique Diniz, por todo apoio profissional, paciência e companheirismo de vocês.

Aos técnicos da FCFRP-USP José Clovis do Prado Júnior e Áurea Lanchote pela ajuda com as análises de FTIR e DSC, e à Cristiana Gonçalves pelo suporte com os experimentos em cultura de células no laboratório de parasitologia.

Aos técnicos da FMRP-USP José Augusto Maulim e Tuca Ferreira, do laboratório de Microscopia Eletrônica, pelas análises de MET, sob a responsabilidade da Profa. Maria Célia Jabour.

Aos professores Renata Fonseca Vianna Lopez e Luis Alexandre Pedro de Freitas, por me permitirem usar seus laboratórios.

Aos professores Luis Alexandre Pedro de Freitas, Priscyla Marcato e Cristiane Masetto de Gaitani, pela importante contribuição na qualificação deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro.

Às vezes as coisas não saem como você quer ou como esperava.

Às vezes o mais importante é o caminho que você percorre

E o esforço que faz para chegar ao seu objetivo.

Muitas vezes ganhar é desfrutar seu esforço e dedicação a seu objetivo.

RESUMO

TREVISANI, M.G. **Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença de Chagas.** 2014. 83p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* representa um grave problema de saúde pública na América Latina e cada vez mais em todo o mundo, afetando principalmente regiões de baixo poder aquisitivo, e por isso negligenciada pela indústria farmacêutica. Atualmente apenas um fármaco está disponível, o benzonidazol, o qual apresenta eficácia limitada e está associado a diversos efeitos colaterais. Estudos recentes demonstraram atividade tripanocida do ácido ursólico, entretanto sua utilização é limitada pela alta hidrofobicidade, sendo o uso dos nanocarreadores lipossomais reconhecido como uma estratégia promissora para solucionar tal limitação, além de serem sistemas altamente versáteis e biocompatíveis. Neste trabalho, foram desenvolvidos lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol contendo ácido ursólico pela técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico seguida de sonicação, permitindo a obtenção de vesículas unilamelares e com baixa polidispersividade. A partir da avaliação preliminar da estabilidade das dispersões, a adição do colesterol na razão molar 10:1 fosfatidilcolina:colesterol foi essencial para a manutenção do conteúdo encapsulado quando a formulação foi estocada em temperatura ambiente e melhor retenção do conteúdo a 4°C (90%). Após a liofilização o emprego de sucrose na razão molar 1:10 lipídeo:açúcar, a formulação manteve o tamanho e distribuição de tamanho e impediu a agregação das vesículas. A formulação obtida foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão, apresentando diâmetro entre 100 e 120 nm, também observado pelo espalhamento dinâmico da luz. As análises por espectroscopia no infravermelho e calorimetria exploratória diferencial demonstraram uma forte interação do fármaco com a membrana fosfolipídica por interações de hidrogênio, assim como uma menor mobilidade das cadeias lipídicas e formação de uma matriz vítrea a qual foi responsável pela efetiva crioproteção das vesículas. Estudo *in vitro* do perfil de liberação do fármaco a partir dos lipossomas pela técnica da diálise resultou em alta retenção do conteúdo encapsulado e uma liberação sustentada deste. A partir de ensaio biológico *in vitro* empregando azul de trypan, a formulação liofilizada contendo ácido ursólico se mostrou segura até a concentração em que seria necessária para carrear 32 μ M do fármaco, considerando a linhagem de mamíferos *LLC-MK2*. Em relação à atividade tripanocida em linhagem da cepa CL da forma epimastigota empregando MTT, o lipossoma contendo o fármaco foi capaz de causar morte celular do parasita em 100%, considerando-se um possível efeito sinérgico do ácido ursólico e o colesterol, cuja seletividade à membrana do parasita tem sido recentemente demonstrada. Contudo apenas a formulação contendo o ácido ursólico apresentou índice de seletividade aceitável, o que está relacionado com o efeito citoprotetor do ácido ursólico.

Palavras-chave: Ácido Ursólico, Lipossomas, Sistemas de liberação de fármacos, Doença de Chagas.

ABSTRACT

TREVISANI, M.G. **Potencial use of liposomal systems containing ursolic acid for the treatment optimization of Chagas Disease.** 2014. 83p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chagas disease caused by *Trypanosoma cruzi* is a serious public health problem in Latin America and is an increasing disease around the world, mainly affecting regions with low purchasing power, and therefore Chagas disease is considered neglected by the pharmaceutical industry. Today, only one product is available, benznidazole, which has limited efficacy and is associated with several side effects. Recent studies have shown trypanocidal activity of ursolic acid, however its use is limited by the high hydrophobicity. The use of liposomal nanocarriers is recognized as a promising strategy to address this limitation and they are highly versatile and biocompatible systems. In this study, ursolic acid loaded phosphatidylcholine and cholesterol liposomes were developed using the solvent evaporation and lipid film hydration technique followed by sonication, allowing unilamellar vesicles formation with low polydispersity. From the preliminary assessment of the dispersion stability, the addition of cholesterol allowed the encapsulation efficiency maintenance when the formulation was stored at room temperature and better drug retention at 4°C (90%). After lyophilization employing sucrose 1:10 lipid:sugar molar ratio, the formulation maintained the size and size distribution and vesicle aggregation was prevented. The formulation obtained was characterized by transmission electron microscopy, with diameter between 100 and 120 nm, also observed by dynamic light scattering. The analysis by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry showed a strong hydrogen interaction between ursolic acid and the phospholipid membrane, as well as a lower mobility of the lipid chains and glassy matrix formation which was responsible for the effective cryoprotection. In vitro drug release profile from liposomes by dialysis technique resulted in high retention of the encapsulated content and a sustained release. From in vitro biological assay using trypan blue, the ursolic acid loaded lyophilized liposomes proved to be safe up to a concentration that would be required to carry 32 μ M of the drug, considering the LLC-MK2 mammals cell line. Regarding the trypanocidal activity of epimastigotes CL strain by MTT technique, the ursolic acid loaded liposomes showed greater efficacy than blank liposome able to causing 100% of parasite cell death, considering a possible synergism effect of ursolic acid and cholesterol, whose selectivity to the parasite membrane has been recently demonstrated. However, only the formulation containing ursolic acid showed acceptable selectivity index, which is related to the ursolic acid cytoprotective effect.

Keywords: Liposomes, Ursolic Acid, Drug Delivery Systems, Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Ciclo biológico do <i>Trypanossoma cruzi</i> (inseto – hospedeiro)	3
Figura 02.	a) Tripomastigotas circulantes, fase aguda e b) amastigotas no interior de macrófagos, fase crônica da doença de Chagas	4
Figura 03.	Estrutura química do ácido ursólico	6
Figura 04.	Corte transversal de um lipossoma – representação esquemática dos locais de solubilização de substâncias de diferentes polaridades	8
Figura 05.	Estrutura química da molécula de fosfatidilcolina	8
Figura 06.	Representação esquemática da transição da fase gel, caracterizada pelo movimento restrito e ordenado da estrutura lamelar, cujas cadeias apolares apresentam conformação “toda-trans; para a fase cristal-líquido, cuja estrutura lamelar se encontra em um estado desordenado e os radicais hidrofílicos hidratados.....	9
Figura 07.	Estrutura química da molécula do colesterol	10
Figura 08.	Diagrama representativo do potencial zeta (ζ) – representação esquemática das condições de uma superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos	14
Figura 09.	Representação gráfica do comportamento de fase de membranas lipídicas e o efeito do colesterol – O colesterol aumenta a permeabilidade da membrana na fase gel e a reduz na fase fluida.....	16
Figura 10.	Representação esquemática do processo de preparo dos lipossomas pela técnica da hidratação do filme lipídico.....	29
Figura 11.	Representação esquemática do dispositivo Amicon utilizado na centrifugação das dispersões lipossomais.....	31
Figura 12.	Representação esquemática do aparato utilizado no estudo do perfil de liberação do ácido ursólico pelo método da diálise – tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta	36
Figura 13.	Representação esquemática de cromatogramas obtidos a partir análises de lipossomas preparados com tampão fosfato 30 mM pH 7,4, diluídos em acetonitrila (1:3 v/v). a) Lipossomas isentos de AU. b) Lipossomas contendo AU	40

- Figura 14.** Representação esquemática de cromatogramas obtidos a partir das análises de alíquotas do meio de dissolução (tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e poloxamer 2,0%). a) Meio de dissolução isento de AU diluído em acetonitrila (1:3 v/v). b) Meio de dissolução contendo AU, sem diluição prévia..... 41
- Figura 15.** Curva analítica do ácido ursólico em acetonitrila (concentrações de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtida para estudo de linearidade do método para determinação da eficiência de encapsulação de AU em lipossomas e quantificação do AU no meio de dissolução utilizando CLAE 42
- Figura 16.** Representação gráfica da influência da variável PC:AU lipídeo:fármaco no diâmetro médio e eficiência de encapsulação (%) do AU pelos lipossomas 45
- Figura 17.** Representação gráfica da influência da variável PC:CHOL fosfatidilcolina: colesterol no diâmetro médio e eficiência de encapsulação (%) do AU pelos lipossomas 46
- Figura 18.** Representação gráfica do tamanho e distribuição do tamanho de partícula de uma formulação contendo AU preparada a partir de PC na razão molar PC:AU 30:1, obtida por espalhamento dinâmico da luz 47
- Figura 19.** Representação gráfica do tamanho e distribuição do tamanho de partícula de uma formulação contendo AU preparada a partir de PC e CHOL na razão molar PC:CHOL 30:1, obtida por espalhamento dinâmico da luz..... 47
- Figura 20.** Representação gráfica da estabilidade físico-química da formulação lipossomal na razão 30:1 PC:AU em a) ausência e b) presença do colesterol (razão 10:1 PC:CHOL) – perfil da quantidade de ácido ursólico encapsulada ao longo de 30 dias, em geladeira a $4\pm5^{\circ}\text{C}$ e em temperatura ambiente de 25°C 49
- Figura 21.** Fotomicrografias dos lipossomas de PC:CHOL razão molar 10:1, contendo ácido ursólico na razão 30:1 PC:AU e liofilizados com sucrose na proporção 1:10 lipídeos:sucrose resuspenso em água purificada (1:1000 m/v), obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, tratadas com solução de contraste de acetato de uranila 2,0%. Aumentos: a) 50.000. b) 80.000. c) 100.000. d) 200.000 vezes..... 55
- Figura 22.** Representação gráfica dos espectros de absorção no infravermelho. Varreduras de $4500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, resolução de 2 cm^{-1} . a) Ácido ursólico. b) Colesterol. c) Sucrose. d) Fosfatidilcolina de soja e) Lipossoma contendo ácido ursólico liofilizados com sucrose razão 1:10 lipídeos:sucrose (LIO LIPSUC04) 56

- Figura 23.** Representação gráfica das curvas de DSC. Razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$. Faixa de temperatura de $25\text{-}300^{\circ}\text{C}$. a) Ácido ursólico. b) Colesterol. c) Sucrose. d) Lipossoma branco de fosfatidilcolina. e) Lipossoma contendo ácido ursólico (LIO LIPSUC04)..... 59
- Figura 24.** Representação gráfica do perfil de dissolução do ácido ursólico livre, agitação por aparato de minipá e filtro de membrana $0,45\text{ }\mu\text{m}$, e do perfil de liberação do ácido ursólico encapsulado nos lipossomas, obtido pelo método da diálise através de tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado a aparato de cesta. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Quantificação por CLAE. 64
- Figura 25.** Citotoxicidade em linhagem celular LLC-MK2 do ácido ursólico em lipossomas de PC/CHOL liofilizados com e sem crioprotetor (crio) em relação ao grupo controle (lipossoma branco, com e sem crioprotetor), após 72 horas de incubação em estufa a 37°C . Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão)..... 67
- Figura 26.** Atividade tripanocida do ácido ursólico encapsulado em lipossomas de PC/CHOL liofilizados com sucrose em relação ao lipossoma branco, em linhagem da cepa CL BRENER de *T. cruzi* na forma epimastigota, após 72 horas de incubação em estufa BOD a 27°C . Os resultados foram expressos como porcentagem de morte celular (média $\pm$ desvio padrão)..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição dos lipossomas contendo ácido ursólico, obtidos pela técnica de evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico.....	30
Tabela 2 –	Composição dos lipossomas na razão molar ideal, contendo ou não sucrose, obtidos pela técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico, submetidos ao processo de liofilização	33
Tabela 3 –	Resultados da estabilidade físico-química dos lipossomas de fosfatidilcolina cotendo ácido ursólico, na ausência do colesterol, armazenados ao longo de 30 dias a 4±5°C e 25°C	51
Tabela 4 –	Resultados da estabilidade físico-química dos lipossomas de fosfatidilcolina cotendo ácido ursólico, na presença do colesterol, armazenados ao longo de 30 dias a 4±5°C e 25°C.....	51
Tabela 5 –	Avaliação do efeito crioprotetor sobre o diâmetro médio e distribuição de tamanho, potencial zeta e conteúdo encapsulado, antes e após a liofilização.....	53
Tabela 06 –	Valores de entalpia e temperatura onset obtidos através da análise calorimétrica	60
Tabela 07 –	Coeficiente de solubilidade do ácido ursólico em diferentes meios aquosos, realizado com excesso de fármaco (8,0 mg/4,00 mL) sob agitação magnética de 600 rpm durante 24 horas, temperatura controlada de 37°C e quantificação por CLAE	62
Tabela 08 –	Diâmetro médio e distribuição do diâmetro dos lipossomas liofilizados, após a resuspensão (1:1000 m/v) em água purificada ou meio empregado no estudo de liberação <i>in vitro</i> , obtidos por espalhamento dinâmico da luz.....	63
Tabela 09 –	Valores de IC ₅₀ e SI do lipossoma branco e do lipossoma contendo ácido ursólico em relação à linhagem celular de mamíferos LLC-MK2 e linhagem da cepa CL BRENER da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
AU	Ácido Ursólico
PC	Fosfatidilcolina
CHOL	Colesterol
EE	Eficiência de Encapsulação
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UV	Ultravioleta
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
TGA	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
CV	Coeficiente de Variação
r	Coeficiente de Correlação Linear
CMC	Concentração Micelar Crítica
$K_{O/A}$	Coeficiente de Partição octanol/água
PdI	Índice de Polidispersividade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
T_t	Temperatura de Transição de Fase

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2 Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas	4
1.3 Ácido ursólico.....	5
1.4 Lipossomas.....	7
1.4.1 Composição e propriedades físico-químicas.....	8
1.4.2 Classificação.....	10
1.4.3 Lipossomas como sistemas de liberação de fármacos.....	11
1.5 Caracterização físico-química.....	12
1.5.1 Tamanho e distribuição do tamanho	13
1.5.2 Potencial zeta.....	14
1.5.3 Encapsulação.....	15
1.5.4 Estabilidade físico-química	15
1.5.5 Liofilização e crioproteção	16
1.5.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	17
1.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	17
1.5.8 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	18
1.5.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	18
1.6 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	19
1.7 Citotoxicidade	20
1.8 Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23

3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	25
3.1.1 Substâncias químicas	25
3.1.2 Equipamentos e acessórios	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Método analítico para quantificação do ácido ursólico por CLAE	26
3.2.1.1 Seletividade	27
3.2.1.2 Linearidade e determinação da curva de liberação do ácido ursólico	27
3.2.2 Preparo dos lipossomas	28
3.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação de ácido ursólico nos lipossomas	30
3.2.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta das dispersões lipossomais	32
3.2.5 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta dos lipossomas liofilizados	32
3.2.6 Avaliação preliminar da estabilidade físico-química das dispersões lipossomais	32
3.2.7 Efeitos da liofilização e crioproteção	33
3.2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	33
3.2.9 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	34
3.2.10 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34
3.2.11 Determinação do meio de dissolução	34
3.2.12 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do ácido ursólico livre e a partir dos lipossomas	35
3.2.13 Ensaio biológico <i>in vitro</i>	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Método analítico para quantificação do ácido ursólico por CLAE	39
4.1.1 Seletividade	39
4.1.2 Linearidade e determinação da curva de calibração do ácido ursólico	41
4.2. Obtenção e caracterização físico-química dos lipossomas na ausência e presença do ácido ursólico	42
4.2.1 Influência das variáveis lipídeo:fármaco e lipídeo:colesterol no tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta e quantidade de ácido ursólico encapsulada	44
4.2.3 Avaliação preliminar da estabilidade físico-química da dispersão lipossomal na ausência e presença do colesterol	48
4.3 Efeitos da liofilização e crioproteção	52

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	54
4.5 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	55
4.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	58
4.7 Determinação do meio de dissolução	61
4.8 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do ácido ursólico livre e a partir dos lipossomas.....	63
4.9 Ensaio biológico <i>in vitro</i>	66
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS	74

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma patologia potencialmente fatal, atualmente reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. (Clayton, 2010; Trate Chagas, 2010; WHO, 2013). Foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que foi quem primeiro descreveu a doença clinicamente, porém, somente a partir da década de 60 que a patologia foi considerada um grave problema de saúde pública no Brasil. Seu agente etiológico, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, faz parte de um ecossistema exclusivamente americano, sendo transmitido aos seres humanos pelas fezes de triatomíneos hematófagos conhecidos popularmente como "barbeiros" (via vetorial), constituindo a maior causa de infecção (LAFEPE, 2007; Rassi et al., 2010).

Desde a antiguidade até os dias atuais, a doença de Chagas tem representado um grave problema sócio econômico, com cerca de 7 - 8 milhões de infectados em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica (Villalta et al., 2013; WHO, 2013). No Brasil são 2 milhões de infectados, com cerca de 150 a 200 novos casos por ano, principalmente na região nordeste, uma vez que as condições precárias de moradia contribuem de forma significativa para o desenvolvimento do triatomíneo (Morilla, 2010; Ribeiro et al., 2009).

