UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
GRUPO DE POLÍMEROS BERNHARD GROSS

VANANÉLIA PEREIRA NUNES GERALDO

FILMES NANOESTRUTURADOS CONTENDO LIPOSSOMOS PARA A LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO IBUPROFENO

SÃO CARLOS-SP
2008

VANANÉLIA PEREIRA NUNES GERALDO

FILMES NANOESTRUTURADOS CONTENDO LIPOSSOMOS PARA A LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO IBUPROFENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de
Oliveira Junior

SÃO CARLOS-SP

2008

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Geraldo, Vananélia Pereira Nunes

Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para a liberação controlada
do ibuprofeno / Vananélia Pereira Nunes Geraldo: orientador Osvaldo Novais
de Oliveira Junior. -- São Carlos, 2008.

102 p.

Dissertação (Mestrado –Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São
Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos
da Universidade de São Paulo.

1. Liberação. 2. Lipossomo. 3. Filmes automontados. I. Título.

Errata

<i>Folha</i>	<i>Linha</i>	<i>Onde se lê</i>	<i>Lê-se</i>
70	Legenda Fig 36	PAMAM/lipossomos	lipossomos
74	Legenda Fig 40	PAMAM/DPPG-IB	DPPG-IB

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vananélia Pereira Nunes Geraldo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 24/03/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira junior

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Débora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

Instituição: DQ/UFSCar

Assinatura

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Angelo e Vilma;
Ao meu irmão Marcelo e ao
meu esposo Daniel pelo incentivo
e carinho constantes!*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui e pela oportunidade de poder continuar.

Ao Professor Osvaldo Novais de Oliveira Júnior pela orientação, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, em especial ao meu esposo, pelo amor, paciência e conselhos.

Aos meus amigos de sala: Marcela, Adriana Pavinatto, Juliana, André, Rodrigo (Guidoval), Bruna, Andrei, Raquel, Dilleys e Heurison, Adriana Ibaldo, Edvaldo, Marcelo, Maurício, Rodrigo Pagliai, Valquiria, Alexandre, Washington e Rafael.

À doutoranda Marli Leite de Moraes, minha co-orientadora.

Ao Professor Valtencir Zucolotto pelas discussões e idéias.

Ao Professor Francisco Guimarães pelos conhecimentos em fluorescência transmitidos.

Ao pessoal técnico: Rosângela, Níbio, Ademir, Bertho, Débora Balogh e Felipe pela ajuda.

Ao pessoal do Laboratório de Biofísica, Bel e Andressa, pelo uso de equipamentos.

Ao pessoal da seção acadêmica e biblioteca pela excelente disposição em servir.

A todos meus agradecimentos!

RESUMO

A liberação controlada de fármacos é um tópico importante para várias iniciativas em nanotecnologia devido ao possível impacto para a sociedade, com a criação de sistemas otimizados que garantam a liberação num sítio específico e a uma taxa controlada. Dentre os vários paradigmas de liberação controlada destaca-se o uso de lipossomos, uma vez que muitos fármacos e drogas podem ser transportados. Este trabalho descreve a fabricação de filmes automontados de lipossomos que incorporam o fármaco ibuprofeno. Os lipossomos foram preparados de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil-oleoil fosfatidil glicerol (POPG), cujas camadas foram alternadas por interações eletrostáticas com camadas do dendrímero PAMAM geração 4. Medidas de espalhamento dinâmico de luz indicaram que a incorporação do ibuprofeno tornou os lipossomos de DPPC e DPPG mais estáveis, com uma diminuição no diâmetro médio de 140 para 74 nm e 132 para 63nm, respectivamente. Ao contrário, os lipossomos de POPG ficaram menos estáveis, com aumento do diâmetro de 110 para 160 nm. A influência na estabilidade foi confirmada em medidas de microscopia de força atômica nos filmes automontados, que mostraram grande tendência à ruptura nos lipossomos de POPG com a incorporação de ibuprofeno. O crescimento dos filmes automontados foi investigado com espectroscopia de fluorescência e uma balança de cristal de quartzo. A intensidade da fluorescência devida ao ibuprofeno aumentou exponencialmente com o número de camadas depositadas, mas não por causa de uma crescente adsorção de ibuprofeno. Ao contrário, a quantidade de material adsorvido nas primeiras camadas aumentou inicialmente, mas depois diminuiu drasticamente após a 6ª. bicamada, e o filme praticamente pára de crescer a partir da 10ª. bicamada. Portanto, a grande fluorescência para filmes espessos deve ser associada a um ambiente favorável, que aumenta a emissão quântica do ibuprofeno. A liberação do ibuprofeno, estudada com medidas de fluorescência, é mais lenta quando incorporado em lipossomos. Em experimentos com uma membrana de diálise, notamos que o tempo de decaimento do ibuprofeno puro é 5,2 h, enquanto este tempo aumentou para 9,2 e 8 h para ibuprofeno encapsulado em lipossomos de DPPG e POPG, respectivamente. O ibuprofeno também foi liberado de filmes automontados contendo lipossomos de DPPG e POPG, o que é promissor para o uso em bandagens (*patches*).

Palavras-Chave: Liberação. Lipossomo. Filmes automontados.

ABSTRACT

Controlled drug delivery is a key issue in a number of nanotechnology endeavors owing to the large impact on society that may be achieved if improved systems are created which allow for delivery at a specific target and with a controlled rate. Among the various paradigms employed in drug delivery, the use of liposomes is prominent because a variety of drug molecules can be carried. This work describes the fabrication of layer-by-layer (LbL) films made with liposomes incorporating ibuprofen. The liposomes were made with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC), dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) and palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl glycerol (POPG), whose layers were alternated with layers of the dendrimer PAMAM generation 4 via electrostatic interactions. According to dynamic light scattering measurements, the incorporation of ibuprofen caused DPPC and DPPG liposomes to become more stable, with a decrease in diameter from 140 to 74 nm and from 132 to 63 nm, respectively. In contrast, liposomes from POPG became less stable, with an increase in size from 110 to 160 nm. These results were confirmed with atomic force microscopy images of LbL films, which showed a large tendency to rupture for POPG liposomes. The film growth was monitored with fluorescence spectroscopy and a quartz crystal microbalance (QCM). The fluorescence intensity arising from ibuprofen increased exponentially with the number of layers, but this was not caused by an increased adsorption of ibuprofen. Instead, the QCM measurements showed that the amount of material adsorbed increases initially with the number of PAMAM/liposome(ibuprofen) layers, but after the 6th bilayer it decreases sharply and film growth practically stops after the 10th layer. Therefore, the inevitable conclusion is that the increased fluorescence is due to a favorable environment for the ibuprofen, whose quantum emission efficiency increases with the number of layers deposited. Also using fluorescence measurements, we noted that release of ibuprofen was delayed when incorporated in liposomes. For instance, in a membrane dialysis experiment, the characteristic decay time was 3.5 h for ibuprofen in solution, whereas this time increased to 9.2 and 8 h for ibuprofen encapsulated into DPPG and POPG liposomes, respectively. Ibuprofen could also be released from the LbL films made with DPPG and POPG liposomes, which is promising for further use in patches.