O agente flagelado *Trypanosoma cruzi*, vivia restrito ao ambiente silvestre, circulando entre mamíferos e hemípteros. O homem, invadindo esses ecótopos, fez-se incluir no ciclo do hemíptero (LAFEPE, 2007). O ciclo biológico (Figura 1) envolve um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor), podendo ser encontrados na forma epimastigota (proliferativa no intestino do vetor), tripomastigota infectante (sangue e em cultura de células) e amastigota (replicação intracelular), a qual devido à sua difícil localização e detecção é a principal responsável por cerca de 50 mil mortes anuais (Romero et al., 2010; Rassi et al., 2010).

Em geral, a doença apresenta curso clínico variável, de acordo com as características do hospedeiro e da cepa infectante. A fase aguda é caracterizada por parasitemia detectável de tripomastigotas, podendo ser assintomática, e geralmente

é bem controlada pela resposta imune do hospedeiro. No entanto, os parasitas se encontram transitoriamente na corrente sanguínea, o que dificulta o diagnóstico.

Eventualmente, até 40% dos infectados desenvolvem a fase crônica, na qual amastigotas intracelulares causam danos estruturais irreversíveis ao coração, esôfago e/ou cólon. A infecção pode permanecer em silêncio por décadas ou durante toda a vida do indivíduo (forma indeterminada), podendo levar à morte súbita ou insuficiência cardíaca (CDC, 2011; WHO, 2011).

Figura 01. Ciclo biológico do *Tripanossoma cruzi* (inseto – hospedeiro) (Adaptado de Romero et al., 2010)

Nos últimos anos, houve um aumento da incidência de novos casos nos países desenvolvidos, sendo a principal forma de transmissão, a ingestão de água e alimentos contaminados com as fezes do barbeiro. Movimento em larga escala da população das zonas rurais para áreas urbanas da América Latina e outras regiões não endêmicas alterou a epidemiologia da doença, o que despertou maior interesse econômico (Trate Chagas, 2010; Villalta et al., 2013).

Entretanto a doença de Chagas ainda é considerada negligenciada (WHO, 2013) recebendo pouco investimento para pesquisa de novos fármacos e novos tratamentos, uma vez que acomete principalmente regiões de baixo poder aquisitivo,

sendo que apenas 1% do infectados recebe algum tipo de tratamento (Ribeiro et al., 2009).

Figura 02. a) Tripomastigotas circulantes, fase aguda e b) amastigotas no interior de macrófagos, fase crônica da doença de Chagas (Adaptado de Coura et al., 2007 e Parker & Sethi, 2011)

1.2 Medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas

Desde a década de 60 e 70, os únicos fármacos com comprovada eficácia para o tratamento da doença de Chagas são o Benzonidazol (Rochagan®, Roche) e o Nifurtimox (Lampit®, Bayer), ambos eficazes na cura da doença (80% dos casos), se administrados logo após a infecção, no início da fase aguda (Rassi et al., 2000). Com a proibição da comercialização do nifurtimox em razão da resistência apresentada pelas cepas e do desinteresse do laboratório farmacêutico, atualmente, o único medicamento utilizado para esta patologia é o Benzonidazol, cuja tecnologia e patente foram transferidas para o Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco – LAFEPE – atualmente o único laboratório no mundo que produz o medicamento (LAFEPE, 2007; WHO, 2013).

A terapêutica atual na forma farmacêutica de comprimido de liberação imediata requer administração de várias doses diárias durante longo período (entre 60 e 90 dias), dificultando a adesão do paciente. Além disso, a eficácia do tratamento diminui à medida que se aumenta o tempo da infecção, devido ao acesso ilimitado aos amastigotas intracelulares, ocasionando altos níveis de concentração plasmática, alta toxicidade e efeitos colaterais severos como dermatite, depressão

da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitose (BARRETT et al., 2003; WHO, 2013).

Diante do exposto, torna-se necessária uma quimioprofilaxia que seja eficaz em ambas as fases, aguda e crônica, e desprovida de efeitos colaterais. Como perspectivas futuras, o principal alvo das pesquisas é a atividade tripanocida, além do melhoramento de fármacos já existentes. Através da elucidação do genoma do *T. cruzi* (novos alvos bioquímicos) em 2005, candidatos a novos fármacos têm sido avaliados, sendo a maioria destas pesquisas incentivada por parcerias sem fins lucrativos, entre o governo e o setor privado, como a DNDi – Drugs Neglected Diseases Initiative (RIBEIRO, 2010). Como fruto dessa parceria, em 2011 foi aprovada pela ANVISA a forma pediátrica do benzonidazol, desenvolvida e comercializada pelo LAFEPE (Brasil, 2011).

Dentre estes possíveis candidatos, podemos citar os inibidores de protease, piridonas, nitroimidazóis, azóis, inibidores da síntese do esqualeno, inibidores da síntese do farnesil-pirofosfato, inibidores da síntese da dihidrofolato redutase, e os produtos naturais (Ribeiro et al., 2009; Clayton, 2010).

1.3 Ácido Ursólico

O ácido ursólico (AU) ou ácido 3 β -hidroxi-urs-12-em-28-óico (Figura 3) é um triterpenóide pentacíclico monohidroxilado, o qual normalmente surge associado ao seu isômero (ácido oleanólico). É um composto relativamente não tóxico, amplamente distribuído em diversas ervas e plantas medicinais de uso consagrado, como o ginseng (*Panax ginseng*), calêndula (*Calendula officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), melaleuca (*Melaleuca leucadendron*), entre outras (Liu, 2005; Ferreira et al., 2010).

Mais recentemente o interesse na pesquisa deste composto têm crescido devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas a atividade hepatoprotetora, (Liu, 1995), através da diminuição da necrose dos hepatócitos e aumento da regeneração celular (Jeong et al., 2005). Além desta, também foram relatadas, atividade antiinflamatória (Vasconcelos, 2006), antimicrobiana (Cunha, 2007), antineoplásica (Sethi et al., Wilson-Pereira et al., 2013) e cardioprotetora (Somova et al., 2003; Senthil, 2007). Além disso, o ácido ursólico tem seu uso já

consagrado na cosmética, por apresentar propriedade antioxidante (Haida et al., 2011; Yarosh et al., 2000 e de renovação celular pelo aumento da produção de colágeno e ceramidas (Both et al., 2002).

Estudos recentes realizados por Cunha et al (2006), Ferreira et al (2010) e Campos et al (2010) demonstraram atividade tripanocida destes triterpenos, a qual foi constatada pela presença dos grupamentos hidroxila e carboxila na molécula, sendo o ácido ursólico o que apresentou maior atividade antiparasitária, *in vitro* e *in vivo*, sugerida pela presença do grupamento metila em C19 da molécula do ácido ursólico (Ferreira et al., 2010).

Figura 03. Estrutura química do ácido ursólico

Apesar da ampla gama de atividades, os autores relatam a baixa solubilidade aquosa destes compostos, o que limita sua biodisponibilidade. Diversas estratégias farmacotécnicas têm sido utilizadas, como exemplo o uso de dispersões sólidas (Thi, 2003; Eloy et al., 2012) e a complexação com ciclodextrinas (Li et al., 2009) visando o aumento da biodisponibilidade pelo aumento da solubilidade destes compostos. Estudo realizado por Eloy et al (2012) demonstrou que dispersões sólidas contendo ácido ursólico foram capazes de aumentar a solubilidade aquosa e o perfil de dissolução do ácido ursólico, assim como o aumento da biodisponibilidade oral, fazendo o uso de carreadores hidrofílicos com propriedades tensoativas.

O uso de sistemas carreadores nanoestruturados como as nanosuspensões (Chen et al., 2005), nanoemulsões (Xi et al., 2009) e lipossomas (Zhong et al., 2012; Lopes et al., 2013) já foram estudados para os ácidos ursólico e oleanólico e os resultados foram promissores.

Especialmente em relação aos carreadores lipossômicos, diversos avanços foram alcançados, tanto no que diz respeito aos fenômenos físico-químicos envolvidos, quanto ao desenvolvimento de formulações mais estáveis, o que têm ampliado as perspectivas de emprego clínico destes sistemas.

1.4 Lipossomas

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas microscópicas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Sua natureza anfifílica permite encapsular substâncias hidrofílicas na cavidade interna aquosa; lipofílicas, entre as cadeias apolares da bicamada lipídica; assim como moléculas anfifílicas, ao longo de toda sua extensão (Figura 4) (Magalhães et al., 2007).

Bangham (1965) demonstrou pela primeira vez a capacidade dessas vesículas artificiais oferecerem barreiras para a difusão de solutos. Entretanto os primeiros resultados das pesquisas ficaram aquém das expectativas, principalmente devido à instabilidade físico-química e biológica dos lipossomas e pela baixa eficiência na encapsulação de fármacos. Posteriormente sua utilidade foi melhorada através de pesquisas que permitiram o aumento da estabilidade e a compreensão das características físico-químicas e interação com fluidos biológicos (Frézard et al., 2005). Os lipossomas ganharam bastante popularidade como modelos para estudos sobre as propriedades de membranas celulares e mais recentemente como carreadores de fármacos (Torchilin, 2005).

Uma das principais vantagens destes sistemas com relação a outros sistemas carreadores de fármacos é sua alta afinidade pelas membranas biológicas, facilitando sua interação com o meio biológico, especialmente quando estes são formados de lipídeos de origem natural. Além disso, são biodegradáveis, biocompatíveis, não imunogênicos e altamente versáteis para a pesquisa, uma vez que podem ser modificados quanto ao tamanho, lamellaridade, superfície, composição lipídica e volume e composição do meio aquoso interno (Lasic, 1998; Edwards et al., 2006).

Figura 04. Corte transversal de um lipossoma – representação esquemática dos locais de solubilização de substâncias de diferentes polaridades (Adaptado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003)

1.4.1 Composição e propriedades físico-químicas

Os lipossomas são constituídos basicamente por fosfolípidos, principais constituintes estruturais das membranas biológicas. Dentre os fosfolípidos, as fosfatidilcolinas (Figura 5), classificadas como glicerofosfolípidios, apresentando como estrutura química, dois ácidos graxos unidos ao glicerol por duas ligações éster, e um grupamento fosfato (polar) ligado ao glicerol por uma ligação fosfodiéster. Além do fosfato, a fração polar do fosfolípido pode conter grupamentos etanolamina, inositol e colina, encontrados em fosfolípidos de membranas biológicas. Dependendo da carga destes grupamentos, as cabeças polares podem ser carregadas (positiva ou negativamente) e zwitteriônicas (neutra).

As fosfatidilcolinas são as mais comuns e tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa, a fim de minimizar interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos; apresentando, portanto, grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sais no meio (Vemuri et al., 1995; Franzen, 2012).

Figura 05. Estrutura química da molécula de fosfatidilcolina

Dependendo da sua composição lipídica, os lipossomas podem exibir diferentes níveis de fluidez, em uma mesma temperatura (Lasic, 1998; Magalhães et al., 2007). Isso porque os fosfolipídeos apresentam uma temperatura de transição de fase, T_t , ou temperatura mínima necessária para que a água penetre entre as moléculas dos lipídios, com o consequente extravazamento do conteúdo encapsulado (Figura 6) (Frézard et al., 2005), sendo que para a molécula da fosfatidilcolina, esta apresenta T_t em cerca de 30-35°C, segundo previamente demonstrado por Zhou et al. (2011).

Figura 06. Representação esquemática da transição da fase gel, caracterizada pelo movimento restrito e ordenado da estrutura lamelar, cujas cadeias apolares apresentam conformação “toda-trans; para a fase cristal-líquido, cuja estrutura lamelar se encontra em um estado desordenado e os radicais hidrofílicos hidratados (Adaptado de Frézard et al., 2005)

A T_t pode ser influenciada pelo comprimento da cadeia alifática e seus graus de insaturação, natureza do grupamento polar, além da presença de solutos na bicamada lipídica, tais como cátions divalentes, peptídeos, proteínas e substâncias lipossolúveis como o colesterol. A presença de solutos na bicamada pode influir diretamente na agregação das vesículas e na permeabilidade da membrana lipídica. O colesterol por si só não é capaz de formar estruturas lamelares. Sendo uma molécula anfipática (Figura 7), a sua inserção em membranas fosfolipídicas ocorre de modo que o seu grupo hidroxila se encontre orientado para a superfície aquosa e a sua cadeia alifática alinhada paralelamente às cadeias hidrocarbonadas do fosfolipídio, no centro da bicamada (Sousa, 2013).

Figura 07. Estrutura química da molécula do colesterol

1.4.2 Classificação

A classificação dos lipossomas está frequentemente relacionada ao seu diâmetro e lamelaridade, fluidez da bicamada e carga superficial. De acordo com sua estrutura molecular, composição e diâmetro (25nm - 5µm), os lipossomas podem ser classificados como vesículas unilamelares ou multilamelares (Franzen, 2012). As vesículas unilamelares podem ser classificadas como:

- **Vesículas unilamelares pequenas (SUVs):** única bicamada e um pequeno compartimento aquoso, com diâmetro entre 20nm e 100nm;
- **Vesículas unilamelares grandes (LUVs):** única bicamada e grande compartimento aquoso, com diâmetro entre 100nm e 1µm;
- **Vesículas unilamelares gigantes (GVs):** geralmente única bicamada, com diâmetro superior a 1µm;
- **Vesículas multilamelares (MLVs):** múltiplas bicamadas intercaladas por compartimentos aquosos, com diâmetro de 400nm até micrômetros.

De acordo com a interação com o meio biológico, os lipossomas convencionais (não-específicos) são constituídos de compostos naturais, como a fosfatidilcolina e o colesterol, o que os torna biocompatíveis com o meio. Entretanto, ao circularem na corrente sanguínea, os lipossomas funcionam como corpos estranhos, sendo reconhecidos por opsoninas plasmáticas. A adsorção destas proteínas leva ao rápido reconhecimento por células fagocitárias que, assim,

passam a transportar os fármacos veiculados nos lipossomas, o que pode ser vantajoso no caso de patógenos que residem nestas células (Lasic, 1993).

O tamanho dos lipossomas determina o grau de reconhecimento pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). Lipossomas menores são opsonizados mais lentamente pelos macrófagos, e em menor quantidade, permanecendo mais tempo na circulação e apresentando uma liberação mais prolongada (Brescansin, 2006). Além dos lipossomas convencionais, ainda existem os estericamente estabilizados (longa-circulação) e sítio-específicos, os quais apresentam, respectivamente, polímeros hidrofílicos capazes de prolongar o tempo de circulação no plasma e ligantes de direcionamento (anticorpos monoclonais ou oligossacarídeos), incorporados à sua estrutura (Lasic, 1998).

1.4.3 Lipossomas como sistemas de liberação de fármacos

Aproximadamente 40% dos novos princípios ativos são rejeitados pela indústria farmacêutica devido à baixa biodisponibilidade, ocasionada seja por propriedades intrínsecas do fármaco no estado sólido, como a solubilidade, ou relacionado à baixa permeabilidade em membranas biológicas, o que tem motivado a indústria a buscar diferentes estratégias para contornar o problema, assim como acelerar o processo de desenvolvimento de um novo medicamento, com custo reduzido (Svenson, 2009).

São bem conhecidas as vantagens que as formas farmacêuticas de liberação modificada podem apresentar relativamente às formas de liberação convencional (Lopes et al., 2005; Brescansin, 2006) e os carreadores lipossômicos vêm se destacando nos últimos anos como sistemas promissores para a veiculação de diversos tipos de moléculas, com características e vantagens únicas a serem exploradas (Formariz et al., 2005; Couto, 2010), uma vez que esses sistemas são capazes de:

- melhorar características intrínsecas indesejáveis do fármaco, como a baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e instabilidade;
- proteger o fármaco contra degradação enzimática;

- modular a velocidade de liberação (liberação sustentada e/ou prolongada) de fármacos de acordo com os estágios da patologia crônica, aumentando o seu tempo de ação no organismo e reduzindo a frequência de administração;
- formar um ambiente favorável à imobilização de estruturas biológicas como enzimas e anticorpos, visto que são menos atóxicos para o organismo;
- aumentar a inserção em tecidos, de fármacos lipossolúveis;
- reduzir flutuações plasmáticas de fármacos, diminuindo os efeitos colaterais;
- e ainda direcionar o fármaco para regiões sítio-específicas, aumentando a seletividade e reduzindo a toxicidade do fármaco (Frézard & Schettini, 2005; Sousa, 2013).

Apesar das vantagens e da ampla aplicação de formulações lipossomais, comercializadas desde os anos 80, para tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas e de câncer, problemas de ordem tecnológica e biológica fazem com que os lipossomos sejam, ainda hoje, amplamente estudados visando o desenvolvimento de formulações estáveis no organismo e aplicáveis à terapia de várias patologias (Zasadzinski et al., 2011).

1.5 Caracterização físico-química

Vários parâmetros físico-químicos tais como fluidez e composição química da membrana, tamanho de partícula e densidade da carga superficial devem ser determinados para obtenção de uma completa caracterização da dispersão e podem interferir na estabilidade dos lipossomos, na interação dos mesmos com a membrana plasmática e na extensão de incorporação e liberação do fármaco, além

de uma melhor compreensão dos resultados obtidos em estudos de atividade biológica (interação com células e biodisponibilidade) (Lasic, 1998).

Na caracterização físico-química dos sistemas lipossomais, foram utilizadas várias técnicas analíticas como a espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as quais serão discutidas nos próximos itens.

1.5.1 Tamanho e distribuição do tamanho

A influência dos parâmetros físico-químicos na formação e estabilidade de lipossomas pode ser monitorada por medidas de tamanho e distribuição de tamanho das vesículas (Lasic, 1998). Adicionalmente, o diâmetro e a lamelaridade dos lipossomas influenciam diretamente na quantidade de fármaco encapsulada (Giuberti, 2007).

A espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento dinâmico de luz (*Light Scattering*) é a análise da dependência do tempo com a intensidade de flutuação no espalhamento da luz laser, devido ao movimento browniano das partículas em suspensão. O diâmetro da partícula é determinado através de medidas das mudanças qualitativas de reflexão da luz (ou flutuações), uma vez que as partículas presentes numa determinada amostra alteram o comprimento de onda da radiação e espalham a luz. A distribuição de tamanho de partícula é medida pela variação angular da intensidade da luz difundida pelas partículas dispersas, de modo que as partículas maiores se movimentam mais lentamente em relação às menores, e com isso a taxa de flutuação é mais lenta (Bercansin, 2006). A análise das flutuações permite medir o coeficiente de Difusão (D), que é dependente do tamanho das partículas (d), conforme descrito pela lei de Stokes-Einstein (Equação 1):

$$(01) \quad D = KT / 3 \pi \eta d$$

Onde K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do solvente (Malvern Instruments, 1996a).

1.5.2 Potencial zeta

O potencial zeta pode ser definido como a carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, sendo uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações atrativas e repulsivas entre coloides e comumente utilizada para avaliação da estabilidade de sistemas nanocarreadores (Zhong et al., 2012). A carga não pode ser medida diretamente, sendo determinada através de medidas de mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (Florence, 2003). O método consiste na incidência de um feixe de luz sobre a amostra e aplicação de um campo elétrico de força conhecida, que faz com que as partículas, carregadas, se desloquem com velocidades distintas, induzindo diferentes deslocamentos da frequência do feixe de luz, que são convertidos para valores de mobilidade eletroforética (Malvern Instruments, 1996).

Figura 08. Diagrama representativo do potencial zeta (ζ) – representação esquemática das condições de uma superfície negativa, com uma camada de íons positivos adsorvidos (Adaptado de Hotza, 1997).

Como mostra a Figura 8, a carga líquida na superfície de cada partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, o que aumenta a concentração de contra íons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica – uma interna (camada de Stern) com íons fortemente ligados e outra externa ou difusa, com uma distribuição de íons determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e o

movimento térmico. O potencial zeta está localizado entre as duas camadas, na superfície de cisalhamento (New, 1990).

1.5.3 Encapsulação

Dentre os vários parâmetros de caracterização de lipossomas, destaca-se a determinação da eficiência de encapsulação (EE), a qual pode ser traduzida pelo quociente entre a quantidade de fármaco encapsulada para a quantidade total de fármaco na dispersão lipossomal. Para que os sistemas de liberação modificada apresentem eficácia terapêutica, é fundamental, em primeiro lugar, assegurar uma encapsulação estável em sistemas lipídicos mais simples antes de proceder a modificações na sua composição, bem como da liberação deste em tecidos e/ou células alvo (Conceição et al., 2009; Sousa, 2013).

Os fármacos podem interagir com os lipossomas de diversas formas, sendo que estas interações dependem de propriedades físico-químicas como a solubilidade e polaridade. Fármacos hidrossolúveis podem ser encapsulados no compartimento aquoso, dissolvidos ou intercalados na zona das cabeças polares. No caso de fármacos lipossolúveis, a única possibilidade de encapsulação dos mesmos encontra-se na parte hidrofóbica (cadeias hidrocarbonadas).

1.5.4 Estabilidade físico-química

Dependendo da sua composição, as formulações finais dos lipossomas podem apresentar um curto tempo de meia-vida, em parte devido à instabilidade física e química durante o período de armazenamento. Os processos químicos de instabilidade dependem da composição da membrana lipídica, o que implica na prevenção da hidrólise lipídica do éster e da oxidação de insaturações presentes nas cadeias de ácidos graxos. Um dos principais processos que causam a instabilidade física dos lipossomas é a agregação e/ou fusão das vesículas. Um componente lipídico importante, que entra muitas vezes na composição dos lipossomas, é o colesterol. Este pode aumentar a rigidez das membranas no estado cristal-líquido e

reduzir a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado gel (Figura 9) (Frézard et al., 2005).

Figura 09. Representação gráfica do comportamento de fase de membranas lipídicas e o efeito do colesterol – O colesterol aumenta a permeabilidade da membrana na fase gel e a reduz na fase fluida (Adaptado de Frézard et al., 2005).

1.5.5 Liofilização e crioproteção

A liofilização é um processo diferenciado de desidratação de produtos, uma vez que ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada passe diretamente ao estado gasoso, ou seja, baseia-se no fenômeno da sublimação. Quando comparada com o processo convencional de secagem, a liofilização apresenta algumas vantagens como a remoção da umidade a baixas temperaturas, reduzindo taxas de transporte; aumento da estabilidade do produto durante a estocagem; e minimização de reações de degradação devido a fácil transição do material hidratado para desidratado (Boss, 2004).

A liofilização de suspensões lipossomais é frequentemente empregada com o objetivo de aumentar a estabilidade físico-química da formulação e, conseqüentemente, sua vida de prateleira (Yang et al., 2006). Entretanto, tanto o congelamento como a liofilização, podem induzir danos estruturais das vesículas, as quais podem ter seu diâmetro alterado com o conseqüente vazamento da substância encapsulada, se estabilizantes apropriados não forem empregados (Mohammed et al., 2006).

Agentes crioprotetores como açúcares e seus derivados têm sido utilizados para promover estabilidade física durante o processo de liofilização, uma vez que

estes podem interagir com os grupos polares dos fosfolípidos e estabilizar a membrana durante o processo de perda de água da bicamada (Van Winden et al., 1997; Li et al., 2000). Os açúcares mais comumente empregados são a trealose e a sucrose, os quais apresentam mecanismos de ação diferentes devido à estereoquímica dos grupos hidroxila. Entretanto, em condições drásticas, como a liofilização, nas quais a água é completamente removida, estes dois açúcares atuam de maneira semelhante (Giuberti, 2007).

1.5.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem destaque na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas, identificando compostos por comparação com padrões, purificando compostos separando-os dos componentes de uma mistura (Ribani et al, 2004). Esta se destaca por apresentar vantagens particulares: curto tempo de preparo da amostra; alta resolução, permitindo a obtenção de dados qualitativos e quantitativos com boa sensibilidade para amostras de diferentes polaridades em uma só corrida de análise; possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis; além de permitir diversas formas de detecção, capaz de aumentar a seletividade e/ou especificidade e conteúdo de informações por ensaio (Collins et al., 2002). Sobretudo, para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis faz-se necessária validação do método analítico, garantindo assim a qualidade dos resultados obtidos (Eloy et al., 2012a).

1.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico direto ou de transmissão recebe este nome pelo fato da imagem ser formada simultaneamente à passagem do feixe de elétrons. O feixe tem sua trajetória alterada por um sistema de lentes magnéticas, de modo a convergir para a amostra. Ao interagir com a amostra, o feixe pode passar diretamente por esta ou ser espalhado, obtendo-se imagens de campo escuro ou claro, respectivamente, dependendo das configurações de observação. Depois de

interagir com a amostra, o feixe de elétrons é desviado por um sistema de lentes objetivas, que faz com que a imagem seja formada (Sassi, 2012).

O intervalo de aumentos varia de 1000 a 200000X. Comparado ao microscópio de luz, há uma melhoria de 200X, com um poder de resolução na ordem de nanômetros, capaz de fornecer informações sobre a estrutura interna do material. Entretanto, é importante ressaltar que a imagem vista é uma imagem de projeção bidimensional a partir de uma tridimensional, uma vez que o material deve ser extremamente fino, o que torna difícil a obtenção de informações das estruturas em três dimensões (Galleti, 2003).

1.5.8 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do infravermelho (IV) classifica-se em infravermelho próximo (na região de $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), infravermelho médio ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) e infravermelho distante ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$). A absorção das bandas presentes na região do infravermelho está relacionada às vibrações fundamentais das ligações e grupamentos químicos das moléculas, onde os espectros de absorção são representados de modo que a porcentagem de transmitância apareça como uma função do número de onda, que é o inverso do comprimento de onda (Reich, 2005).

A aplicação da radiação no espectro do infravermelho pode ser bastante útil para obter informações a respeito da estrutura e propriedades das moléculas, bem como auxiliar na identificação de interações entre o fármaco e os lipídeos, presentes em sistemas lipossomais, através da observação de possíveis alterações e/ou deslocamentos nos picos das bandas de absorção específicos de cada substância (Sousa, 2013).

1.5.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) pertence ao grupo das análises calorimétricas, que constituem um conjunto de técnicas em que as propriedades

físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidos em função de um programa de temperatura controlada (Thermal Analysis, 2011).

O princípio da calorimetria exploratória diferencial convencional é que o material é aquecido, resfriado ou mantido isotermicamente, e transições ou eventos energéticos são investigados em função do tempo ou temperatura (Ford & Mann, 2012). Esta técnica possui importante aplicação na caracterização de lipossomas, com o objetivo de investigar possíveis transições de fase e/ou variações de entalpia, e pode servir como uma importante ferramenta para avaliação da estabilidade de lipossomas, uma vez que é sensível à composição química e ao estado físico destes sistemas (Manrique-Moreno et al., 2009).

1.6 Perfil de liberação *in vitro*

A utilização dos ensaios de liberação *in vitro* como perspectiva de caracterização das formulações, têm assumido importância crescente, atualmente constituindo uma das metodologias de suporte ao desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos (Toscano et al., 2001).

Os estudos de liberação *in vitro* são de fundamental importância para prever o comportamento *in vivo* do fármaco em relação ao sistema no qual se encontra incorporado, permitindo verificar possíveis interações entre o ativo e os componentes da formulação e a influência destas interações na velocidade de liberação do fármaco (Ferrony et al., 2012; Sousa, 2013).

No caso de substâncias lipofílicas, dependendo da distribuição de tamanho dos lipossomas, a cinética de liberação da substância, por difusão simples, é determinada pelo coeficiente de permeabilidade da substância e pelo diâmetro e lamelaridade das vesículas. Os fatores que podem afetar o coeficiente de permeabilidade, P_s , são o coeficiente de partição da substância entre a membrana e a fase aquosa (k = concentração na membrana/concentração na fase aquosa); a constante de difusão da substância na membrana, D_s ; e a espessura da membrana lipossomal, Δx , de acordo com a Equação 2:

$$(02) \quad P_s = kD_s/\Delta x$$

1.7 Citotoxicidade

Nos últimos anos, com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais, a pesquisa voltada para o desenvolvimento e avaliação de testes *in vitro* como *screening* para testes toxicológicos, permitiu a substituição dos estudos de DL_{50} . Através destes estudos, podem ser obtidas correlações significativas entre estudos de citotoxicidade e letalidade animal, uma vez que a predição do potencial letal agudo está relacionada ao fato de que a ação tóxica de um composto para produzir doença ou morte ocorre primeiramente, a nível celular (Garle et al., 1994).

Vários métodos *in vitro* para avaliação da toxicidade foram padronizados utilizando-se linhagens celulares permanentes ou culturas primárias (por exemplo, fibroblastos da pele), estas últimas apresentando melhor correlação com o comportamento *in vivo* (Oliveira, 2009). Estes testes consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando possíveis alterações celulares por diferentes mecanismos, como a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais, os quais atravessam a membrana celular, concentrando-se nos lisossomas, onde se fixam por ligações eletrostáticas hidrofóbicas na matriz lisossomal. Muitas substâncias podem danificar as membranas, resultando na diminuição da captura e ligação do corante, o que permite distinguir entre células vivas e danificadas/mortas pela medida de intensidade de cor da cultura celular (Rogerio et al., 2003).

1.8 Atividade tripanocida *in vitro*

Devido a sua estrutura de bicamadas, semelhante à das membranas celulares, os lipossomas são capazes de interagir profundamente com as células do organismo. Os benefícios e limitações destes sistemas como carreadores de fármacos dependem da sua interação com células e seu destino *in vivo* após administração. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a interação predominante de lipossomas com membranas celulares é pela adsorção simples e subsequente endocitose, ou fusão com membranas celulares. Outra possível interação é pela

troca de constituintes com os da bicamada, como lipídeos, colesterol e moléculas ligadas aos componentes da membrana (Brescansin, 2006). Essas interações dos lipossomas são afetadas pelas características físico-químicas e coloidais como a composição química, tamanho, carga superficial, estabilidade e taxa de incorporação e liberação do fármaco (Lasic, 1998).

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização físico-química de lipossomas contendo ácido ursólico e posterior avaliação da citotoxicidade e atividade tripanocida *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e caracterização de lipossomas à base de fosfatidilcolina de soja (PC) e colesterol (CHOL), sob as formas líquida e liofilizada, obtidos pela técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico;
- Determinação da eficiência de encapsulação do ácido ursólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), frente às diferentes composições lipídicas empregadas no preparo dos lipossomas;
- Avaliação preliminar de estabilidade da dispersão lipossomal ao longo do tempo de armazenamento;
- Caracterização morfológica dos sistemas obtidos por meio das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise por espalhamento de luz;
- Caracterização físico-química por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do ácido ursólico livre e encapsulado nos lipossomas;
- Avaliação da citotoxicidade dos sistemas obtidos em linhagem celular de mamífero LLC-MK2;
- Avaliação da atividade tripanocida do ácido ursólico em lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol em cultura da cepa CL de epimastigotas;

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias químicas:

- Acetonitrila, grau HPLC – J.T. Baker;
- Ácido ursólico – Idealfarma;
- Água Milli-Q – Millipore;
- Fosfatidilcolina de soja 98% – Lipoid;
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A
- Fosfato de sódio bibásico hepta e dodecahidratado P.A. – Synth;
- Hidróxido de sódio P.A. – Synth;
- Clorofórmio, grau HPLC – J.T. Baker;
- Colesterol $\geq 99\%$ – Sigma;
- Poloxamer 407 (Lutrol F127®) – Basf;
- Sacarose (sucrose®), grau HPLC – Serva;

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético – Lab disk, IKA;
- Analisador de partículas – Zetasizer Nano ZS, Malvern;
- Analisador termogravimétrico – TGA 4000 – PerkinElmer;
- Balança analítica – Adventurer™ – Ohaus;
- Balança semi-analítica – AS 2000C, Marte;
- Banho-maria – HB4 – Ika;
- Banho ultrassônico – Q-335D, Quimis;
- Bomba de vácuo – TE-058, Tecnal;
- Calorímetro diferencial de varredura – DSC-50, Shimadzu,
- Centrífuga refrigerada – 5810R, Eppendorf;
- Coluna C18 Lichrospher®, Merk;
- Cromatógrafo a líquido constituído por bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP, injetor Rheodyne e integrador Chromatopac modelo C-R6A, Shimadzu;

- Dispositivo de ultrafiltração Amicon Ultra 50 KDa, Millipore;
- Dissolutor – SR8 Plus, Hanson Corporation;
- Espectrofotômetro de FT-IR – IRPrestige-21, Shimadzu;
- Filtros de celulose regenerada 0,45 µm , Millipore;
- Homogeneizador tipo vórtex – MS1, IKA;
- Liofilizador – L 101, Liobrás;
- Membrana de celulose regenerada 12000-14000 Da para diálise –
- Microscópio eletrônico de transmissão – JEM-100CX2, JEOL;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 1 a 10 µL; 20 a 200 µL; 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL, Finnipipette;
- Placa de agitação magnética – MAG 15, Marte;
- Potenciômetro digital – DM 20, Digimed;
- Pré-coluna C18 Lichrospher®, Merk;
- Rotaevaporador – RV 05-ST, IKA;
- Sonicador de agulha – Sonoplus – Bandelin;
- Sistema purificador de água – Milli-Q Plus, Millipore;
- Suporte de aquecimento – TMSSG 600, Linkam;
- UltraTurrax – T10, IKA;

3.2 Métodos

3.2.1 Método analítico para quantificação do ácido ursólico por CLAE

A determinação da eficiência de encapsulação do ácido ursólico em lipossomas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo método desenvolvido e validado em nosso laboratório (Eloy et al., 2012a). As análises foram conduzidas empregando as seguintes condições cromatográficas:

- Fase estacionária: coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈, com dimensões internas de 4,0 x 250 mm, partículas de 5 µm, protegida por uma coluna de guarda 4 x 4 mm, de mesma composição;

- Fase móvel (degaseificada em banho de ultrassom por 30 minutos): mistura de acetonitrila e água milli-Q na proporção 88:12 (v/v), com tempo de retenção do AU de 11 minutos;
- Vazão: $1,0 \text{ mL}^{-1}$;
- Volume de injeção: $20 \mu\text{l}$
- Temperatura de análise: $25,0 \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Detecção: faixa do ultravioleta (UV-VIS), com leitura em 203 nm, com limites de detecção e quantificação de $0,34$ e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$;

Para que o método analítico proposto utilizando a técnica de CLAE pudesse ser empregado na quantificação do ácido ursólico em lipossomas e na solução receptora, fez-se necessária a adequação e determinação dos parâmetros da seletividade e linearidade, segundo especificações da ANVISA (2003) através do *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos* e recomendações do ICH (2005) *Harmonised Tripartite Guideline*.

3.2.1.1 Seletividade

Neste estudo, alíquotas dos lipossomas brancos (sem o fármaco) e da solução receptora utilizada em posterior estudo de liberação, foram diluídas em acetonitrila, submetidas à agitação em banho ultrassônico por 15 minutos e filtradas através de membrana $0,45 \mu\text{m}$. A seletividade foi determinada pela comparação dos resultados dos cromatogramas obtidos das amostras de lipossomas brancos e lipossomas contendo ácido ursólico, nas mesmas condições, objetivando-se verificar possíveis picos interferentes entre os componentes do sistema, bem como para o meio receptor, segundo método analítico descrito no item 3.2.1.