Keywords: Drug release. Liposomes. Layer-by-Layer films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Figura esquemática representando as principais barreiras encontradas pelos fármacos em seu caminho até seu destino	21
Figura 2 -	Representação esquemática de um lipossomo	24
Figura 3 -	Representação de um fosfolípido (molécula anfifílica)	25
Figura 4 -	Representação da estrutura química do fosfolípido dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC)	26
Figura 5 -	Comportamento de fase das membranas lipídicas	27
Figura 6 -	Representação esquemática do processo de fabricação de filmes finos pela técnica de automontagem	33
Figura 7 -	Representação esquemática de um filme fino obtido por automontagem proposto por Decher e colaboradores	33
Figura 8 -	Estrutura química do DPPC	40
Figura 9 -	Estrutura química do DPPG	41
Figura 10 -	Estrutura química do POPG	41
Figura 11 -	Estrutura química do ibuprofeno	41
Figura 13 -	Espectros de absorbância e fluorescência (excitação e emissão) para o ibuprofeno puro (2 mM) em tampão fosfato	44
Figura 14 -	Espectros de emissão para o ibuprofeno puro (0,1 mM) e incorporado nos lipossomos com $\lambda_{excitação}=224$ nm	45
Figura 15 -	Espectro de emissão para os lipossomos livres do ibuprofeno com $\lambda_{excitação}=224$ nm	46

Figura 16 -	Espectros de emissão para o ibuprofeno em lipossomos subtraindo-se os espectros de emissão dos lipossomos livres do fármaco ($\lambda_{exc} = 224\text{nm}$)	47
Figura 17 -	Distribuição de tamanho dos lipossomos constituídos de a) DPPG e b) DPPG-Ibuprofeno	48
Figura 18 -	Espalhamento dinâmico de luz para lipossomos constituídos de a) DPPC e b) DPPC-ibuprofeno	49
Figura 19 -	Distribuição de tamanho para os lipossomos de a) POPG e b) POPG-ibuprofeno	49
Figura 20 -	Representação do efeito da força de hidratação sobre a biomembrana	51
Figura 21 -	Espectros de emissão para solução de ibuprofeno livre (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C	53
Figura 22 -	Decréscimo da concentração de ibuprofeno livre dentro da membrana de diálise	53
Figura 23 -	Espectros de emissão da solução DPPG-Ibuprofeno (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C	54
Figura 24 -	Decréscimo da concentração do ibuprofeno encapsulado em lipossomos constituídos de DPPG dentro da membrana de diálise	55
Figura 25 -	Espectros de emissão da solução POPG-Ibuprofeno (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C	55
Figura 26 -	Decréscimo da concentração de ibuprofeno encapsulado em lipossomos de POPG interno à membrana de diálise	56
Figura 27 -	Representação esquemática do dendrímero PAMAM	60
Figura 28 -	Crescimento do filme PAMAM/DPPG-IB por UV-Vis	64

Figura 29 -	Espectros de emissão para o filme LbL com bicamadas de PAMAM e DPPG/Ibuprofeno	64
Figura 30 -	Crescimento do filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno por espectroscopia de fluorescência	65
Figura 31 -	Fluorescência para os filmes PAMAM/DPPG livres de ibuprofeno	66
Figura 32 -	Emissão para o filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno	66
Figura 33 -	Crescimento do filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno por fluorescência	67
Figura 34 -	Deslocamento da frequência com o tempo mostrando a adsorção de PAMAM e de lipossomos constituídos de DPPG sobre o cristal de quartzo	69
Figura 35 -	Massa adsorvida sobre o cristal durante a formação do filme PAMAM/lipossomos de DPPG	70
Figura 36 -	Acúmulo de massa de PAMAM/lipossomos de DPPG depositada sobre o cristal	70
Figura 37 -	Massa adsorvida por cada bicamada de PAMAM/lipossomos depositada sobre o cristal de quartzo	71
Figura 38 -	Variação da frequência com o tempo conforme a adsorção de bicamadas PAMAM/lipossomos-ibuprofeno	73
Figura 39 -	Massa adsorvida sobre o cristal durante a formação do filme PAMAM/lipossomos-ibuprofeno	74
Figura 40 -	Acúmulo de massa de PAMAM/DPPG-IB adsorvida sobre o cristal de quartzo	74
Figura 41 -	AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/DPPG	76
Figura 42 -	AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/DPPG-Ibuprofeno	76

Figura 43 -	AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/POPG	78
Figura 44 -	AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/POPG-Ibuprofeno	78
Figura 45 -	Fluorescência do filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno antes e após a liberação do ibuprofeno	80
Figura 46 -	Fluorescência da solução em contacto com o filme PAMAM/DPPG-ibuprofeno durante a liberação do ibuprofeno	81
Figura 47 -	Cinética da liberação do ibuprofeno a partir de lipossomos de DPPG imobilizados em filmes LbL	82
Figura 48 -	Curva padrão para o ibuprofeno tampão fosfato pH 6,3	83
Figura 49 -	Fluorescência do filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno durante a liberação do fármaco	84
Figura 50 -	Fluorescência para liberação do ibuprofeno a partir de filmes de PAMAM/POPG-ibuprofeno	85
Figura A1 -	Fluorescência dos solventes utilizados no preparo dos lipossomos	101
Figura A2 -	Fluorescência durante o preparo dos lipossomos	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Razões para o uso de lipossomos como sistemas de liberação de fármacos	28
Tabela 2 -	Tamanhos médios dos lipossomos encontrados por espalhamento dinâmico de luz	50
Tabela 3 -	Liberação de ibuprofeno a partir de lipossomos presentes em solução	57
Tabela 4 -	Massa adsorvida em cada bicamada sobre o cristal de quartzo	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM – microscopia de força atômica

DLS – espalhamento de luz dinâmico

DLVO – teoria desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek

DPPC – dipalmitoil fosfatidil colina

DPPG – dipalmitoil fosfatidil glicerol

IB – ibuprofeno

LbL – layer-by-layer

LMV – vesículas multilamelares grandes

NSADs – drogas antiinflamatórias não esteroidais

PAA – poli (ácido acrílico)

PAH – poli (alilamina hidrocloreada)

PAMAM (G4) – poliamidoamina de quarta geração

POPG – palmitoil fosfatidil glicerol

QCM – microbalança de cristal de quartzo

RPMI 1640 – meio de cultura para estudos *in vitro* que contém vários tipos de aminoácidos e vitaminas, além dos seguintes sais: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl , MgSO_4 , NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4

SUV – vesículas unilamelares pequenas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
CAPÍTULO 2	19
2. NANOTECNOLOGIA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	19
2.1 Importância da Liberação Controlada	19
2.2 Métodos mais empregados para liberação de princípios ativos	22
2.3 Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos	23
2.4 Lipossomos e suas aplicações	27
2.5 Avaliação do perfil de liberação “in vitro”	29
CAPÍTULO 3	31
3. FILMES NANOESTRUTURADOS	31
3.1 A Técnica de Automontagem (LbL)	31
3.2 Processos de adsorção em filmes automontados	34
3.2.1 Filmes automontados contendo polieletrólitos altamente carregados	34
3.2.2 Filmes automontados contendo polieletrólitos parcialmente carregados	35
3.2.3 Filmes automontados adsorvidos através de ligações secundárias	36
3.2.4 Filmes automontados adsorvidos por interações específicas	36
3.3 Filmes automontados de biomoléculas	37
CAPÍTULO 4	39
4. INCORPORAÇÃO DE IBUPROFENO EM LIPOSSOMOS	39
Introdução	39
4.1 Procedimentos Experimentais	40

4.1.1 Preparação dos lipossomos e incorporação do ibuprofeno.....	41
4.1.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	42
4.1.3 Determinação do tamanho dos lipossomos.....	42
4.1.4 Liberação do ibuprofeno por diálise.....	42
4.2 Resultados e Discussão	43
4.2.1 Espectroscopia de Fluorescência.....	43
4.2.2 Tamanho médio dos lipossomos por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	48
4.2.3 Liberação do ibuprofeno a partir de soluções	52
4.3 Conclusões.....	56
CAPÍTULO 5	58
5. FILMES AUTOMONTADOS CONTENDO LIPOSSOMOS E IBUPROFENO	58
INTRODUÇÃO	58
5.1 Procedimentos Experimentais	59
5.1.1 Limpeza dos substratos.....	59
5.1.2 Preparação dos filmes automontados	60
5.1.3 Crescimento dos filmes por espectroscopia de fluorescência.....	61
5.1.4 Crescimento dos filmes por Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	61
5.1.5 Estudo da morfologia dos filmes por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	62
5.1.6 Liberação do ibuprofeno a partir dos filmes automontados	62
5.2 Resultados e Discussão	63
5.2.1 Crescimento dos filmes automontados por espectroscopia de fluorescência	63
5.2.2 Crescimento dos Filmes por Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	68
5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	75
5.2.4 Liberação do ibuprofeno a partir dos filmes automontados	79
5.3 Conclusões.....	85

CAPÍTULO 6	88
CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS.....	88
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	101

CAPÍTULO 1

1. Introdução e Objetivos

Eficácia é a característica mais importante de um fármaco, que é freqüentemente reduzida pela inabilidade de entrega para as células ou tecidos específicos. Depois da administração, o princípio ativo atravessa barreiras fisiológicas por diferentes caminhos, diminuindo sua dosagem inicial até que chegue ao local desejado. Especificidade, estabilidade e solubilidade são características desejáveis, mas nem sempre atingidas ¹. Surge, então, a necessidade de desenvolver um sistema transportador de droga com tais características. Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos para a descoberta de sistemas transportadores, que possam manter níveis de droga contínuos em um tecido desejado, reduzindo efeitos colaterais². A primeira proposta de um sistema direcionado de transporte de fármacos data do início do século XX ³, quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, conhecido por "Bala Mágica de Ehrlich" (*Ehrlich's Magic Bullet*). Neste modelo, o fármaco é ligado ao transportador direcionado, e idealmente exibirá atividade farmacológica apenas no tecido alvo (mecanismos de especificidade, como a ligação entre antígeno e anticorpo, já eram conhecidos). Assim, os efeitos indesejáveis resultantes da ação em outros tecidos são diminuídos, enquanto o aumento da eficiência permite decréscimo da dose administrada. Porém, por mais atrativos e simples que possam parecer os conceitos de Ehrlich, são poucos os sucessos obtidos.

O primeiro grande passo nesta área se deu em 1965, com a publicação por Alec Bangham e colaboradores de um trabalho acerca da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, embora sem qualquer ligação imediata aos estudos de sistemas

transportadores de fármacos ⁴. Neste trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomos ⁵. No entanto, essas estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolipídios já eram conhecidas, sendo denominadas "figuras de mielina" ⁶. Após o trabalho de Bangham, os lipossomos impuseram-se como sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomos ⁷ despertou também o interesse da comunidade científica para aplicação médica e farmacológica. Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomos como sistema transportador de fármacos ⁸, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área.

Nos anos seguintes e até hoje, com a mesma finalidade, foi também estudada a aplicação de lipossomos, nanopartículas, copolímeros, lipoproteínas, emulsões, lecitinas, hormônios, peptídeos, anticorpos, e sistemas mais complexos como vírus e eritrócitos ^{9, 10}. O objetivo destes transportadores é aumentar o potencial terapêutico de um composto, impedindo que este se perca no trajeto para um alvo específico, evitando simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos em outra parte do organismo.

Neste contexto, o uso de sistemas que permitam estudar e controlar propriedades específicas desses materiais, em nível molecular, é de grande interesse. A construção de filmes ultrafinos organizados é essencial para a interpretação de interações específicas nos materiais. Um método utilizado para a construção de filmes ultrafinos de materiais orgânicos e biológicos é a técnica de automontagem ou *layer-by-layer (LbL)*. Essa técnica foi desenvolvida por Decher et al. ¹¹, sendo baseada na atração eletrostática entre moléculas de cargas opostas, com o filme formado através da adsorção alternada de polieletrólitos aniônicos e catiônicos sobre um substrato sólido. A técnica permite controle de propriedades, como a espessura e arquitetura molecular dos filmes, e pode ser explorada para liberação controlada de drogas ¹². A preparação de filmes finos funcionais é relevante para campos de

pesquisa cujas aplicações se estendem na indústria de revestimento de superfícies ¹³, microeletrônica ¹⁴, biomédica ¹⁵ e na agricultura ¹⁶. Filmes automontados também têm sido obtidos de proteínas ¹⁷, enzimas ¹⁸, DNA ¹⁹, vírus ²⁰, e peptídeos antimicrobianos ²¹.