3.2.1.2 Linearidade e determinação da curva de calibração do ácido ursólico

A partir de uma solução estoque de AU de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila pura, foram preparadas soluções na faixa de concentração de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0

$\mu\text{g mL}^{-1}$ de AU em acetonitrila pura. Para obtenção da curva analítica, estas concentrações foram analisadas em triplicata e um gráfico foi constituído relacionando-se os valores da concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ no eixo das abscissas e os valores das áreas dos picos obtidos no eixo das ordenadas. A equação da reta (Equação 3), que expressa curva analítica, ou seja, estabelece uma relação entre a resposta obtida e a concentração do analito, pode ser definida por:

$$(03) \quad y = ax + b$$

Onde **y** é a resposta medida (altura ou área do pico); **x** a *concentração do analito*; **a** o coeficiente angular (inclinação) e **b** coeficiente linear (intercepto com o eixo y).

A linearidade foi determinada por meio do coeficiente de correlação linear (**r**) obtido a partir da regressão linear da curva analítica, pelo método dos mínimos quadrados. Considerou-se $r = 0,99$ como mínimo aceitável (ANVISA, 2003). Análises estatísticas foram realizadas através de software GraphPad Prism versão 5.0 e Minitab para windows, empregando-se a análise de variância (ANOVA ONE-WAY) com pós teste de F. Os resultados foram expressos como média ($n=3$) $\pm$ o desvio padrão (DV), com nível de significância de $p < 0,05$ (95%).

3.2.2 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pela técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico, conforme descrito por Morilla et al. (2005), Yang et al. (2007) e Lopes et al. (2013). Foram avaliadas duas variáveis de forma a realizar um estudo comparativo destes sistemas segundo Zhong et al. (2012). Inicialmente foram preparados lipossomas a base de fosfatidilcolina (PC) ($2,6 \text{ mM L}^{-1}$) incorporando o ácido ursólico (AU) em diferentes razões molares PC:AU (Tabela 1). Para tanto, 50,0 mg de PC foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio juntamente com o fármaco. O solvente foi removido completamente utilizando pressão reduzida (rotaevaporação) e banho-maria 50°C por 30 minutos, em temperatura superior à T_f do lipídeo, levando à formação de um filme, o qual foi resuspenso em 25 mL de tampão PBS 100mM ou fosfato 30 mM pH 7,4 e submetido à agitação por um período de 50-60 minutos, seguido de 15 minutos em banho ultrassônico para facilitar o desprendimento do

filme. As formulações foram colocadas em banho de gelo (abaixo da T_t do lipídeo) e tratadas em sonificador de agulha durante 15 minutos, objetivando a obtenção de uma dispersão homogênea de lipossomas unilamelares (em termos de diâmetro médio) (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática do processo de preparo dos lipossomas pela técnica da hidratação do filme lipídico (Adaptado de Avanti® Polar Lipids, Inc)

Na sequência, foram preparados lipossomas compostos por fosfatidilcolina e colesterol (CHOL), contendo ácido ursólico na (40 µg/mL). As formulações avaliadas, suas razões molares e seus respectivos códigos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos lipossomas contendo ácido ursólico, obtidos pela técnica de evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico

Formulação	PC:AU (razão molar)	PC:CHOL (razão molar)	Lipídeos totais (mg) para 25mL
LIP PCAU01	10:1	- - -	50,0
LIP PCAU02	20:1	- - -	50,0
LIP PCAU03	30:1	- - -	50,0
LIP PCCHOLAU01	30:1	4:1	56,2
LIP PCCHOLAU02	30:1	10:1	52,5
LIP PCCHOLAU03	30:1	15:1	51,6

PC:AU = fosfatidilcolina:ácido ursólico; PC:CHOL = fosfatidilcolina:colesterol

3.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação de ácido ursólico nos lipossomas

A eficiência de encapsulação (EE) do ácido ursólico em lipossomas de PC foi avaliada por dois diferentes métodos: indireto, de acordo com Zhong et al. (2012), e direto, segundo descrito por Silva et al. (2009). A quantificação do ácido ursólico (total ou encapsulado) foi realizada por CLAE segundo método analítico descrito no item 3.2.2.

Inicialmente testou-se o método indireto, para o qual, alíquotas de 1 mL (triplicata) da dispersão foram colocadas em tubos tipo Amicon (50 KDa) contendo um dispositivo de filtração centrífuga para ultrafiltração da dispersão lipossomal a 4000g durante 30 minutos. Após este processo, como ilustrado pela Figura 11, os lipossomas permaneceram retidos no filtro do tubo, e o material não incorporado, ou seja, o ácido ursólico solúvel, atravessou o filtro.

A EE foi determinada através da relação entre a quantidade de AU total em alíquotas da dispersão não submetidas à centrifugação, e a quantidade de AU livre (ultrafiltrado), como mostra a Equação 4:

$$(04) \quad EE(\%) = [(AU_{TOTAL} - AU_{CENTRIFUGADO}) / AU_{TOTAL}] \times 100\%$$

Figura 11. Representação esquemática do dispositivo Amicon utilizado na centrifugação das dispersões lipossomais (Millipore, 2013)

Para determinar a quantidade de ácido ursólico incorporada em lipossomas pelo método direto, foram tomadas alíquotas de 1 mL (triplicata) das formulações, as quais foram submetidas à centrifugação (1000rpm por 10 minutos) para precipitação do fármaco em suspensão, não encapsulado. Ao término da centrifugação, foi feito o doseamento do sobrenadante, a partir do qual alíquotas de 0,5 mL foram diluídas na proporção 1:3 lipossomas:acetonitrila, e submetidas à agitação em banho ultrassônico por 15 minutos, para promover a desorganização das vesículas e liberar o fármaco encapsulado. Posteriormente as amostras foram filtradas através de membrana 0,45 µm e analisadas por CLAE. A percentagem de encapsulação foi calculada pela razão entre o teor do sobrenadante e o teor na dispersão (alíquotas que não foram centrifugadas) x 100 (Equação 5).

(05) $EE(\%) = [AU \text{ sobrenadante}] / [AU \text{ total}] \times 100\%$

Para determinação da EE da formulação liofilizada, foi determinado previamente, o rendimento do processo, a partir da razão em porcentagem entre a massa teórica dos componentes da formulação (incluindo sais do tampão) e a massa do liofilizado obtida após o processo da liofilização. Em seguida o liofilizado foi resuspenso em quantidade adequada de água milli-Q, e o teor de AU no sobrenadante e na dispersão foram determinados por CLAE conforme método direto descrito anteriormente.

3.2.4 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta das dispersões lipossomais

O tamanho e distribuição de tamanho das partículas foram determinados por espalhamento dinâmico da luz (*Light Scattering*) ou espectroscopia de correlação de fótons. O potencial zeta foi determinado por medidas de mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas em analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS da Malvern Instruments®. Alíquotas das amostras (n=3) foram analisadas sem diluição prévia, sob um ângulo de detecção de 173°, na temperatura de 25°C. Para os índices de refração e viscosidade, foram adotados, respectivamente, valores de 1,33 e 0,8872.

3.2.5 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta dos lipossomas liofilizados

Para as amostras de lipossomas liofilizados, estes foram diluídos em água milli-Q na proporção 1:1000 (m/v) imediatamente antes das análises, segundo condições descritas no item 3.2.4.

3.2.6 Avaliação preliminar da estabilidade físico-química das dispersões lipossomais

Foi avaliada a estabilidade físico-química das dispersões lipossomais na ausência e presença do colesterol, sendo avaliado um único lote para cada formulação. As dispersões foram armazenadas em geladeira a $4 \pm 5^\circ\text{C}$ e em temperatura ambiente a 25°C. Foram monitorados em intervalos fixos (0, 7, 15, 30 e 60 dias) os seguintes parâmetros: aspecto macroscópico, diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas, potencial de superfície, pH e taxa ou eficiência de encapsulação. As leituras de pH foram realizadas em potenciômetro digital DM20 Digimed, previamente calibrado, em temperatura de 25°C.

3.2.7 Efeitos da liofilização e crioproteção

A dispersão lipossomal na razão molar PC:CHOL:AU ideal foi submetida à liofilização em equipamento da Liobrás modelo L 101, por 72 horas, contendo ou não sucrose em diferentes razões molares fosfatidilcolina:sucrose (Tabela 2) (segundo proposto por Zadi & Gregoriadis (2000) a fim de se verificar o efeito crioprotetor durante o processo de desidratação das vesículas. Para tal, as dispersões foram inicialmente congeladas a -20°C e em seguida a pressão sobre a matéria foi reduzida, levando a perda de água por sublimação, resultando na obtenção de um pó seco.

Tabela 2 – Composição dos lipossomas na razão molar ideal, contendo ou não sucrose, obtidos pela técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico, submetidos ao processo de liofilização

Formulação	LIP:SUC (razão molar)	SUC (mg) 10 mL de formulação
LIO LIPSUC00	---	---
LIO LIPSUC01	1: 1,5	14,55
LIO LIPSUC02	1: 2,5	24,30
LIO LIPSUC03	1: 5	48,50
LIO LIPSUC04	1: 10	97,10

LIP:SUC = lipídeos:sucrose

3.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão utilizou-se microscópio eletrônico Jeol modelo JEM 100CXII, locado no laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP-USP. Imediatamente após resuspensão do liofilizado em água 1:1000 (m/v), uma alíquota de 20 µL da amostra (triplicata) foi aplicada sobre uma lâmina e seca em temperatura ambiente (25°C) para formação de um filme, a partir do qual foi obtido um material ultrafino e este foi inserido em grade de película para posterior tratamento com solução aquosa de acetato de

uranila 2,0% e citrato de chumbo 1,0%, utilizados como agentes de contraste. Foram obtidas fotomicrografias com aumentos de 50, 80, 100 e 200.000 vezes.

3.2.9 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos foram realizados com o uso de espectrofotômetro da Shimadzu IRPrestige-21, locado no laboratório de Química Analítica e Inorgânica da FCFRP-USP. Amostras das substâncias puras e dos lipossomas liofilizados, contendo ou não ácido ursólico foram previamente homogeneizadas e compactadas com brometo de potássio (KBr) anidro em prensa hidráulica. Foram efetuadas varreduras no intervalo de número de onda de 4500 cujos espectros foram obtidos de 4500 a 450 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

3.2.10 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial foi conduzida em equipamento da Shimadzu modelo DSC-50, locado no laboratório de Física Industrial da FCFRP-USP. As amostras foram pesadas em cadinhos de alumínio e aquecidas em uma faixa de 25 a 300°C , com velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e fluxo de N_2 de 30 mL min^{-1} . Os dados foram manipulados usando o software TA60 Shimadzu. As amostras foram mantidas em geladeira $4 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

3.2.11 Determinação da solução receptora

Considerando-se que o ácido ursólico é um composto hidrofóbico, apresentando pouca ou nenhuma molhabilidade, para definir o meio de dissolução mais apropriado para os estudos *in vitro* de seu perfil de liberação a partir dos lipossomas, foi determinada a solubilidade do mesmo em diferentes meios.

Estes estudos foram conduzidos em temperatura controlada de $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$, adicionando excesso de fármaco (8,0 mg) em 4 mL do meio. As amostras (triplicata) foram mantidas sob agitação magnética (600 rpm) até o equilíbrio (24 horas),

quando foram filtradas através de membrana 0,45 µm para a separação do fármaco não solubilizado. Posteriormente foram tomadas alíquotas de 1 mL das amostras, diluídas em acetonitrila (10, 20 e 40 vezes) quando necessário, e analisadas por CLAE, conforme método analítico proposto no item 3.2.1.1. Os meios avaliados foram:

- Água purificada
- Tampão fosfato 30 mM pH 7,4
- Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 acrescido de poloxamer 407 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%.

3.2.12 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do ácido ursólico livre e a partir dos lipossomas

Previamente ao estudo do perfil de liberação *in vitro* do ácido ursólico encapsulado nos lipossomas, foi determinado o perfil de liberação do fármaco livre no meio de dissolução, em dissolutor Hanson modelo SR8 Plus, para que pudesse ser verificada a influência das formulações sobre a liberação do fármaco.

Inicialmente testou-se o método da diálise, utilizando aparato desenvolvido e validado em nosso laboratório (Praça et al., 2008). Para tal 2,5 mg de AU/ 20 mL de meio (triplicata) foram submetidos à agitação de 600 rpm durante 24 horas a 37°C para que o fármaco fosse previamente molhado no meio, e este então introduzido em um tubo de cloreto de polivinila (PVC), o qual foi envolvido por membrana de diálise (previamente hidratada) em uma das extremidades e fixado na haste do aparato tipo cesta pela outra extremidade (Figura 12). Em outro estudo, testou-se o método da ultrafiltração, onde uma determinada quantidade de fármaco requerida (triplicata) foi colocada em contato direto com a solução receptora e dispersa por aparato de minipás. As amostras coletadas foram filtradas através de membrana 0,45 µm e em seguida analisadas por CLAE, utilizando as condições descritas no item 3.2.1.

Para determinação da quantidade de ácido ursólico liberada por unidade de tempo a partir dos lipossomas pelo método da diálise, quantidade requerida do liofilizado contendo 2,5 mg de AU (triplicata) foi reconstituída em tampão fosfato 30

mM pH 7,4. Em seguida, as amostras foram transferidas para dispositivo adaptado de tubo PVC envolvido por membrana de diálise previamente hidratada (Figura 12). Para o método da dispersão direta, quantidade requerida da formulação liofilizada (triplicata) foi introduzida diretamente no meio receptor, dispersa por aparato de minipás conforme descrito para o ácido ursólico livre. As amostras coletadas foram ultrafiltradas usando dispositivo Amicon 4000g por 30 minutos para separação do fármaco não encapsulado e em seguida analisadas por CLAE utilizando as condições descritas no item 3.2.1.

As demais condições utilizadas tanto para determinação do fármaco livre como a partir dos lipossomas foram:

- Meio: Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 acrescido de poloxamer 407 2,0%;
- Volume do meio: 50 mL;
- Velocidade rotacional: 150 rpm;
- Temperatura: $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$;
- Volume de amostra coletado: 1,0 mL (reposto com o meio de dissolução a 25°C);
- Tempos de coleta: 3,0; 6,0; 12,0; 24,0; 27,0; 30,0; 33,0; 48,0; 54,0; 72,0 e 120,0 horas.

Figura 12. Representação esquemática do aparato utilizado no estudo do perfil de liberação do ácido ursólico pelo método da diálise – tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta (Adaptado de Souza, 2013).

3.2.13 Ensaio biológico *in vitro*

A citotoxicidade do ácido ursólico em lipossomas liofilizados na presença ou ausência do crioprotetor sucrose, foi avaliada em relação ao controle (lipossoma branco com e sem crioprotetor), em linhagem de fibroblastos do tipo LLC-MK2. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,5% de estreptomicina penicilina (Gibco), e tampão HEPES e bicarbonato de sódio para um pH de 7,4. As células (1×10^6 /mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo as amostras das formulações a serem avaliadas nas seguintes concentrações de AU: 0,5; 2,0; 8,0 e 32,0 μ M (100ul por poço, triplicata para cada concentração). As placas foram encubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Depois deste período, após a retirada do meio, foram adicionados 50 μ L de TrypLE Express (Life Technologies) para o desprendimento das células. Depois de soltas adicionou-se 50 μ L de RPMI e as células foram coradas com Azul de Trypan Cedex na concentração de 1:1 (amostra:corante). A leitura das placas foi realizada em aparelho Cedex Xs Analyzer.

Para avaliação da atividade tripanocida do ácido ursólico encapsulado nos lipossomas liofilizados com relação ao controle (lipossoma branco) em cultura da cepa CL BRENER de epimastigotas, utilizou-se a técnica do MTT (Fisichella et al., 2009). O meio de cultura utilizado foi o LIT (Liver Infusion Tryptose) à base de infuso de fígado, suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células (1×10^7 /mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo as amostras das formulações a serem avaliadas nas seguintes concentrações de AU: 0,5; 2,0; 8,0 e 32,0 μ M (100ul por poço, triplicata para cada concentração). As placas foram incubadas em estufa modelo BOD a 27°C por 72 horas. Após este período, foram adicionados 10 μ L do corante MTT na concentração de 2,5 mg/mL, incubou por mais 4 horas. Em seguida, 90 μ L de álcool isopropílico foram adicionados, e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

Os materiais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método analítico para quantificação do ácido ursólico por CLAE

A quantificação do ácido ursólico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo método proposto por Eloy et al. (2012a) desenvolvido e validado em nosso laboratório. Para que o mesmo pudesse ser empregado na determinação da eficiência de encapsulação do ácido ursólico em lipossomas, fez-se necessária a obtenção de curva de calibração e determinação da linearidade, bem como da seletividade do método, frente às formulações desenvolvidas, segundo especificações da ANVISA (2003) através do *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos* e recomendações do ICH (2005) *Harmonised Tripartite Guideline*.

4.1.1 Seletividade

A seletividade, considerada uma das primeiras etapas da validação analítica, deve garantir que os componentes de uma matriz não interfiram na quantificação do fármaco (Ribani et al., 2004). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é considerado seletivo (INMETRO, 2007).

Os resultados obtidos pela análise dos lipossomas brancos e lipossomas contendo ácido ursólico (Figura 13) mostraram que tanto os lipídeos, quanto os componentes do tampão, assim como o crioprotetor, não interferiram a quantificação do ácido ursólico, pois não exibiram picos cromatográficos coincidentes com o tempo de retenção característico do fármaco, bem como para a quantificação do fármaco no meio de dissolução (Figura 14).

Embora a fosfatidilcolina tenha apresentado tempo de retenção de 10 minutos, próximo ao do fármaco, este fato pode ser explicado pelo baixo λ (203 nm) utilizado para as análises, mesmo utilizado em trabalho prévio (Gnoatto et al., 2005), no qual a maioria dos compostos apresenta alguma absorção. No caso dos fosfolipídios, estes não exibem picos de absorção específicos, porém devido à presença de insaturações e grupos funcionais como carboxila e fosfato, há uma absorção razoável na região de comprimento de onda entre 203-214nm. Na tentativa de otimizar o tempo de retenção do pico do fármaco em relação ao do lipídeo e

diminuir o ruído/instabilidade da linha de base frente aos componentes do tampão previamente testado (PBS 100mM pH 7,4), foram realizados ensaios de seletividade alterando-se a proporção dos componentes da fase móvel e a composição do meio de hidratação, respectivamente. O emprego de fase móvel composta por acetonitrila:água na proporção 80:20 (v/v) resultou não só no aumento do tempo de retenção do fármaco, como também no do fosfolípídeo, os quais apresentaram picos coincidentes em 16 minutos, dentro das condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.

Entretanto, a substituição do tampão PBS 100mM por tampão fosfato pH 7,4 30 mM, menos concentrado, resultou em cromatograma com melhor resolução e ausência de interferência na integração do pico do AU.

Figura 13. Representação esquemática de cromatogramas obtidos a partir análises de lipossomas preparados com tampão fosfato 30 mM pH 7,4, diluídos em acetonitrila (1:3 v/v). a) Lipossomas brancos. b) Lipossomas contendo AU, razão molar 30:1 PC:AU.

Figura 14. Representação esquemática de cromatogramas obtidos a partir das análises de alíquotas do meio de dissolução (tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e poloxamer 2,0%). a) Meio de dissolução isento de AU. b) Meio de dissolução contendo AU, sem diluição prévia.

4.1.2 Linearidade e determinação da curva de calibração do ácido ursólico

Foi observada linearidade na faixa de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aplicável para a quantificação do ácido ursólico nas formulações desenvolvidas, após o ajuste dos dados empregando análise de variância pelo teste F , com $p < 0,0001$. O coeficiente de correlação linear, calculado a partir da regressão linear da curva analítica pelo método dos mínimos quadrados, evidenciou a proporcionalidade entre as respostas obtidas (áreas dos picos) e as concentrações de AU no intervalo avaliado, [área = $10687 \times \text{concentração } (\mu\text{g mL}^{-1}) + 305,87$], com $r = 0,996$ (Figura 15).

Figura 15. Curva analítica do ácido ursólico em acetonitrila (concentrações de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtida para estudo de linearidade do método para determinação da eficiência de encapsulação de AU em lipossomas e quantificação do AU no meio de dissolução utilizando CLAE.

4.2 Obtenção e caracterização físico-química dos lipossomas na ausência e presença do ácido ursólico

A utilização dos lipossomas como sistemas carreadores de fármacos requer a avaliação prévia de parâmetros como método de preparo, composição química e fluidez da membrana, tipo de lipídeo empregado, tamanho das vesículas e carga superficial, visto que estes fatores irão influenciar diretamente na quantidade de fármaco encapsulada, na estabilidade físico-química, na extensão e velocidade de liberação do fármaco, assim como na interação com células e/ou no comportamento em meio biológico (Talsma et al., 1992; Lasic, 1998).

A concentração de fosfolipídios interfere diretamente na encapsulação de substâncias ativas lipofílicas, sendo geralmente utilizadas concentrações na faixa de 1 a 100 mg mL^{-1} (Betageri & Parsons, 1992). A concentração de fosfatidilcolina empregada neste estudo foi de 2 mg mL^{-1} , uma vez que deve ser levado em conta a via de administração pretendida. Os limites farmacopéicos em relação à garantia da estabilidade de armazenamento, preconizam uma concentração de ácidos graxos livres menor que 0,07 mEq/g (Giuberti, 2007).

O processo para obtenção das vesículas consistiu na solubilização do(s) lipídeo(s) e do fármaco usando-se para tal um solvente orgânico volátil em um suporte sólido (paredes de um recipiente de fundo redondo). O solvente foi evaporado, resultando na formação de um filme lipídico, o qual em contato com uma solução tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e agitação vigorosa, incorpora parte desta solução até que se descola das paredes do recipiente originando estruturas agregadas na forma de bicamadas, decorrente da organização das moléculas de fosfolipídios. Uma vez que a região hidrofílica é seletivamente hidratada, as cadeias hidrofóbicas se escondem no interior da estrutura formada, minimizando contato com o meio aquoso, resultando na formação das vesículas (Conceição et al., 2009).

Frequentemente a dispersão mecânica dos lipídios em meio aquoso resulta na formação de vesículas com tendência multilamelar, as quais devido ao diâmetro e heterogeneidade dos compartimentos internos são mais difíceis de serem estudadas (Sharma et al., 1997; Laverman et al., 1999). Objetivando-se obter vesículas unilamelares, a dispersão resultante foi submetida ao processo de sonicação, que consiste no fornecimento de energia através de ondas de ultrassom, capazes de promover a formação de fragmentos de membranas. Quando estes fragmentos, apolares, são expostos ao meio aquoso polar, a entropia se torna desfavorável e para vencê-la estes fragmentos se juntam a outros fragmentos hidrofóbicos. A energia desfavorável da interação da região apolar é equivalente à energia desfavorável de empacotamento, resultando em vesículas com menor raio de curvatura, e ao se atingir o equilíbrio, ocorre então formação de vesículas de menor diâmetro (Chorilli et al., 2004). Além disso, fatores relacionados à força iônica presente no meio de hidratação também devem ser considerados no processo de formação da bicamada, uma vez que compostos na sua forma ionizada em pH básico, como o ácido ursólico e o colesterol, podem resultar na formação de vesículas com menor diâmetro (Talsma et al., 1992).

A formação dos lipossomas foi verificada por meio da análise por espalhamento dinâmico da luz ou espectroscopia fotônica. Uma vez que esta técnica se baseia no movimento browniano das partículas, é possível estabelecer uma relação entre a frequência e a amplitude deste movimento com o tamanho das partículas e a viscosidade do solvente, sendo que quanto menor a partícula, maior a intensidade do movimento browniano (Malvern, 2011). O ideal é que a formulação apresente perfil de distribuição monomodal e baixo índice de polidispersividade

(Pdl), o que indica uma distribuição de tamanho homogênea (Guterres; Schaffazick, 2003), e considerando-se a via de administração pretendida (intravenosa) neste trabalho, a determinação destes parâmetros é de fundamental importância.

Assim como para o diâmetro das vesículas, o método de preparo também influencia na porcentagem de fármaco encapsulada, sendo um parâmetro importante a ser analisado, particularmente quando o fármaco necessita de doses elevadas. Além disso, quando se trata de formulações farmacêuticas, a quantidade de lipídio deve ser minimizada, uma vez que quanto menor a quantidade de lipídio administrada, menores as chances de ocorrência de efeitos colaterais (Frézard et al., 2005; Giuberti, 2007).

Inicialmente, na tentativa de avaliar a eficiência de encapsulação do AU em lipossomas, empregou-se a técnica da ultrafiltração, para separar o fármaco solúvel do encapsulado. Utilizando-se para tal um dispositivo Amicon® 50 kDa. Entretanto, não foi possível a dosagem do fármaco livre, cuja concentração se mostrou abaixo do limite inferior de quantificação de 1ug/ml, o que poderia ser justificado pela alta solubilidade entre o fármaco e a membrana lipídica. Sendo assim, a eficiência de encapsulação foi determinada seguindo-se método direto descrito no item 3.2.2.

4.2.1 Influência das variáveis lipídeo:fármaco e lipídeo:colesterol no tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta e quantidade de ácido ursólico encapsulada

Os efeitos das duas variáveis, razão molar PC:AU e PC:CHOL no diâmetro médio e na eficiência de encapsulação (EE) dos lipossomas estão ilustradas nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Os resultados mostraram que tanto a composição química quanto a proporção dos componentes, tiveram influência na formação dos lipossomas. Assim como em estudo realizado por Zhong et al. (2012) utilizando lipossomas de PC contendo ácido ursólico complexado com lamivudina, uma alta razão molar lipídeo:fármaco resultou em uma alta eficiência de encapsulação. O valor máximo da EE ($90,35 \pm 7,23\%$) pôde ser alcançado quando a razão molar PC:AU foi 30:1 (LIP PCAU03), para a qual foi observado menor tamanho de partícula de $65,89 \pm 4,61\text{nm}$, evidenciado pela formação de filme lipídico mais fino e homogêneo.

Figura 16. Representação gráfica da influência da variável PC:AU lipídico:fármaco no diâmetro médio e eficiência de encapsulação (%) do AU pelos lipossomas.

Assim como para a variável PC:AU, a quantidade de fármaco encapsulada pôde ser otimizada quando a razão lipídico:colesterol aumentou, uma vez que uma adequada quantidade de colesterol incorporada em lipossomas de fosfatidilcolina pode promover uma melhora na estabilidade, modular a rigidez da membrana, e consequente aumento da EE (Gregoriades, 1991); entretanto é essencial que haja um balanço na concentração de colesterol, enquanto que um excesso ou déficit de colesterol pode desestabilizar a estrutura da bicamada, levando a uma diminuição do conteúdo encapsulado ($EE = 64,35 \pm 3,32 \%$) como observado pela presença do colesterol na razão 4:1 lipídico:colesterol (El-Samaligy et al., 2006). Fatores relacionados à estrutura química da molécula do colesterol também devem ser considerados, uma vez que este apresenta estrutura química semelhante à do ácido ursólico.

Figura 17. Representação gráfica da influência da variável PC:CHOL fosfatidilcolina: colesterol no diâmetro médio e eficiência de encapsulação (%) do AU pelos lipossomas.

A formulação PCCHOLAU 03, razão molar 15:1 PC:CHOL, embora tenha apresentado menor tamanho de partícula, não mostrou aumento significativo de encapsulação em relação à formulação PCCHOLAU 02, na razão molar 10:1, contendo maior quantidade de colesterol ($EE = 93 \pm 1,73\%$ e $90,16 \pm 2,25\%$, respectivamente). Sendo assim esta última foi escolhida como a razão PC:CHOL ideal.

O tamanho de partícula foi significativamente influenciado pelas duas variáveis, sendo que o diâmetro dos lipossomas aumentou conforme a quantidade de lipídeo(s) aumentou, o que também foi relatado em estudo realizado por Chorachoo et al. (2013). Adicionalmente, a incorporação do colesterol, mesmo na razão molar PC:CHOL 15:1, favoreceu a formação de vesículas com maior diâmetro em relação à variável PC:AU. Segundo estudos realizados por Talsma et al. (1992), a geometria de empacotamento formada por diferentes lipídeos é considerada fator importante na formação da bicamada e, conseqüentemente das vesículas, sugerindo-se que a geometria da molécula do colesterol desempenhe importante papel durante a formação dessas vesículas.

Conforme ilustrado pelas Figuras 18 e 19, embora as formulações tenham apresentado um perfil de distribuição bimodal, o qual geralmente está relacionado à técnica de preparo empregada neste estudo, os valores médios do Pdl se encontraram compreendidos entre $0,263 \pm 0,01$ e $0,34 \pm 0,04$, antes e após adição do colesterol na razão 10:1 PC:CHOL, respectivamente.

Figura 18. Representação gráfica do tamanho e distribuição do tamanho de partícula de uma formulação contendo AU preparada a partir de PC na razão molar PC:AU 30:1, obtida por espalhamento dinâmico da luz.

Figura 19. Representação gráfica do tamanho e distribuição do tamanho de partícula de uma formulação contendo AU preparada a partir de PC e CHOL na razão molar PC:CHOL 30:1, obtida por espalhamento dinâmico da luz.

O potencial zeta ou a carga superficial da partícula é outro importante parâmetro indicativo da estabilidade de sistemas nanocarreadores, além de influenciar na interação com células alvo. Quanto maior é o valor em módulo desse potencial, maior será a repulsão entre as partículas coloidais em suspensão e,

consequentemente, melhor será a estabilidade (Laverman et al., 1999). A fosfatidilcolina, presente na maioria das formulações lipossomais comercialmente disponíveis, se destaca pelo perfil biocompatível e não tóxico, e pela carga neutra (Chorachoo et al. (2013).

Em relação ao potencial zeta das formulações desenvolvidas, estas apresentaram valores próximos à neutralidade (entre -1,79 e -8,24mV), o que também foi relatado em estudo com lipossomas PEGlados contendo AU (Lopes et al., 2013). Destaca-se que a administração de lipossomas com carga neutra ou negativa pode fornecer uma barreira mais eficaz à adsorção das proteínas plasmáticas e facilidade de resuspensão no sangue (Mobed & Chang, 1998). O potencial de superfície negativo de $-12,95 \pm 1,48$ mV, apresentada pela formulação com maior tamanho de partícula ($153,05 \pm 20,28$ nm) na razão molar 4:1 PC:CHOL foi devido à maior quantidade do colesterol, que possui carga negativa, na superfície dos lipossomas, uma vez que o potencial zeta é dependente da quantidade de lipídeo presente (Mohammed et al., 2004).

Destaca-se ainda que o diâmetro médio dos lipossomas após a incorporação do AU na razão otimizada 10:1 PC:CHOL não sofreu alteração significativa em relação ao lipossoma branco ($122,8 \pm 2,05$ nm e $122,4 \pm 1,66$ nm, respectivamente). Assim como para valores de potencial zeta, não houve diferença após incorporação do fármaco, os quais mantiveram dentro da faixa de neutralidade.

Em relação ao conteúdo encapsulado, as formulações PCCHOLAU 02 e PCAU 03, na razão molar otimizada 30:1 lipídeo:fármaco, com e sem colesterol respectivamente, se mostraram estatisticamente semelhantes, o que levou à investigar a estabilidade destas formulações a longo prazo.

4.2.3 Avaliação preliminar da estabilidade físico-química da dispersão lipossomal na ausência e presença do colesterol

A permeabilidade da bicamada lipídica é um parâmetro crítico quando se objetiva a veiculação de fármacos em lipossomas. Esta é afetada principalmente pela composição da membrana lipídica, assim como por fatores externos como temperatura, pH e força iônica do meio, sendo a permeabilidade máxima de lipossomas observada na temperatura de transição da fase gel para a fase líquido-

cristalina (T_m), na qual o extravazamento do conteúdo encapsulado é maior quando comparado ao estado gel. (Franzen et al., 2012).

Figura 20. Representação gráfica da estabilidade físico-química da formulação lipossomal na razão 30:1 PC:AU em a) ausência e b) presença do colesterol (razão 10:1 PC:CHOL) – perfil da quantidade de ácido ursólico encapsulada ao longo de 30 dias, em geladeira a $4\pm5^{\circ}\text{C}$ e em temperatura ambiente de 25°C .

O colesterol, presente naturalmente nas membranas celulares, é o principal modulador das propriedades físicas das membranas, proporcionando efeito positivo na estabilidade quando incorporado em lipossomas de fosfatidilcolina (Han et al., 1997; Mohammed et al., 2005). Tal efeito, dependente da razão lipídeo:colesterol, é sugerido por um maior empacotamento das cadeias fosfolipídicas, induzindo à formação de uma estrutura mais rígida e com menor mobilidade, o que leva a uma redução da permeabilidade da membrana lipossomal, que se apresenta fluida em temperatura ambiente (Figura 20) (Sharma et al., 1997; Lasic, 1998, Sousa, 2013).

Em geladeira a $4 \pm 5^{\circ}\text{C}$, abaixo da T_m da fosfatidilcolina, foi observado aumento significativo da estabilidade do conteúdo encapsulado, na ausência e presença do colesterol, sugerida pelo alto estado de ordenação das cadeias lipídicas na fase gel, com maior capacidade de reter por mais tempo o conteúdo encapsulado (Frézard et al., 1999). O efeito de triterpenos como o ácido ursólico sobre as membranas lipídicas já foi previamente relatado por estudo conduzido por Han et al. (1997), o qual demonstrou efeito modulatório da fluidez pelo AU, semelhante àquele promovido pelo colesterol, além de forte efeito de

condensação da membrana lipossomal em ambas fases (Greige-Gerges et al., 2013). Tal efeito poderia explicar a alta estabilidade do AU encapsulado, em relação aos lipossomas armazenados a 4°C, na ausência do colesterol. Entretanto, à temperatura ambiente na ausência do colesterol observa-se a partir de 15 dias a diminuição significativa do conteúdo encapsulado, o que pode sugerir que a alta razão molar de fosfatidilcolina:ácido ursólico não foi capaz de impedir o aumento da permeabilidade da bicamada ocasionado e precipitação do fármaco em temperatura próxima (pré-transição) ou igual à T_m da fosfatidilcolina. (Frézard et al., 1999; Machado et al., 2007).

Adicionalmente, foram avaliadas alterações no tamanho e distribuição do tamanho, assim como do potencial zeta das vesículas e pH em relação às formulações lipossomais durante o período de 30 dias armazenadas, no qual tanto em geladeira como em bancada na presença do colesterol, observou-se um aumento em módulo do potencial zeta com o tempo, sendo que estes valores foram mais altos a 25°C, o que poderia explicar a menor agregação e melhor retenção do fármaco pela membrana na fase cristal-líquido, contribuindo com o aumento da estabilidade desta. Em relação ao aspecto macroscópico das formulações, estas se apresentaram macroscopicamente estáveis ao final do período avaliado, com exceção da formulação armazenada em temperatura ambiente na ausência do colesterol, cuja leve alteração na turbidez observada está relacionada à maior agregação e/ou fusão das vesículas.