Esse trabalho teve como objetivos a fabricação de lipossomos, contendo em seu interior um fármaco modelo, o ibuprofeno, seguido de sua imobilização em filmes LbL, para posterior liberação controlada do fármaco. A liberação do ibuprofeno também foi feita a partir da solução contendo lipossomos/ibuprofeno através de uma membrana de diálise. Foram preparados três tipos de lipossomos constituídos pelos fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil fosfatidil glicerol (POPG) respectivamente. A interação do fármaco com os lipossomos foi observada através de microscopia de força atômica (AFM), espalhamento de luz (DLS) e espectroscopia de fluorescência. Utilizou-se a técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM) para analisar a massa de lipossomos/ibuprofeno adsorvida sobre o substrato durante o crescimento do filme.

CAPÍTULO 2

2. Nanotecnologia para liberação controlada de fármacos

2.1 Importância da Liberação Controlada

A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido quando verificamos que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos), que devem ser vencidos para que se obtenha o efeito desejado. Somente uma parte em dez mil de um fármaco injetado intravenosamente alcança seu alvo celular final quando o alvo está localizado em sítios profundos.

Os sistemas de liberação foram classificados de acordo com a substância ou o método empregado na sua formulação. Esta substância normalmente representa um sistema multicomponente necessário para atravessar uma barreira sequencial e reconhecer o “bioendereço” encontrado “in vivo”. A integração racional destes componentes alvos é necessária para se obter concentrações farmacológicas adequadas dos fármacos nos tecidos alvo.

Há muitas barreiras potenciais para a liberação eficiente e seletiva de um fármaco na sua forma ativa. A maioria dos agentes terapêuticos são moléculas pequenas que têm vasta gama de distribuição no organismo após sua injeção intravenosa ²². O resultado disto é

frequentemente um baixo índice terapêutico devido aos altos índices de toxicidade nos tecidos saudáveis. Para conseguir seu objetivo o fármaco deve penetrar várias barreiras biológicas e está sujeito à eliminação por uma variedade de processos. A Figura 1 é uma representação esquemática das principais barreiras encontradas pelo fármaco em sua rota até seu destino ²³.

Essas limitações têm motivado o desenvolvimento de diferentes estratégias com o objetivo de aperfeiçoar a ação de vários tipos de fármacos. Muitas alternativas têm surgido a partir de diferentes áreas da ciência, com características que têm permitido transportar substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos do organismo e/ou modular a velocidade de liberação em função do tempo. Esses sistemas podem modificar o perfil de biodisponibilidade do fármaco sem alterar a estrutura química da molécula transportada.

Figura 1– Figura esquemática representando as principais barreiras encontradas pelos fármacos em seu caminho até seu destino.

Tradicionalmente espera-se que um fármaco seja biologicamente ativo, além de ser capaz de assegurar algum tipo de especificidade nos órgãos ou tecidos. Esta última propriedade é necessária para evitar efeitos colaterais indesejados quando fármacos citotóxicos estão sendo utilizados. Tais exigências são difíceis de alcançar somente através de

modificações na estrutura química do fármaco. Por essa razão, nos últimos anos um novo conceito farmacológico foi desenvolvido com respeito à preparação de sistemas de compostos biologicamente ativos através do uso de agregados moleculares. A proposta de agregados moleculares que possam liberar o fármaco a um local desejado é baseada na hipótese de que diferentes funções podem ser atribuídas às diversas substâncias químicas que compõem esse agregado. Com a ajuda de tais agregados, o composto biologicamente ativo pode ser sintetizado somente com seu potencial farmacológico em mente e sem considerar quaisquer limitações impostas pela liberação incorreta, tais como os efeitos colaterais indesejados. Moléculas específicas de agregados assegurariam a distribuição do composto dentro do organismo. Além disso, outras moléculas que formam o agregado deveriam preencher as funções adicionais, por exemplo, a proteção do fármaco da degradação. Os agregados de moléculas anfifílicas deveriam também ser capazes de incorporar fármacos que sejam difíceis de usar como agentes terapêuticos devido à baixa solubilidade em fluidos biológicos ou devido à sua degradação “in vivo”. Tais agregados podem ser preparados de compostos naturais e/ou sintéticos. Com isso, criam-se possibilidades de se estender o espectro de aplicações dos fármacos através da introdução de novas modificações tecnológicas.

2.2 Métodos mais empregados para liberação de princípios ativos

Dentre os sistemas de liberação mais estudados destacam-se os lipossomos ²⁴, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ²⁵ e as nanopartículas biodegradáveis ²⁶. As lipoproteínas, particularmente as LDL, são quase-esféricas com aproximadamente 220 Å de diâmetro, compostas principalmente de colesterol além de triglicerídeos, fosfolipídios e uma proteína (apolipoproteína B-100). As lipoproteínas de baixa densidade são responsáveis pelo transporte da maioria do colesterol plasmático em humanos, que é utilizado em vários processos celulares. Devido a essas características as LDL são boas candidatas para a entrega

de drogas ²⁷. O maior obstáculo para a aplicação farmacêutica das LDL é sua natureza endogênica, o que implica a necessidade de ser extraída do plasma humano.

O uso de micropartículas biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos e outros agentes ativos tem sido freqüente, incluindo antiinflamatórios ^{28, 29}, peptídeos ³⁰, hormônios ³¹ e agentes tumorais ³². Os polímeros utilizados para essa finalidade podem ser divididos em dois grupos: naturais e sintéticos. Os primeiros incluem polipeptídeos e proteínas (como a albumina, o fibrinogênio, a gelatina e o colágeno), polissacarídeos (como o ácido hialurônico, o ácido algínico e a quitosana) e células vivas (por exemplo, os eritrócitos). Entre os sintéticos, incluem-se os poliésteres alifáticos de hidroxí-ácidos (por exemplo, o ácido polilático – PLA, o ácido poli-lático glicólico – PLGA), etc. Os primeiros destes polímeros eram originalmente destinados a outros usos não-biológicos e foram selecionados devido às suas propriedades físicas atraentes:

PVP (poli vinil pirrolidona): capacidade de suspensão;

PEG (polietileno glicol): resistência à dureza;

PVA (álcool polivinílico): hidrofilicidade;

PLGA (ácido poli-lático glicólico): flexibilidade.

Para ser usado em liberação controlada de fármacos, o material deve ser quimicamente inerte ou livre de impurezas. Deve também ter uma estrutura física apropriada e ser rapidamente biodegradado. Uma grande variedade de fármacos foi incorporada aos lipossomos, que são apropriados para liberação coloidal em injeção intravenosa. Os lipossomos apresentam vantagens sobre outros sistemas, pois são biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos.