Tabela 3 – Resultados da estabilidade físico-química dos lipossomas de fosfatidilcolina cotendo ácido ursólico, na ausência do colesterol, armazenados ao longo de 30 dias a $4\pm5^{\circ}\text{C}$ e 25°C

	Geladeira				Temperatura Ambiente			
	d (nm)	Pdl	ζ (mV)	pH	D (nm)	Pdl	ζ (mV)	pH
F1 d0	50,24	0,255	2,84	7,46	50,24	0,255	2,84	7,46
F1 d7	108,7	0,359	0,61	7,47	107,3	0,355	-8,37	7,26
F1 d15	114,2	0,367	2,76	7,45	113,7	0,357	2,28	7,13
F1 d30	112,5	0,367	-5,67	7,31	150,6	0,556	-7,01	6,88

d = diâmetro; Pdl = índice de polidispersividade; ζ = potencial zeta; d0, d7, d15 e d30 referem-se a 0, 7, 15 e 30 dias.

Tabela 4 – Resultados da estabilidade físico-química dos lipossomas de fosfatidilcolina cotendo ácido ursólico, na presença do colesterol, armazenados ao longo de 30 dias a $4\pm5^{\circ}\text{C}$ e 25°C

	Geladeira				Temperatura ambiente			
	d (nm)	Pdl	ζ (mV)	pH	d (nm)	Pdl	ζ (mV)	pH
F2 d0	71,34	0,292	-2,92	7,53	71,34	0,292	-2,92	7,53
F2 d7	135,5	0,410	-1,45	7,62	145,8	0,451	-1,45	7,32
F2 d15	112,5	0,375	-7,14	7,49	136,3	0,513	-14,5	7,21
F2 d30	154,8	0,588	-12,3	7,31	107,3	0,417	-13,3	7,05

d = diâmetro; Pdl = índice de polidispersividade; ζ = potencial zeta; d0, d7, d15 e d30 referem-se a 0, 7, 15 e 30 dias.

Dentro das condições e intervalos avaliados, embora o colesterol tenha resultado na diminuição da agregação das vesículas, esta não foi impedida, uma vez que a presença de vesículas menores obtidas pelo processo de sonicação, após determinado período armazenadas em suspensão, se unem formando agregados (Chorilli et al., 2007). Uma estratégia, a qual é comumente adotada em formulações farmacêuticas lipossomais, objetivando o aumento da estabilidade físico-química durante o armazenamento, é a utilização da formulação na sua forma liofilizada.

4.3 Efeitos da liofilização e crioproteção

O armazenamento dos lipossomas na forma de suspensão aquosa é muitas vezes incompatível com a estabilidade requerida para os produtos farmacêuticos, mesmo se a substância encapsulada apresenta um baixo coeficiente de permeabilidade ou se a preparação é mantida na forma de sedimento com pequeno volume externo (Frézard et al., 2005). Em contraste, uma preparação “seca” para ser hidratada imediatamente antes da administração pode evitar problemas associados à forma líquida ao longo do tempo de armazenamento (Vemuri et al., 1995; Aulton, 2005; Mohammed et al., 2006).

O efeito crioprotetor, o qual é dependente da razão lipídeo:açúcar, está relacionado à capacidade da sucrose interagir diretamente com grupos polares do fosfolipídio (deslocando moléculas de água fortemente ligadas aos grupos fosfatos) estabilizando a membrana durante o processo de perda de água presente na bicamada, além da formação de uma matriz vítrea, a qual é amorfa, termodinamicamente instável e caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade molecular e por isso capaz de impedir a fusão da membrana lipídica, mantendo o diâmetro das vesículas e a retenção do conteúdo encapsulado (Crowe et al., 1987; Cacula & Hinch, 2006).

A partir das formulações liofilizadas, foi avaliado rendimento do processo, o qual foi considerado alto ($82,45 \pm 0,92$). Em seguida, foram analisadas segundo Guterres et al. (2013), as características da partícula após a resuspensão do liofilizado e antes da secagem, em relação ao tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, e quantidade de fármaco encapsulada (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação do efeito crioprotetor sobre o diâmetro médio e distribuição de tamanho, potencial zeta e conteúdo encapsulado, antes e após o processo da liofilização

Amostra*	LIP:SUC	d (nm)	Pdl	ζ (mV)	EE(%)
LIP _{ANTES LIO}	- - -	98,67 ± 1,45	0,312 ± 0,03	-4,98 ± 3,98	91,28 ± 0,35
LIO LIPSUC00	1 : 0	529,8 ± 14,6	≥ 1,0	-12,36 ± 2,50	91,27 ± 1,78
LIO LIPSUC01	1 : 1,5	556,9 ± 15,0	0,851 ± 0,01	-15,35 ± 1,91	94,96 ± 4,24
LIO LIPSUC02	1 : 2,5	159,7 ± 1,56	0,456 ± 0,01	-14,6 ± 4,38	97,68 ± 0,05
LIO LIPSUC03	1 : 5,0	108,74 ± 12,8	0,344 ± 0,06	-27,1 ± 3,67	96,92 ± 1,02
LIO LIPSUC04	1 : 10	98,39 ± 3,73	0,298 ± 0,04	-24,96 ± 1,77	88,50 ± 5,92

*Os valores são expressos como média (n = 3) ± DV; LIP:SUC = razão molar lipídeos:sucrose; LIP_{ANTES LIO} = formulação antes da liofilização; d = diâmetro; Pdl = índice de polidispersividade; ζ = potencial zeta; EE = eficiência de encapsulação

Na ausência do crioprotetor (1:0), a liofilização resultou em agregação das partículas (Pdl ≥ 1,0), entretanto a quantidade de fármaco encapsulada foi mantida (EE = 91,27 ± 1,78%) diferente de estudo realizado por Zhong et al. (2012) onde a liofilização sem o açúcar resultou em acentuada diminuição da EE (42,8%). A alta EE resultante em 1:0 LIP:SUC é sugerida pela alta lipofilicidade do ácido ursólico e alta afinidade com a membrana lipídica, na qual ficou mais retido. Em geral, o processo da liofilização não levou ao extravazamento significativo do conteúdo encapsulado, entretanto na presença do crioprotetor na razão molar 1:10 foi observado diminuição da EE (88,50 ± 5,92%), embora em relação à formulação antes da liofilização 91,28 ± 0,35 não foi significativa.

Para as formulações nas razões molares 1:0 e 1,5 LIP:SUC, a quantidade de AU encapsulada foi mantida após o processo da liofilização, porém com a formação de vesículas maiores, o que é explicado pela agregação das vesículas após a desidratação e/ou resuspensão. Entretanto a partir do emprego do crioprotetor na razão 1:2,5, este resultou na redução do diâmetro e distribuição do diâmetro médio das vesículas, proporcional ao aumento da concentração do crioprotetor, onde na razão molar 1:10 estes parâmetros permaneceram inalterados após o processo da liofilização, onde o diâmetro médio foi de 98,67 ± 1,44 nm antes e 98,4 ± 3,72 nm após a liofilização.

Além disso, foi observado o aumento em módulo do potencial zeta na presença de altas concentrações do açúcar, indicando a presença de uma matriz vítrea ao redor das partículas, capaz de impedir a agregação destas. Durante o processo de desidratação/resuspensão, um dos maiores desafios da liofilização é a manutenção da integridade e do tamanho de partícula. Estudos realizados por Cacela & Hinch (2006) demonstraram que em concentrações mais baixas, a sucrose se encontra essencialmente ligada à membrana lipídica, entretanto, a formação da matriz vítrea se torna evidente na presença de quantidades maiores do crioprotetor. Adicionalmente, o processo da liofilização não prejudicou a eficiência de encapsulação, mesmo na ausência do crioprotetor, o que se deve ao baixo coeficiente de permeabilidade do fármaco.

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os lipossomas de PC:CHOL razão molar 10:1, contendo ácido ursólico na razão 30:1 PC:AU e liofilizados com sucrose na proporção 1:10 lipídeos:sucrose, foram caracterizados morfolologicamente por meio de microscopia eletrônica de transmissão. As fotomicrografias obtidas (Figura 21) permitiram visualizar estruturas esféricas unilamelares, as quais se apresentaram com diâmetro variando de 100 a 120 nm, encontrando-se em concordância com os resultados provenientes das análises de tamanho de partícula realizadas por espalhamento dinâmico da luz em relação ao diâmetro médio e polidispersividade relativamente baixa. A presença de estruturas esféricas também foi observada por Yang et al. (2007) e Zhong et al. (2012) a partir da obtenção de lipossomas convencionais contendo paclitaxel e AU complexado com lamivudina, respectivamente; diferente do observado por Lopes et al. (2013) em que a dispersão de lipossomas PEGlados contendo AU submetida ao processo de homogeneização de alta pressão resultou na obtenção de vesículas multilamelares com dimensões variadas. Destaca-se que a técnica da evaporação do solvente e hidratação do filme lipídico seguida da sonicação das vesículas em dispersão foi eficaz, uma vez permitiu a obtenção de vesículas de tamanho reduzido, juntamente com a efetiva crioproteção das vesículas proporcionada pela sucrose, a qual evitou a agregação das vesículas durante a liofilização.

Figura 21. Fotomicrografias dos lipossomas de PC:CHOL razão molar 10:1, contendo ácido ursólico na razão 30:1 PC:AU e liofilizados com sucrose na proporção 1:10 lipídeos:sucrose resuspenso em água purificada (1:1000 m/v), obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, tratadas com solução de contraste de acetato de uranila 2,0%. Aumentos: a) 50.000. b) 80.000. c) 100.000. d) 200.000 vezes.

4.5 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A formulação lipossomal na razão molar 10:1 PC:CHOL, contendo ácido ursólico na razão 30:1 PC:AU e liofilizados com sucrose na proporção 1:10 lipídeos:sucrose, bem como as matérias-primas empregadas no preparo da mesma, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para avaliar possíveis interações intermoleculares que poderiam ocorrer entre os componentes do sistema (Figura 22), uma vez que a presença de uma molécula exógena incorporada na membrana lipídica pode induzir alterações nas bandas da fosfatidilcolina, tais como deslocamentos e variações de largura de banda, sendo que estes deslocamentos podem fornecer informações sobre processos físico-químicos que ocorrem nos sistemas (Severcan et al., 2005).

Figura 22. Representação gráfica dos espectros de absorção no infravermelho. Varreduras de 4500-500 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} . a) Ácido ursólico. b) Colesterol. c) Sucrose. d) Fosfatidilcolina de soja e) Lipossoma contendo ácido ursólico liofilizados com sucrose razão 1:10 lipídeos:sucrose (LIO LIPSUC04).

Inicialmente, observa-se na Figura 22 a e b, a presença de uma banda estreita localizada em 1714 cm^{-1} que corresponde à vibração de deformação axial de ligação dupla do grupamento carbonila, presente na estrutura do fármaco, e em 1600 cm^{-1} correspondente à insaturação (Bush et al., 1980) presente na molécula do colesterol. Dentre outras, destacam-se as bandas presentes em 3400 cm^{-1} relativa ao estiramento da hidroxila do fármaco e do colesterol, além de moléculas de água adsorvidas nos cristais, e a banda em 2900 cm^{-1} , pertencente à vibração do estiramento da ligação C-H destes compostos. Estas bandas presentes no espectro da formulação (Figura 22e) aparecem em menor intensidade em função do conteúdo reduzido destes dois compostos no sistema obtido.

Na mesma figura, podem ser visualizados os espectros da sucrose (Figura 22c), com destaque para as vibrações de estiramento da banda OH na estrutura do açúcar localizada na região de 3000-3700 cm^{-1} , e da fosfatidilcolina (Figura 22d), a

partir da qual podem ser visualizadas bandas de estiramentos correspondentes às três regiões distintas presentes na estrutura do lipídeo:

- **Região polar:** estiramentos axiais assimétricos do grupamento fosfato (PO_2) no intervalo de frequência de $1220\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ e do grupamento colina ($\text{CN}^+\text{-C}$) em uma frequência de cerca de 970 cm^{-1} ;

- **Região interfacial:** estiramento da carbonila (C=O) em uma faixa de frequência de 1714 cm^{-1} ;

- **Região hidrofóbica:** estiramentos axiais simétricos e assimétricos dos metilenos das cadeias acil (C-H_2), com frequências de cerca de 2850 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} .

A sobreposição dos espectros obtidos permitiu a observação da ocorrência de possíveis interações moleculares entre a membrana fosfolipídica e os demais componentes, no espectro da formulação (Figura 22e). Inicialmente foi observada uma redução da banda do grupamento fosfato presente na região polar do fosfolipídeo, a qual poderia ser sugerida em função da interação do crioprotetor com as cabeças polares do fosfolipídeo durante a substituição de moléculas de água retiradas durante o processo de liofilização, o que poderia explicar a efetiva crioproteção das vesículas (Manrique-Moreno et al., 2009).

A vibração do estiramento da carbonila pode fornecer informações a respeito do grau de hidratação da região da interface, sendo sensível à polaridade e grau de interação de ligações de hidrogênio na interface lipídeo-água (Severcan, 2003; Manrique-Moreno et al., 2009). Assim, alterações conformacionais na região da interface da membrana podem refletir em modificações na largura da banda da carbonila. Com a formulação em estudo, a alteração da banda da carbonila sugere a diminuição da mobilidade da região interfacial, a qual poderia ser explicada por possíveis interações de hidrogênio da carbonila do fármaco (Eloy et al., 2014), o que explicaria uma das fortes afinidades do AU com o lipídeo. A ocorrência de alterações na banda da carbonila em lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol foi previamente demonstrado por Arsov e Quaroni (2007), o qual mostrou que a diminuição da largura da banda da carbonila é proporcional à diminuição do grau de liberdade dos metilenos da região lipídica de lipossomas.

Com relação aos estiramentos dos metilenos do lipídeo, foi observada alteração dessas bandas no espectro da formulação, o que indica uma diminuição do grau de liberdade das cadeias lipídicas, decorrente de interações de hidrogênio

entre os grupamentos C-H do fármaco e do colesterol, as quais se alinham paralelamente às cadeias acil do fosfolípido, no centro da bicamada (Sousa, 2013). Estudo realizado por Mannok et al. (2010) demonstrou que estes grupos são sensíveis à conformação da cadeia lipídica. Alterações na largura dessas bandas dos metilenos refletem alterações no grau de liberdade da região hidrofóbica lipídica, sendo que em estado de fase mais ordenado, essas bandas são nítidas e centradas em frequências menores, indicando predominância de cadeias hidrocarbônicas com pouca dinâmica e menos movimento, sugerindo uma diminuição da T_g da membrana do fosfolípido, tanto pela presença do fármaco, como do colesterol.

Adicionalmente, a partir da análise dos espectros obtidos, foi verificado um alargamento da banda do grupamento OH presente na estrutura da sucrose, o que pode indicar a ocorrência de ligações de hidrogênio entre o açúcar e o fosfolípido. No caso da formulação contendo sucrose na razão 1:10 lipídeos:sucrose (Figura 22e), o amplo alargamento da banda do grupamento OH sugere a presença de uma ampla variedade de conformações OH com diferentes orientações, resultando em interações de hidrogênio de diferentes extensões e intensidades. Adicionalmente, as moléculas de açúcar estabelecem diferentes interações de hidrogênio intra e intermoleculares (Cacela & Hinch, 2003).

4.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Objetivando-se verificar possíveis transições de fase e/ou variações de entalpia em função de interações entre o fármaco e os outros componentes do sistema, os lipossomas correspondentes à razão molar 10:1 PC:CHOL, contendo ácido ursólico 30:1 PC:AU e liofilizados com sucrose na proporção 1:10 lipídeo:sucrose, bem como as matérias-primas empregadas no preparo dos mesmos, foram analisados por calorimetria exploratória diferencial.

A Figura 23a mostra um pico endotérmico em 283,05°C, a qual corresponde à temperatura de fusão do ácido ursólico. Adicionalmente, a curva de DSC do fármaco apresenta um pico exotérmico em 192°C, atribuído a um evento de cristalização, uma vez que durante o processo de aquecimento eventos de transições cristalinas são comuns, e geralmente a recristalização torna o novo cristal mais estável

termodinamicamente (Eloy, 2012b). Na mesma figura, podem ser visualizadas as curvas de DSC do colesterol (Figura 23b) e da sucrose (Figura 23c), os quais apresentaram picos endotérmicos referente aos eventos de fusão em 149,84°C e 190,77°C, respectivamente, bem como da fosfatidilcolina (Figura 24d), a partir do qual observa-se pico endotérmico em 227,22°C, correspondente à temperatura de fusão do fosfolípido.

Figura 23. Representação gráfica das curvas de DSC. Razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. Faixa de temperatura de 25-300°C. a) Ácido ursólico. b) Colesterol. c) Sucrose. d) Lipossoma branco de fosfatidilcolina. e) Lipossoma contendo ácido ursólico (LIO LIPSUC04).

Dentro das condições avaliadas, observou-se na Figura 23e o desaparecimento do pico referente ao evento da fusão do crioprotetor, presente em maior quantidade na formulação, o que poderia indicar a presença de uma matriz vítrea amorfa, uma vez que antes o açúcar estava na sua forma cristalina e após interagir com o fosfolípido no lipossoma houve a transição para o estado amorfo (Crowe et al., 1987). Segundo Cacela & Hinch (2006) em seu estudo com lipossomas de fosfatidilcolina na presença da sucrose, a formação da matriz vítrea é dependente da quantidade do açúcar empregada, de modo que em concentrações mais baixas este apenas interage com os grupos polares, o que leva ao efeito crioprotetor; entretanto apenas quantidades maiores de sucrose resultaram na

formação da matriz vítrea, a qual está essencialmente relacionada a diminuição da temperatura de transição de fase do fosfolípido.