2.3 Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos

As esferas fosfolipídicas compostas de bicamadas lipídicas com um núcleo central aquoso foram primeiramente descritas há mais de 40 anos ³³. O termo lipossomo foi criado

em 1968 ³⁴ e as primeiras sugestões de que estas vesículas poderiam ter potencial como sistemas de liberação para fármacos apareceram logo depois ^{35, 36}. Contudo, o processo para tornar essas expectativas uma realidade clínica sofreu inúmeros contratempos e levou mais de 25 anos. Neste processo, novos tipos de lipossomos com propriedades farmacocinéticas mais adequadas e modelos de distribuição “in vivo” mais favoráveis foram produzidos ³⁷.

Lipossomos – ilustrados na Figura 2 - são estruturas vesiculares coloidais formadas por bicamadas fosfolipídicas. São vesículas formadas em água pela agregação das moléculas anfifílicas (Figura 3), que contêm um grupo polar e duas cadeias alifáticas em bicamadas que se fecham resultando em um compartimento interno aquoso.

Figura 2 - Representação esquemática de um lipossomo.

Figura 3 - Representação de um fosfolípido (molécula anfifílica)

Os fosfolípídios podem ser classificados em três categorias, de acordo com sua estrutura polar e sua cadeia hidrofóbica. A primeira categoria consiste em lipídios de forma cilíndrica, como a fosfatidilcolina, a fosfatidilserina e esfingomiéline. Esses lipídios formam bicamadas espontaneamente quando dispersos em meio aquoso. A segunda categoria consiste de lipídios com a forma de cone, como a fosfatidiletanolamina e a cardiolipina, que apresentam extensa cauda hidrofóbica junto à cabeça polar. A terceira categoria consiste em lipídios em forma de cunha, como os lisofosfolípídios.

Os componentes estruturais de maior abundância na membrana biológica são os fosfolípídios, sendo as fosfatidilcolinas as mais comuns (Figura 4). São moléculas anfifílicas, como na Figura 3, constituídas de um grupo polar, com uma ponte glicerol ligada a dois grupos alquílicos, os quais fazem parte de duas longas cadeias hidrocarbônicas. Essas moléculas não são solúveis em meio aquoso, mas alinham-se para formar uma bicamada plana laminar, de maneira a minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as

longas cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos. Tais interações são completamente eliminadas quando a bicamada laminar se dobra para formar vesículas fechadas. As fosfatidilcolinas, também chamadas de lecitinas, podem ser sintéticas ou extraídas da soja ou da gema do ovo. São muito utilizadas na preparação de lipossomos, com uma ampla faixa de aplicações. Além disso, apresentam algumas vantagens em relação aos outros fosfolipídios, como baixo custo, eletricamente neutra e o fato de serem quimicamente inertes.

Figura 4 – Representação da estrutura química do fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC).

Dependendo da temperatura em que os lipídios se encontram, eles podem existir em diferentes estados:

- a) estado gel, e
- b) estado líquido-cristalino (fluido)

Assim, à medida que a temperatura aumenta, atinge-se um ponto de transição, que é característico para cada lipídio, no qual a membrana passa de uma fase gel altamente ordenada para uma fase líquido-cristalina, em que a liberdade de movimento das moléculas individuais é maior. Tal mudança de fase causada por alteração na temperatura é chamada de mudança termotrópica dos lipídios. O entendimento da temperatura de transição de fase e da fluidez das membranas fosfolipídicas é importante tanto na preparação dos lipossomos quanto no seu uso, pois o comportamento da membrana lipossomal determina propriedades como: permeabilidade, fusão, agregação e ligação de proteínas. Assim, na temperatura de transição de fase (T_C) de uma camada vesicular, observa-se grande aumento na permeabilidade da

membrana (Figura 5). Como a T_C aumenta com o comprimento da cadeia alquílica e com o grau de saturação do grupo anfifílico, é possível modular a permeabilidade, tanto variando a estrutura do monômero, como através da mistura de diferentes lipídios anfifílicos. Desta forma, todas essas características podem afetar a estabilidade dos lipossomos e, portanto, seu comportamento em sistemas biológicos.

Figura 5 – Comportamento de fase das membranas lipídicas.

A permeabilidade pode também ser controlada pela incorporação de colesterol na bicamada fosfolipídica. A presença deste aditivo colabora para maior rigidez e estabilidade da membrana celular diminuindo a permeabilidade da bicamada.

2.4 Lipossomos e suas aplicações

Na Ciência Fundamental, os lipossomos têm sido utilizados como sistemas modelo de membranas, resultando na publicação de milhares de artigos científicos. Os lipossomos são também de grande utilidade em estudos de Físico-Química de lipídios, formação de domínios lipídicos em membranas³⁸, interações celulares³⁹ e deformabilidade de sistemas lipídicos⁴⁰. Nos estudos de aplicação mais imediata, o foco tem sido em sistemas transportadores. Contudo, sua utilização em outras aplicações tem sido considerável. Destacam-se aplicações biomédicas, em testes diagnósticos, transfusões sanguíneas na ausência de doador apropriado, desintoxicação através da utilização de agentes quelantes, além de cosméticos, com

regeneração e hidratação do estrato córneo e parte viva da epiderme, na estabilização de fertilizantes, na maturação de laticínios e em processos de purificação, recuperação, catálise ou conversão de energia ⁴¹.

As principais propriedades dos lipossomos para liberação de fármacos podem ser sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Razões para o uso de lipossoms como sistemas de liberação de fármacos.

Solubilização	Os lipossomos podem solubilizar fármacos lipofílicos que de outra forma seriam difíceis de ser administrados intravenosamente
Proteção	Os fármacos encapsulados nos lipossomos são inacessíveis às enzimas metabólicas; por outro lado, componentes do corpo (tais como os eritrócitos e os tecidos no sítio de injeção) não são expostos diretamente à dose total do fármaco.
Duração da Ação	Os lipossomos podem prolongar o tempo de ação do fármaco liberando este lentamente no corpo.
Potencial de direcionamento	As opções de direcionamento mudam a distribuição do fármaco pelo corpo.
Internalização	Os lipossomos são endocitados ou fagocitados por células, abrindo novas oportunidades para fármacos que dependem da administração lipossomal.
Amplificação	Os lipossomos podem ser usados como coadjuvantes em formulações de vacinas.

Como os lipossomos podem solubilizar tanto compostos lipofílicos como hidrofílicos, a forma de administração *in vivo* (intavenosa, intramuscular, subcutânea, dérmica, ocular,

pulmonar, nasal ou oral) também é outro parâmetro importante, que depende de uma escolha refinada do sistema lipossomo-fármaco a ser usado. Para sistemas transportadores de fármacos, existe distinção entre “transporte passivo”, em que lipossomos se direcionam no organismo de acordo com seu padrão de distribuição natural, sendo constituídos apenas por fosfolipídios e esteróis, e “transporte ativo”, em que se tentam modificar os padrões de distribuição natural dos lipossomos, através de alterações na sua estrutura e composição.

Apesar das limitações práticas para sistemas transportadores de fármacos, lipossomos continuam a ter grandes vantagens relativamente a outras famílias de transportadores. Os problemas existentes levaram ao desenvolvimento de sistemas lipídicos modificados (pela inserção de certas moléculas na sua camada exterior), com novas possibilidades de “transporte ativo” e o objetivo de evitar a sua eliminação pelo sistema retículo-endotelial. Esses sistemas podem ser divididos em lipossomos de primeira geração (convencionais) e de segunda geração (subdivididos em “stealth liposomes”, catiônicos e direcionados ou imunolipossomos). Tendo em vista que a principal limitação dos lipossomos convencionais é a sua eliminação de circulação pelo sistema retículo-endotelial, Lasic e Needham⁴² definem os “stealth liposomes” como sistemas lipídicos modificados com um tempo de meia vida em circulação (tempo necessário para que a sua concentração seja reduzida à metade) superior a 2 h. Contudo, podem-se obter com os “stealth liposomes” tempos de meia vida em circulação 100 vezes superiores aos dos lipossomos convencionais.

Conclui-se do exposto acima que os lipossomos podem gerar sistema de liberação de fármacos extremamente flexível e com muitas aplicações potenciais.

2.5 Avaliação do perfil de liberação “in vitro”

Após o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, os testes de avaliação do perfil de liberação “in vitro” servem para avaliar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo. Os estudos realizados “in vitro” constituem um controle qualitativo do

sistema de liberação e fornecem informações para um posterior estudo “in vivo” em animais e em estudos clínicos. Com o estudo “in vitro”, diminui-se o número de amostras para testes “in vivo”⁴³. Os métodos mais utilizados para estudar a liberação “in vitro” são:

- (1) células de difusão consistindo de compartimentos doadores e receptores separadas por membranas artificiais ou biológicas;
- (2) difusão através de membrana de diálise;
- (3) diálise reversa;
- (4) ultracentrifugação;
- (5) ultrafiltração centrífuga.

Para o método ser bem-sucedido, as condições experimentais devem simular ao máximo as condições “in vivo”, ou seja, temperatura próxima da fisiológica (37°C), agitação homogênea e meio de dissolução com pH adequado e isotonicidade. A metodologia exige ainda que a concentração do fármaco no meio de dissolução não exceda 10% da sua concentração de saturação.

CAPÍTULO 3

3. Filmes Nanoestruturados

O desenvolvimento de técnicas de fabricação de filmes ultrafinos foi impulsionado pela necessidade de se obter estruturas organizadas, com controle de espessura e de propriedades em escala molecular. Os métodos de Langmuir-Blodgett (LB) ⁴⁴ e de automontagem (LbL) ⁴⁵ despontam como os mais promissores neste aspecto, uma vez que permitem “organizar” moléculas individuais em arquiteturas altamente ordenadas ⁴⁶, propiciando ainda o planejamento das propriedades finais dos filmes obtidos e variação da espessura das camadas. Outro aspecto interessante nesta área científico-tecnológica é a sua interdisciplinaridade, que envolve profissionais das áreas de física, química, biologia e engenharia de materiais, o que vem fortalecendo seu desenvolvimento. Metodologias de obtenção de filmes ultrafinos constituem uma área em contínuo avanço, sendo ponto de partida para o emprego de materiais orgânicos em setores até então inimagináveis.

3.1 A Técnica de Automontagem (LbL)

A popularidade desta técnica está na sua habilidade na construção de novas arquiteturas moleculares por interações não-covalentes. O estudo dessas interações dentro do filme tem trazido uma diversidade de estruturas com propriedades e morfologias dependentes das condições experimentais. As interações eletrostáticas entre o poli-íon em solução e a superfície são de fundamental importância para a estrutura final do filme. Entretanto, forças

secundárias também mostram papel importante na espessura e propriedades finais de superfície, podendo determinar a estabilidade das multicamadas formadas.

Antes do desenvolvimento da técnica de automontagem por adsorção física existia a automontagem baseada em adsorção química (geralmente através de ligações covalentes), proposta por Sagiv e colaboradores^{47, 48} no início da década de 1980. A desvantagem deste processo é a necessidade de síntese de moléculas com funcionalidades específicas para a construção das camadas.

Decher e colaboradores^{45, 49, 50} propuseram um novo método de obtenção de filmes finos por automontagem. Este princípio de adsorção já havia sido empregado por Iler e colaboradores⁵¹, nos anos 1960, mas não houve grande repercussão. Ao invés da adsorção química entre as camadas, a técnica descrita por Decher baseia-se em interações físicas (eletrostáticas) de camadas com cargas opostas. Ao contrário da técnica utilizada por Sagiv, nenhuma ligação covalente precisa ser formada na construção das bicamadas. Um substrato sólido carregado negativamente é imerso na solução catiônica, de maneira que uma camada do polycation adsorva na superfície do substrato. Em seguida, o substrato é imerso na solução aniônica, promovendo a adsorção do poliânion na camada previamente adsorvida de polycation. Obtém-se assim uma bicamada, sendo que a repetição do processo permite a fabricação de filmes finos compostos por quantas camadas forem desejadas. A Figura 6 ilustra o processo de adsorção das bicamadas em filmes automontados⁵⁸.

Figura 6 – Representação esquemática do processo de fabricação de filmes finos pela técnica de automontagem.

Desta forma, podem-se adsorver alternadamente polieletrólitos catiônicos e aniônicos sobre substratos sólidos como mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Representação esquemática de um filme fino obtido por automontagem proposto por Decher e colaboradores.

Nos últimos anos, a técnica de automontagem tem beneficiado áreas relacionadas à nanociência e nanotecnologia. Pode-se verificar o potencial de aplicação da técnica de automontagem pela variedade dos materiais empregados, incluindo polieletrólitos, polímeros com corantes ^{52, 53} materiais biológicos ^{54, 55} e materiais cerâmicos ^{56, 57}. Essa variedade de materiais que pode ser empregada oferece características variadas aos filmes automontados, os quais podem ser classificados baseando-se no mecanismo responsável pela adsorção.