A técnica de DSC pode fornecer informações sobre o efeito de substâncias nos parâmetros termodinâmicos, referentes às cadeias acil dos lipídeos (Mouritsen, 1991). A variação de entalpia observada pela curva do lipossoma na presença do fármaco e demais componentes, reflete interações de Van der Waals entre as cadeias acil do fosfolípido e aquelas alteradas pela interação com o açúcar (Manrique-Moreno et al., 2009), conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 06 – Valores de entalpia e temperatura onset obtidos através da análise calorimétrica

Amostra	Onset (°C)	ΔH (J/g)
LIO LIP PC	202,4	94,9
LIO LIPSUC04	210,5	17,3

LIO LIP PC = Lipossoma branco de fosfatidilcolina liofilizado sem sucrose; LIO LIPSUC04 = Lipossoma de fosfatidilcolina:colesterol contendo ácido ursólico e liofilizado com sucrose razão molar 1:10 lipídeo:sucrose

Assim, a diminuição da entalpia resultante da interação com uma adequada concentração do açúcar é sugerida por uma reduzida mobilidade das cadeias fosfolipídicas ocasionada pela presença da matriz vítrea, a qual é caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade molecular (Crowe et al. (1987). É importante ressaltar que para o ácido ursólico, a transição do seu estado cristalino para o amorfo já foi previamente relatada quando este se encontrava presente em dispersões sólidas preparadas pelo método da evaporação do solvente (Eloy et al., 2014). No caso dos lipossomas, isto pode ter acontecido, entretanto não foi detectado em função da baixa concentração do fármaco. Adicionalmente, foi observado ainda o deslocamento do pico referente à fusão do fosfolípido, sugerindo-se a efetiva incorporação destes na membrana fosfolipídica.

4.7 Determinação da solução receptora

A determinação do coeficiente de partição octanol/água é empregada na avaliação do grau de lipofilicidade de uma substância. Em estudo prévio realizado em nosso laboratório, o resultado obtido para o ácido ursólico indicou que após o particionamento, o fármaco migrou em sua totalidade para a fase orgânica, evidenciando sua elevada lipofilicidade, e solubilidade em água menor que o limite inferior de quantificação (1 ug mL^{-1}), o qual foi relatado previamente por Li et al. (2009). Este resultado permite o embasamento para a necessidade da utilização de substâncias adjuvantes no meio de dissolução, garantindo a solubilização adequada do fármaco neste, como conduzido por Eloy et al., 2012b) em estudo de dissolução *in vitro* de dispersões sólidas contendo ácido ursólico.

Para a realização dos estudos de liberação *in vitro* de fármacos, deve se garantir as condições de *sink*, ou seja, garantir que a concentração de fármaco liberado seja baixa o suficiente para que não ocorra a saturação do meio e altere assim o gradiente de liberação. Para garantia destas condições, a quantidade de fármaco no meio de dissolução deve ser equivalente ou inferior a 10% de sua concentração de saturação (Washington, 1990). Esta é uma etapa crítica no delineamento de estudos de liberação de fármacos hidrofóbicos, uma vez que a manutenção destas condições requer quantidade mais baixa de fármaco, o que pode dificultar sua quantificação no meio, especialmente no caso de fármacos lipofílicos (Souza, 2013).

Foram realizados estudos prévios de seletividade do meio de dissolução para este fármaco, utilizando tampão fosfato 30 mM pH 7,4 acrescido de 0,5% de lauril sulfato de sódio e tween 80 utilizados em trabalhos prévios (Yang Tao et al., 2007; Zhong et al., 2012) e o poloxamer 407, o qual se destaca pela melhora pronunciada da solubilidade de fármacos com limitada solubilidade aquosa (Eloy, 2012b). Dentre os tensoativos testados, apenas o poloxamer não interferiu na quantificação do ácido ursólico, uma vez que não apresentou pico cromatográfico coincidente com o do fármaco (Figura 12) dentro das condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.

Os resultados referentes aos estudos de solubilidade do ácido ursólico utilizando-se diversos meios com pH ajustado para 7,4 objetivando mimetizar o pH plasmático, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 07 – Coeficiente de solubilidade do ácido ursólico em diferentes meios aquosos, realizado com excesso de fármaco (8,0 mg/4,00 mL) sob agitação magnética de 600 rpm durante 24 horas, temperatura controlada de 37°C e quantificação por CLAE

Meio	Solubilidade AU ($\mu\text{g ml}^{-1}$)*
Água purificada	< LQ
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4	< LQ
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 + Poloxamer 407 0,5 %	122,78 $\pm$ 5,77
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 + Poloxamer 407 1,0 %	456,53 $\pm$ 1,72
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 + Poloxamer 407 1,5 %	825,88 $\pm$ 5,98
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 + Poloxamer 407 2,0 %	990,42 $\pm$ 11,80

*Os valores são expressos como média $\pm$ dp (n = 3); LQ = limite de quantificação

Os resultados permitiram demonstrar que é imprescindível a utilização de uma substância adjuvante para permitir a solubilização de fármacos hidrofóbicos como o ácido ursólico em meio aquoso, uma vez que os valores obtidos para água purificada e tampão fosfato 30 mM pH 7,4 se encontraram abaixo do limite de quantificação.

O meio no qual o ácido ursólico apresentou maior solubilidade foi a solução de poloxamer 407 2,0% em tampão fosfato 30 mM pH 7,4, uma vez que a quantidade de AU solubilizada pode ser otimizada com o aumento proporcional do tensoativo no meio, sendo esta última, a escolhida como meio de dissolução para os estudos de liberação *in vitro*. No caso de sistemas dinâmicos como os lipossomas e as micelas, é importante considerar a possível desestabilização destes sistemas quando em contato com o tensoativo na solução receptora gerando falsos resultados de liberação do fármaco. Entretanto a resuspensão prévia do liofilizado em solução tampão fosfato 30 mM contendo 2.0% do poloxamer não resultou em alteração significativa do tamanho e distribuição do tamanho das vesículas, como mostrado na Tabela 8.

Tabela 08 – Diâmetro médio e distribuição do diâmetro dos lipossomas liofilizados, após a resuspensão (1:1000 m/v) em água purificada ou meio empregado no estudo de liberação *in vitro*, obtidos por espalhamento dinâmico da luz

Meio*	d (nm)	Pdl
Água purificada	120,23 ± 12,4	0,384 ± 0,04
Tampão fosfato 30 mM pH 7,4 + poloxamer 407 2,0%	126,1 ± 5,11	0,388 ± 0,01

*Os valores são expressos como média ± dp (n = 3); d = diâmetro médio; Pdl = índice de polidispersividade

4.8 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do ácido ursólico livre e a partir dos lipossomas

Considerando-se que para se alcançar a eficácia terapêutica desejada, o fármaco deverá encontrar-se disponível para as células (Ferrony et al., 2012; Sousa, 2013), torna-se importante poder prever o perfil de liberação da substância encapsulada. Foram testados dois métodos distintos: a diálise, método de escolha para a maioria dos estudos de liberação *in vitro*, e o método da ultrafiltração, uma vez que ambos podem ser empregados na avaliação da liberação de fármacos a partir de preparações lipossomais e capazes de fornecer resultados em uma faixa de precisão aceitável, embora o método da dispersão geralmente resulte em uma liberação mais rápida e maiores taxas da substância ativa liberada (Boyd, 2003; Shazly et al., 2008).

Previamente ao estudo *in vitro* do perfil de liberação do ácido ursólico a partir dos lipossomas, foi conduzido teste de liberação do fármaco livre através de membrana de diálise, para que os resultados pudessem ser comparados. Entretanto não foi detectada presença do fármaco no meio receptor após 30 horas do estudo. Tal fato era esperado, uma vez que o fármaco se encontrava disperso em tampão fosfato na presença do poloxamer, o qual em temperatura fisiológica de 37°C devido à desidratação da porção hidrofóbica da molécula se organiza formando micelas (Dumortier et al., 2006) e esta parecem ter “aprisionado” o fármaco no seu interior hidrofóbico, impedindo sua passagem pela membrana.

Figura 24. Representação gráfica do perfil de dissolução do ácido ursólico livre, agitação por aparato de minipá e filtro de membrana 0,45 μm , e do perfil de liberação do ácido ursólico encapsulado nos lipossomas, obtido pelo método da diálise através de tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado a aparato de cesta. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Quantificação por CLAE.

Como mostra a Figura 24, considerando-se o perfil de dissolução do ácido ursólico, este resultou em dissolução de apenas 40% no meio de dissolução, durante o período avaliado. Esta dissolução incompleta comum no caso de compostos muito hidrofóbicos, é ocasionada pela presença do fármaco em concentração mais baixa, requerida pela condição *sink* (Washington, 1990), juntamente com a pouca ou nenhuma molhabilidade do ácido ursólico, impedindo a sua completa dissolução no meio.

Em relação à liberação do fármaco encapsulado nos lipossomas, estes permitiram a passagem do ácido ursólico pela membrana de diálise, o que não foi observado para o fármaco livre; embora tenha resultado numa liberação de apenas 12% deste no meio receptor. Segundo estudo realizado por Boyd (2003), a membrana de diálise pode ser considerada um fator limitante para liberação de fármacos hidrofóbicos, comparado ao método da ultrafiltração, o que levou a avaliar a liberação do AU por este método empregando separação do fármaco livre através de dispositivo Amicon (item 3.2.12). Entretanto, dentro das condições avaliadas, o fármaco não foi detectado no ultrafiltrado decorridas 30 horas de estudo, o que

também sugere a retenção do fármaco no interior das micelas no meio receptor, as quais podem ter impedido a passagem do fármaco livre pelo filtro do dispositivo.

De modo geral, o perfil de liberação de formulações lipossomais resulta em duas fases distintas, a primeira caracterizada por um efeito *burst*, seguida por uma fase de liberação mais lenta. O efeito *burst*, relacionado com a liberação de fármaco adsorvido na superfície das partículas (Fresta et al., 1996), varia com o tipo e composição lipídica. De acordo com Mohamed et al. (2006) a adição do colesterol em lipossomas de fosfatidilcolina contendo dibucaína resultou na redução deste efeito inicial, indicando que uma adequada quantidade de colesterol influencia na redução de partículas adsorvidas na superfície dos lipossomas, relacionado à diminuição da permeabilidade da membrana na fase cristal-líquido. A ausência de efeito *burst* inicial neste estudo evidencia a efetiva incorporação do AU sugerida pela presença do colesterol.

Na segunda fase da liberação do fármaco a partir dos lipossomas observou-se uma liberação acumulativa do fármaco em função do tempo, o que pode indicar uma liberação modificada (sustentada) deste, relacionada à capacidade dos lipossomas manterem a maior parte do fármaco encapsulada, devido a interações moleculares entre o mesmo e os componentes da membrana lipídica, conforme discutido anteriormente no item 4.6. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese, considerando-se que a membrana poderia resultar em um falso perfil sustentado pela interação com o fármaco, devido à alta lipofilicidade deste (Boyd, 2003).

Adicionalmente, a presença do fármaco no meio de dissolução foi detectada a partir de 24 horas. No caso de substâncias lipofílicas como o AU, as quais se encontram incorporadas na membrana dos lipossomas, a liberação depende em sua maior parte, do coeficiente de partição da substância ativa entre a membrana e a fase aquosa. Adicionalmente, dependendo da distribuição de tamanho das vesículas, quanto menor o tamanho, mais lenta será a liberação (Allen, 2004; Frézard et al., 2005; Sousa, 2013). Assim, a retenção apresentada pelo ácido ursólico pode ser explicada pelo seu baixo coeficiente de partição, e a presença de vesículas de menor diâmetro, as quais geralmente resultam em liberação lenta de fármacos hidrofóbicos, segundo Betageri & Parsons (1992) a partir de lipossomas unilamelares de DMPC e CHOL contendo propanolol.

É importante ressaltar que a retenção de substâncias ativas no interior de lipossomas é um fator importante a ser levado em consideração, uma vez que é necessário que o fármaco se mantenha no interior das vesículas tempo suficiente para atingir o seu alvo (Sousa, 2013). Entretanto para a doença de Chagas é desejável que o sistema de liberação seja capaz de modular a liberação do fármaco, de forma que este esteja disponível para eliminar o parasita. Além disso, para outra aplicação, é sabido que o ácido ursólico apresenta ação contra linhagens tumorais (Sethi et al., Wilson-Pereira et al., 2013, Lopes et al., 2013). Na terapia do câncer é interessante que o sistema carreador retenha o fármaco e acumule passivamente no tumor sólido pelo fenômeno EPR (Enhanced Permeability and Retention), o que poderia ser uma aplicação com potencial para os lipossomas desenvolvidos.

Por outro lado, deve-se levar em consideração a limitação de estudos de liberação *in vitro*, já que os mesmos podem não refletir completamente as características *in vivo*, uma vez que não levam em conta a presença do plasma e de enzimas que podem resultar na ruptura da estrutura vesicular em condições fisiológicas (Zhong et al., 2012).

4.9 Ensaio biológico *in vitro*

A demonstração do baixo ou ausente efeito citotóxico em linhagens celulares de mamíferos, juntamente com a avaliação da atividade tripanocida, bem como a determinação dos valores de IC₅₀ (concentração capaz de eliminar 50% das células ou parasitas, obtida pela regressão linear da curva dose-resposta) e do SI ou índice de seletividade são consideradas etapas críticas na investigação da atividade de compostos contra a doença de Chagas, segundo proposto por Romanha et al. (2010).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células saudáveis é um dos indícios iniciais de segurança do uso de determinada formulação. A viabilidade celular é um parâmetro amplamente utilizado para avaliação da toxicidade de diferentes substâncias em cultura celular. O princípio do teste baseia-se no emprego de um corante lipofílico, azul de tripan, o qual é adicionado ao meio celular e endocitado pelas células metabolicamente inativas, uma vez que substâncias que danificam as

membranas resultam na incorporação e ligação do corante, permitindo distinguir entre células viáveis e não viáveis pela medida de intensidade da cor (Rogerio et al., 2003).

A avaliação da citotoxicidade da formulação lipossomal liofilizada LIO LIPSUC04 objetivou investigar o potencial citotóxico do fosfolípido (SPC) assim como deste somado ao do crioprotetor, sucrose, empregado na estabilização das vesículas durante o processo da liofilização. O grupo controle incluiu o tratamento das células com os lipossomas brancos na ausência e presença do crioprotetor. A linhagem celular LLC-MK2 empregada no teste, previamente utilizada em outros trabalhos do grupo, para avaliação da citotoxicidade do AU em dispersões sólidas (Eloy, 2013) e nanoemulsões, é uma linhagem presente no epitélio renal de macacos Rhesus, um modelo de células de mamíferos para avaliação da citotoxicidade *in vitro*.

Figura 25. Citotoxicidade em linhagem celular LLC-MK2 do ácido ursólico em lipossomas de PC/CHOL liofilizados com e sem crioprotetor (crio) em relação ao grupo controle (lipossoma branco, com e sem crioprotetor), após 72 horas de incubação em estufa a 37°C. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular (média $\pm$ desvio padrão).

A Figura 25 mostra que os lipossomas contendo ácido ursólico, são seguros para a linhagem celular de fibroblastos renais de mamífero LLC-MK2, nas condições empregadas, até a concentração em que seriam necessários para carrear o fármaco

na concentração de 32 μM , mantendo uma viabilidade celular de cerca de 90% e acima de 75%, na ausência e presença do crioprotetor, respectivamente.

Em seguida avaliou-se a atividade tripanocida do ácido ursólico encapsulado nos lipossomas em linhagem da cepa CL da forma epimastigota proliferativa de *T. cruzi*, originada do intestino de triatomíneos, empregando-se o método colorimétrico do MTT, previamente utilizado em estudos de atividade *in vitro* do ácido ursólico por Cunha et al. (2006) e Ferreira et al. (2010), comparando-se ao tratamento com o controle, lipossoma branco. O princípio do teste do MTT (brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-1]-2,5-difeniltetrazolio), um sal de tetrazólio azul solúvel em água, se baseia na conversão do sal em um cristal roxo de formazan, insolúvel em água, através de uma clivagem redutiva do anel tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Assim, a quantidade de formazan formada é determinada por espectrofotometria para estimar o número de células viáveis em função do número de mitocôndrias (Fisichella et al., 2009).

Figura 26. Atividade tripanocida do ácido ursólico encapsulado em lipossomas de PC/CHOL liofilizados com sucrose em relação ao lipossoma branco, em linhagem da cepa CL BRENER de *T. cruzi* na forma epimastigota, após 72 horas de incubação em estufa BOD a 27°C. Os resultados foram expressos como porcentagem de morte celular (média $\pm$ desvio padrão).

Como mostrado pela Figura 26, dentro das condições avaliadas, os lipossomas contendo o fármaco exibiram atividade tripanocida significativamente maior comparado ao controle (lipossoma branco), a partir da concentração em que seriam necessários para carrear 8,0 μM do fármaco, com 100% e $63 \pm 7,5\%$ de morte celular, respectivamente.

Conforme discutido anteriormente, a velocidade de liberação do fármaco pode ter implicações ao nível de efeitos terapêuticos do sistema de liberação. Em sistemas lipossomais o fármaco encontra-se indisponível enquanto estiver associado ao sistema de transporte e a incapacidade de liberar o seu conteúdo num período de tempo viável pode resultar na diminuição do efeito terapêutico, quando comparado com o fármaco na sua forma livre (Allen, 2004; Sousa, 2013). Mesmo assim, o lipossoma teve uma eficácia de 100% com relação a morte parasitária dentro das condições avaliadas neste estudo. Deve-se considerar que a célula contendo o parasita poderia ser capaz de realizar o “uptake” do lipossoma contendo o fármaco, o que possivelmente teria influência na potencialização da morte celular causada. Entretanto estudos posteriores devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

A partir dos valores de IC_{50} obtidos para os lipossomas liofilizados com o crioprotetor, contendo ou não ácido ursólico, estes foram correlacionados entre si para a determinação do Índice de Seletividade, SI (Tabela 9) por meio da Equação 6:

$$(06) \quad \text{SI} = \text{IC}_{50 \text{ célula hospedeira}} / \text{IC}_{50 \text{ parasita}}$$

Onde SI corresponde à razão entre o valor de IC_{50} na célula hospedeira pelo valor de IC_{50} do parasita. Apenas compostos que atingem valores de SI superiores a 50 são considerados para estudos posteriores, segundo protocolo para *screening* de novos fármacos para a terapia da doença de Chagas (Romanha et al., 2010).