3.2 Processos de adsorção em filmes automontados

Os filmes automontados são classificados de acordo com o mecanismo envolvido na adsorção das camadas ^{58, 59}:

- 1) filmes construídos por interações iônicas em polieletrólitos altamente carregados;
- 2) filmes formados por interações iônicas em polieletrólitos parcialmente carregados;
- 3) filmes produzidos através de ligações secundárias como pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas, ou em conjunto com interações eletrostáticas;
- 4) filmes construídos por interações muito específicas.

3.2.1 Filmes automontados contendo polieletrólitos altamente carregados

A adsorção neste tipo de filme é por interações iônicas (eletrostáticas), resultando em camadas altamente estáveis. Sua produção segue os trabalhos iniciais descritos por Decher ⁴⁹, ⁵⁰. A autolimitação da adsorção é observada quando ocorre um equilíbrio entre as forças resultantes das interações eletrostáticas entre as cargas da camada previamente depositada e das cargas presentes na solução. O alto grau de repulsão entre as cargas nos materiais leva à formação de multicamadas extremamente finas (da ordem de 1 nm de espessura) e bastante homogêneas. Medidas de potencial zeta em filmes produzidos com poli(vinil imidazol) (PVI) e poli(ácido acrílico) (PAA) ⁶⁰ confirmaram a forte compensação de cargas quando uma camada de polieletrólito é depositada sobre outra de sinal contrário. A natureza da multicamada dos filmes automontados foi estudada por Lösche et al ⁶¹ em sistemas contendo poli(estireno sulfonado) (PSS) e poli(alilamina hidrocloreada) (PAH), através de medidas de reflexão de nêutrons. Notou-se que o aumento da rugosidade devido ao número de bicamadas faz aparecer uma quantidade maior de sítios disponíveis à adsorção, resultando no aumento da

espessura de cada bicamada adsorvida. A saturação deste processo ocorre após certo número de bicamadas devido à interpenetração das camadas adjacentes.

O controle da espessura dos filmes pode ser alcançado pela variação de alguns parâmetros tais como a concentração e a força iônica da solução. Um aumento na força iônica da solução, por exemplo, resulta no controle da repulsão entre as cargas elétricas das moléculas, e um aumento na quantidade de material adsorvido ou na espessura do filme e na sua rugosidade. Se a força iônica for aumentada excessivamente, o efeito de blindagem aumentará de modo que os polieletrólitos terão uma carga efetiva menor. Os filmes terão um comportamento semelhante aos filmes formados por polieletrólitos parcialmente carregados.

3.2.2 Filmes automontados contendo polieletrólitos parcialmente carregados

A adsorção neste tipo de filme também ocorre por interações iônicas, entretanto a espessura das camadas depositadas varia até uma ordem de grandeza em comparação ao item anterior utilizando-se polieletrólitos fracos. Essa diferença ocorre porque o número de cargas ao longo das macromoléculas pode variar quando o pH das soluções de polieletrólitos fracos como o PAA ou PAH é ajustado. Park et al ⁶² mostraram que a espessura média das camadas em filmes automontados de PAH e PAA pode variar de 0,25 nm até 8 nm, com apenas uma pequena variação do pH das soluções. Em outro trabalho contendo filmes de um azopolímero, Zucolotto et al ⁶³ mostraram que a espessura média de cada bicamada variou de 1 nm a 24 nm, ao alterar o pH das soluções numa faixa de 4 a 10.

3.2.3 Filmes automontados adsorvidos através de ligações secundárias

Neste filme a adsorção não ocorre somente devido às forças iônicas, mas também pode ocorrer inteiramente através de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas ou em conjunto com interações iônicas. Os primeiros a sugerir que filmes automontados poderiam ser produzidos por ligações de hidrogênio foram Stockton e Rubner ⁶⁴. Em outro trabalho, Stockton e Rubner ⁶⁵ produziram filmes automontados de polianilina (PANI), com polímeros não condutores eletrônicos, como poli(vinil pirrolidona) (PVP), poli(vinil álcool) (PVA), poli(acrilamida) (PAAm), poli(óxido de etileno) (PEO) e mostraram que a adsorção de polianilina nesses sistemas só ocorria se houvesse grupos que formam ligações de hidrogênio com os grupos amina e imina de polianilina.

3.2.4 Filmes automontados adsorvidos por interações específicas

Neste filme o mecanismo de adsorção das bicamadas é completamente diferente dos outros citados. Um exemplo é a adsorção de multicamadas a partir de avidina e poliamina funcionalizada com biotina estudada por Anzai et al ⁶⁶. Interações fortes e específicas entre a biotina e a avidina permitiram a adsorção alternada e o crescimento das multicamadas, mesmo quando esses materiais estivessem ambos positivamente carregados. Neste caso, as repulsões eletrostáticas foram superadas pelas interações específicas entre avidina e a poliamina contendo biotina. Outro tipo de interação específica na fabricação de filmes automontados foi relatado por Shimazaki et al ⁶⁷ que utilizou poli[2-(9-carbazol) etil metacrilato] e poli[2-[(3,5-dinitrobenzoil)oxil]etil metacrilato]. Esses polímeros possuem grupos laterais com caráter doador e aceitador de elétrons respectivamente. Quando filmes automontados foram produzidos sobre substratos recobertos com ouro, as multicamadas foram formadas por interações de transferência de carga.

3.3 Filmes automontados de biomoléculas

O uso da técnica de automontagem para a fabricação de filmes contendo materiais biológicos é bastante promissor pela possível aplicação em biossensores e biotecnologia ⁶⁸. A versatilidade da técnica permite que proteínas ou outras moléculas biológicas sejam imobilizadas nestes filmes, preservando a atividade biológica, como demonstrado por Lvov et al ⁶⁸. Materiais biológicos têm sido incorporados em filmes automontados, como enzimas, sistemas anticorpo-antígeno, peptídeos e nucleotídeos ⁶⁹. Essa variedade é possível porque proteínas solúveis em água possuem excesso de cargas na superfície. A desnaturação tende a ser minimizada durante o processo de imobilização, uma vez que a deposição ocorre em condições ótimas de pH e força iônica das soluções.

Diferentes técnicas para a imobilização de peptídeos antimicrobianos têm sido descritas na literatura. Bower et al ⁷⁰ utilizaram um pequeno peptídeo (nisina) que é liberado pela bactéria comum do leite *Lactococcus Latics* e pertencente a um grupo de peptídeos conhecidos por “lantibióticos”. Esses lantibióticos foram imobilizados sobre o poli(vinil cloreto) em superfícies de silício e mantiveram sua atividade, dessa forma eliminaram microorganismos que se aderiram sobre a superfície in vitro.