Tabela 09 – Valores de IC₅₀ e SI do lipossoma branco e do lipossoma contendo ácido ursólico em relação à linhagem celular de mamíferos LLC-MK2 e linhagem da cepa CL BRENER da forma epimastigota de T. cruzi

	IC ₅₀ (μM)			SI
	LLC-MK2 (μM)	CL BRENER (μM)		
	IC ₅₀			
LIP _{BRANCO}	77,42	5,45		14,2
LIP _{AU}	185,9	1,09		170,5

LIP_{BRANCO} = Lipossoma de PC/CHOL liofilizado com sucrose; LIP_{AU} = Lipossoma de PC/CHOL contendo AU e liofilizado com sucrose;

A partir dos dados apresentados na Tabela 9, o tratamento das células da linhagem de fibroblastos LLC-MK2 com o grupo controle (lipossoma branco) resultou em um aumento significativo da toxicidade em relação ao lipossoma contendo ácido ursólico, com valores de IC₅₀ correspondentes a 77,42 e 185,9 μM, respectivamente. Além disso, é importante ressaltar que embora o lipossoma contendo o fármaco tenha apresentado maior toxicidade contra a cepa CL do parasita (1,09), a presença do ácido ursólico levou a uma redução significativa da toxicidade em células apresentada pelo lipossoma na ausência deste, o que foi evidenciado pelos valores de SI de 14,2 (<50) para o lipossoma branco e 170,5 (>50) para o lipossoma contendo AU. A atividade citoprotetora do ácido ursólico também foi observada em estudo *in vivo* realizado por Ferreira et al (2013) o qual relata que tal efeito está relacionado à atividade antioxidante do ácido ursólico, a qual já foi demonstrada previamente (Saravanan et al., 2006; Haida et al., 2011).

5 - CONCLUSÕES

Com base nos métodos selecionados e nos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que a adequação do método proposto para quantificação do ácido ursólico empregando-se a técnica de CLAE provou ser conveniente e confiável, linear na faixa de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e seletivo tanto para a determinação da eficiência de encapsulação das formulações lipossomais contendo ácido ursólico, bem como para determinação deste no meio receptor. A investigação de diferentes proporções fosfolípídeo:fármaco permitiu definir que uma alta razão molar (30:1) resultou em alto teor de fármaco encapsulado (cerca de 90%), assim como na presença de alta razão molar fosfolípídeo:colesterol (10:1), uma vez que a razão molar 4:1 resultou no extravazamento de cerca de 30% do conteúdo encapsulado. Entretanto a partir da avaliação da estabilidade preliminar das formulações, o colesterol (razão molar 10:1 fosfolípídeo:colesterol) foi essencial para a redução da permeabilidade da bicamada em temperatura ambiente e melhor retenção do fármaco encapsulado em geladeira durante o período de 30 dias avaliado, bem como uma diminuição da agregação das vesículas em suspensão, comparado à formulação na ausência do colesterol. O processo de liofilização não comprometeu a retenção do fármaco encapsulado na ausência do crioprotetor; entretanto em relação ao diâmetro médio a crioproteção foi dependente da razão lipídeo:sucrose, onde a razão 1:10 foi de extrema importância para a manutenção do tamanho e distribuição do tamanho das vesículas, e tiveram sua agregação impedida. Além disso, o açúcar utilizado como crioprotetor cumpriu o papel de formação de uma matriz vítrea ao redor das partículas, o que foi evidenciado pela análise calorimétrica. Os espectros obtidos na região do infravermelho indicaram uma diminuição do nível de hidratação da região polar da membrana fosfolipídica, adicionado a uma redução do grau de mobilidade das cadeias acil lipídicas, a qual pôde ser sugerida pela ocorrência de interações de hidrogênio entre o fosfolípídeo e grupamentos C-H do fármaco e do colesterol, bem como interações entre as cadeias fosfolipídicas e o açúcar, o que evidencia a presença da matriz vítrea.

A formulação obtida permitiu a liberação *in vitro* do fármaco através de membrana de diálise, fato este não ocorrido com o fármaco livre. O estudo biológico *in vitro* empregando azul de tripan demonstrou que a formulação obtida mostra-se segura, considerando-se a linhagem celular de fibroblastos renais de mamíferos LLC-MK2, porém capaz de causar morte celular do *T. cruzi* em 100% pela técnica do MTT, empregando linhagem da cepa CL da forma epimastigota proliferativa. É

importante considerar um possível efeito de sinergismo entre o lipossoma branco e o fármaco, uma vez que na ausência deste último, o lipossoma foi capaz de causar morte parasitária considerável, sugerida pela seletividade do colesterol à membrana do parasita, entretanto outros estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese. Contudo apenas o lipossoma liofilizado na presença do ácido ursólico resultou em índice de seletividade aceitável, o que está relacionado ao efeito citoprotetor do fármaco.

Desta forma, o sistema lipossomal obtido pode ser um sistema de liberação interessante com características adequadas à veiculação pretendida e com potencial para melhoria do tratamento da doença de Chagas. Entretanto outras avaliações, como a atividade tripanocida *in vivo*, devem ser realizadas para confirmar tais expectativas

6 – REFERÊNCIAS

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. v. 303, p. 1818-1822, 2004.

ARRONDO, J. L. R.; GOÑI, F. M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. **Chem. Phys. Lipids**. v.96, p.53-68, 1998.

ARSOV, Z. QUARONI, L. Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids**. v.150, p.35-48, 2007.

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

AVANTI® Polar Lipids Inc. Disponível em: <https://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372>. Acessado em 03/2014.

BARENROLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Colloid & Interface Science**. v.6, p.66-77, 2001.

BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**. v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BELLINI, M.O. **Avaliação do potencial antialérgico de flavonóides: estudo sinérgico e influência de sistemas lipossomais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

BETAGERI, G. V., PARSONS, D. L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. **International Journal Of Pharmaceutics**. v.81, p.235-241, 1992.

BOSS, E. A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP.

BOYD, J. B. Characterization of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method. **International Journal of Pharmaceutics**. v.260, p.239-247, 2003.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**; Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

BRESCANSIN, E.G. **Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais contendo o fármaco nistatina**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

BUSH, S. F. et al. Cholesterol-lipid interactions: An infrared and raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers. **Chemistry and Physics Of Lipids**. v.27(2), p.101-111, 1980.

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

CAMPOS, M.C.O. et al. Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: activity on *Tripanosoma cruzi*. **Parasitology Research**. v.107(5), p.1193-1204, 2010.

CDC – **Centers for Disease Control and Prevention**. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>>. Acessado em: 12/2011.

CHEN, Y. et al. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V.57, p. 259-264, 2005.

CHORILLI, M. et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**. v.16, p.75-79, 2004.

CHORILLI, M. et al. Estudo da estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína por turbidimetria. **Ver. Bras. Farm.** v.88(4), p.194-199, 2007.

CLAYTON, J. Chagas Disease: pushing through the pipeline. **Nature**. v.465, p. 12-15, 2010.

COLLINS, C.H. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**. 25(4), 2002.

CONCEIÇÃO, A.I.F.S. et al. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. p.50-59, 2009.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.102, p.113-122, 2007.

CUNHA, L.C.S. et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Z Naturforsch.** v.62, p.668-672, 2007.

CUNHA, W. R. et al. A study of trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**.v.20, p.474-478, 2006.

- DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407: Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**. v.23(12), p.2709-2728, 2006.
- EDWARDS, K. A. et al. **Liposomes in analyses**. Talanta, London. v.68(5), p.1432-1441, 2006.
- ELOY, J.O. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**. 2012a.
- ELOY, J.O. et al. Solid dispersion of ursolic acid in Gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**. v.4(13), p.1436-45, 2012b.
- ELOY, J. O. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology** 253 (2014) 98–106, 2014.
- EL-MAGHRABY, G. M. M. et al. Drug interactions and locations in liposomes: correlation with polar surface areas. **International Journal of Pharmaceutics**. v.292, p.179-185, 2005.
- EL-SAMALIGY, M.S. et al. Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation. **International Journal of Pharmaceutics**. 308, p.140-148, 2006.
- FERREIRA, D. S. et al. Trypanossomicidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**. v. 106, p. 985-989, 2010.
- FERRONY, D. et al. Evaluation of the in vitro liberation of the nanostructured dexamethasone incorporated to a gel cream. **Disc. Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria. v.13 (1), p. 51-62, 2012.
- FISICHELLA, M. et al. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. **Toxicology In Vitro**. v.23, p.697-703, 2009.
- FLORENCE, A.T et al. **Emulsões, suspensões e dispersões**. In: **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, cap. 7, p. 345-411.
- FORD, J. L.; MANN, T. E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, p.422-230, 2012.
- FRANZEN. U., OSTERGAARD, J. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceutics using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**. 2012.

FREITAS, M.N. et al. Thermal analysis in the osmotic tablets pre-formulation studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 87, p. 905 – 911, 2007.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. **Química Nova**. v.28, p.511-518, 2005.

FRIGHETTO, N. et al. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15, n. 4, p. 338-343, 2005.

GALLETI, S. R. Palestra: Introdução à Microscopia Eletrônica. **Instituto Biológico**, São Paulo. v.65, p.33-35, 2003.

GARLE, M. J. et al. *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*. **Toxicology in vitro**. v.8 (6), p.1303-1312, 1994.

GIUBERTI, C.D.S. **Estudo de estabilidade e produção piloto de lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

GNOATTO, S. C. B. et al. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16(4), p.723-726, 2005.

GREGORIADIS, G. Overview of liposomes. **J. Antimicrob. Chemother.** v.28, p.39-48, 1991.

GUTERRES, S. S. SCHAFFAZICK, S. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v.26(5), p.726-737, 2003.

HAN, S.K. et al. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. **Lipids**. v.32, p.769–777, 1997.

JEONG, D.H. et al. Involvement of cytokines in the expression of metallothionein by ursolic acid. **Toxicology Letters**.v.155, p.369-376, 2005.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Tibtech**.v.16, p.307-320, 1998.

LASIC, D. D. **Liposomes: from physics to applications**. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. v., cap.3, p.63-90, 1993.

LEE, D. C.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. **Biosci. Rep.** v.6, p.235-256, 1986.

LI, B et al. Lyophilization of cationic lipid-protamine–DNA (LPD) complex. **Journal of Pharmaceutical Sciences**.v.89, p.355-364, 2000.

LI, R. et al. The Influence of Cosolvent on the Complexation of HP- β -cyclodextrins with Oleanolic Acid and Ursolic Acid. **AAPS PharmSciTech**.v. 10, n. 4, 2009.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 92–94, 2005.

LOPES, et al. Preparation, Physicochemical Characterization, and Cell Viability Evaluation of Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Containing Ursolic Acid. **BioMed Research International**, 2013.

RASSI JR, A. et al. Chagas disease. **The Lancet**. v. 375, p. 1388-1402, 2010.

MACHADO, L.C. et al. Liposomes applied in pharmacology: a review. **Estud. Biol.** n.29, v.67, p.215-224, 2007.

MAGALHÃES, N.S.S. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.43, n.2, 2007.

MALVERN®, 2011. Disponível em:<<http://www.malvern.com>>. Acesso em 10/2012.

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

MALVERN INSTRUMENTS®. Zeta potential: Theory of operation. In: Zetasizer theory Manual. p. 2.1-2.6. 1996b.

MANNOCK, D. A. et al. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1798, p.376-388, 2010.

MANRIQUE-MORENO, M. et al. A physico-chemical study with lecithin phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1788, p.1296-1303. 2009.

MANRIQUE-MORENO, M. et al. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. **Lett. Drug Des. Discovery**. v.7, p.50-56, 2010.

MERK MILLIPORE®. Disponível em: <<http://www.millipore.com/catalogue/module/C86533>>. Acessado em 04/2014.

MOBED, M., CHANG, T.M. Comparison of polymerically stabilized PEGgrafted liposomes and physically adsorbed carboxymethylchitin and carboxymethyl/ glycolchitin liposomes for biological applications. **Biomaterials**. v.19, p.1167-1177, 1998.

MOHAMED, M. N. et al. In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels. **Acta Pharm**. v.56, p.311-324, 2006.

MOHAMMED, A. R. et al. Lyophilisation and sterilization of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**, n.40, p.30-38, 2006.

MOHAMMED, A. R. et al. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.285(1-2), p. 23-34, 2004.

MOURITSEN, O. G. Theoretical models of phospholipids phase transitions. **Chem. Phys. Lipids**. v.57, p.179-194, 1991.

NEW, R. R. C. **Liposomes - A Practical Approach**, 1ed. New York: Oxford University Press, 1990.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. **Dermatol Clin**.v.29, p.53-62, 2011.

PAVIA, D.L. et al. **Introduction to Spectroscopy**, 4ed. Washington: Western Washington University, 2009.

PRAÇA, F. S. G. et al. **Validation of alternative apparatus for in vitro dissolution test of semisolid dosage forms**. In: 3º Simpósio Internacional de Pós Graduação e Pesquisa (SINPOSPq), Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1109-1143, 2005.

RIBEIRO, I. et al. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. **PLOS Neglected Tropical Disease**. v.3, n. 7, p. 484, 2009.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, p.771-780, 2004.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v.6 (3), p. 317-320, 2003.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v.105(2), p.233-238, 2010.

ROMERO, E. L et al. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 62, p. 576–588, 2010.

SASSI, L. M. **Estudo do Uso de Série de Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão para Análise de Partícula Única**. 2012. Bolsista CNPEM – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

SHAZLY, G. et al. Comparison of Dialysis and Dispersion Methods for In Vitro Release Determination of Drugs from Multilamellar Liposomes. **Dissolution Technologies**. 2008.

SENTHIL, S. et al. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. **International Journal of Cardiology**. V.119, p.131-133, 2007.

SEVERCAN, F. et al. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes – evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys**. 1668, p.215-222, 2005.

SETHI, G. et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**. 85, p.1579-1587, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. **Liposome in drug delivery: progress and limitations**. Int. J. Pharm., Amsterdam. v.154, p.123-140, 1997.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**. v.32 (6), 2009.

SOMOVA, L. O. et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicin**. v.10, p.115-121, 2003.

SOUSA, I. C. S .C. **Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para as quinolonas e seus derivados**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto – FCUP.

SOUZA, M. C. **Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno como sistema nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.71, p.445-462, 2009.

TALSMA, H. et al. The influence of the molar ratio of cholesteryl hemisuccinate/dipalmitoylphosphatidylcholine on liposome formation after lipid film hydration. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.62, p.105-112, 1992.

THERMAL ANALYSIS. A class of techniques to measure chemical or physical properties of a substance as function of temperature or time. 2011. Disponível em: <<http://www.chem.mun.ca/courseinfo/c3110/TGA%20lecture%202011.pdf>>. Acessado em: 03/2014.

THI, V.T.N.Y.; SHAO, H.R. Preparation of oleanolic acid solid dispersion systems and their dissolution in vitro. **Journal of China Pharmaceutical University**. v.34, p. 236-239, 2003.

TORCHILIN, V. P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. **Nat. Rev. Drug Discov**. v.4, p.145-160, 2005.

TOYRAN, N.; SEVERCAN, F. Competitive effect of vitamin D2 and Ca2 on phospholipid model membranes: an FTIR study. **J. Mol. Struct**. v.123, p.165-176, 2003.

TRATE CHAGAS. DNDi – Campanha: Acorde Agora! É Hora de Tratar a Doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.treatchagas.org>>. Acessado em: 12/2012.

TRIGOS, A. et al. In Vitro Trypanocidal Activity of Ergosterol and Cholesterol Derivative Compounds. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.31(8), p. 1126-1131, 2012.

ULRICH, A. S. et al. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1191, p.225-230, 1994.

VAN WINDEN, E.C.A. et al. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. **Pharmaceutical Research**. v.14, p.1151-1160, 1997.

VASCONCELLOS, T. et al. Solid Dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**. v.12, n. 23/24, p. 1068-1075, 2007.

VASCONCELOS, M. A. L. et al. Evaluation of in vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z Naturforsch.** V.61, p.477-482, 2006.

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

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **Internacional Journal of Pharmaceutics.** v.58, p.1-12, 1990.

WHO – **World and Health Organization.** Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/>. Acessado em: 04/2014.

WILSON-PEREIRA, C. et al. Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through JNK pathway in apoptosis-resistant colorectal cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry.** v.24, p.706-712, 2013.

XI, J. et al. Formulation Development and Bioavailability Evaluation of a Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **American Association of Pharmaceutical Scientists.** v.10, p.172-182, 2009.

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

YANG, T. et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics.** 338, p.317-326, 2007.

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

ZASADZINSKI, J. A. et al. Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. **Curr Opin Colloid Interface Sci.** v.16(3), p.203-214, 2011.

ZHOU, W. et al. Characteristics, phase behavior and control release for copolymer-liposome with both pH and temperature sensitivities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** v.395, p.225-232, 2012.]

ZHONG, Y. et al. Preparation and evaluation of liposome-encapsulated codrug LMX. **International Journal of Pharmaceutics.** v.438, p.240-248, 2012.