O estudo de filmes automontados para a liberação controlada de fármacos também tem sido explorado. Hammond et al ⁷¹ examinaram a incorporação da heparina, um fármaco com característica anticoagulante utilizado no tratamento de doenças como a trombose, em um polímero degradável, o poli(β -amino éster), através da técnica de automontagem. A degradação do filme contendo o fármaco foi analisada em vários valores de pH e observou-se que seguiu uma cinética de primeira ordem.

Considerando-se ainda a área de liberação controlada, as multicamadas de polieletrólitos revestindo micropartículas de droga aumentam o tempo de liberação. A permeabilidade da droga através da multicamada deve ser controlada pela mudança no

número de camadas e polímeros usados na automontagem. Entretanto, o máximo tempo de liberação alcançado foi da ordem de horas ⁷². A automontagem para fabricação de filmes de polímeros e lipossomos contendo drogas é interessante para sistemas de liberação controlada, principalmente considerando-se as vantagens da rota transdérmica (através de patches).

Filmes automontados contendo glicose oxidase (GOX) ⁷³ são exemplos comuns de biossensores para detecção de glicose através de medidas espectroscópicas ou eletroquímicas. O mecanismo envolvido nessas reações mostra que o produto da reação entre glicose (presente na solução eletrolítica) e a enzima imobilizada no filme automontado depositado sobre um eletrodo é detectado por uma variação da corrente de oxi-redução do sistema. O processo é reversível, de maneira que os eletrodos contendo as enzimas podem ser utilizados mais de uma vez. Filmes automontados de polieletrólitos convencionais como PAH e PAA também podem ser usados na detecção de fumaça, com experimentos de microbalança de cristal de quartzo, onde a quantidade de partículas de fumaça adsorvidas nos filmes foi registrada em função do tempo ⁷⁴. A sensibilidade pôde ser alterada com o ajuste da composição das bicamadas de PAH/PAA. Os filmes puderam ser reutilizados após completa dessorção das moléculas de fumaça através de banhos em água quente por poucos minutos.

As principais vantagens em se utilizar filmes automontados em sensores biológicos e de vapor estão na alta sensibilidade e rapidez na resposta em comparação com sensores produzidos por outras técnicas de fabricação de filmes finos e materiais de *bulk* ⁷⁵. Outras importantes vantagens são:

- a) possibilidade de combinar materiais em nanoestruturas para sensores específicos;
- b) controle da arquitetura molecular, que permite explorar o contato íntimo entre os componentes do sensor;
- c) pequena quantidade de material necessária para produção dos filmes.

CAPÍTULO 4

4. Incorporação de ibuprofeno em lipossomos

Introdução

O ibuprofeno é um agente antiinflamatório não-esteróide pertencente à classe do ácido propiônico, com característica anfifílica e é usado para reduzir a dor, a febre e inflamação; indicado principalmente no alívio dos sinais e sintomas de artrite reumatóide, osteoartrite, reumatismo articular, nos traumatológicos relacionados ao sistema musculoesquelético, quando estiverem presentes componentes inflamatórios e dolorosos. É indicado ainda no alívio da dor após procedimentos cirúrgicos em odontologia, ginecologia, ortopedia, traumatologia e otorrinolaringologia ^{76, 77}. Juntamente como as demais drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSADs), o ibuprofeno possui grande valor clínico, cerca de 5% de todos os medicamentos prescritos ⁷⁷. A administração desse fármaco é via oral em forma de gotas ou cápsulas com até 600 mg de 3 a 4 vezes por dia.

A inconveniência no uso das NSADs está frequentemente associada às complicações gastrointestinais, cerca de 15 a 30% dos pacientes que usam esses medicamentos por um longo tempo possuem úlceras gastrointestinais e hemorragias além de disfunção renal ⁷⁸. A entrega direcionada do ibuprofeno pode ajudar a reduzir esses efeitos colaterais, o que justifica um grande número de estudos. A incorporação do ibuprofeno em dendrímeros como a poliamidoamina (PAMAM), por exemplo, resultou em uma liberação mais lenta comparada com o fármaco puro ⁷⁹. A liberação do ibuprofeno a partir de determinado gel contendo

lipossomos também mostrou resultados promissores em que se mantiveram níveis constantes do fármaco por um período favorável durante sua liberação⁸⁰.

O trabalho desta dissertação visa a investigar uma maneira de liberar ibuprofeno a partir de lipossomos, mas imobilizados em filmes automontados. Neste capítulo, em particular, o item 4.1 descreve os procedimentos experimentais para a fabricação de lipossomos, a incorporação do ibuprofeno nesses sistemas e as técnicas utilizadas para a caracterização dessas estruturas. O item 4.2 trata os resultados procurando, sempre que possível, compará-los com trabalhos de outros pesquisadores. E, por último, o item 4.3 traz as conclusões deste capítulo.

4.1 Procedimentos Experimentais

Os fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil fosfatidil glicerol (POPG), foram comprados da Avanti Polar Lipids (USA). Os solventes clorofórmio e metanol da Merk (Alemanha). O fármaco ibuprofeno, procedente da Sigma (USA), foi gentilmente cedido pelo professor Adalberto Pessoa Jr. da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - São Paulo. As Figuras 8 a 11 mostram as estruturas químicas dos materiais empregados.

Figura 8 - Estrutura química do DPPC

Figura 9 – Estrutura química do DPPG.

Figura 10 – Estrutura química do POPG.

Figura 11 – Estrutura química do ibuprofeno.

4.1.1 Preparação dos lipossomos e incorporação do ibuprofeno

Para o preparo das vesículas seguiu-se o procedimento descrito por Lima, e colaboradores⁸¹. Foram dissolvidas quantidades apropriadas de DPPG (1 mM) e ibuprofeno (0,1 mM) em clorofórmio/metanol (2:1). A solução foi colocada em tubo Falco sendo o solvente removido sob vapor de N₂ para obtenção de filmes lipídicos os quais foram secos sob vácuo por 2h a fim de remover traços de solvente orgânico. Os filmes lipídicos foram hidratados com tampão fosfato, 20 mM, pH 6.3, e colocados em ultra-som por 20 min obtendo-se assim as vesículas multilamelares grandes (LMV). As dispersões de LMV foram sonicadas seguindo-se 10 ciclos de 30 s cada e 1 min de espera a cada ciclo em um sonicador Thornton do Laboratório de Biofísica - IFSC, para obter vesículas unilamelares pequenas (SUV). Seguiu-se o mesmo procedimento para o preparo de vesículas constituídas de DPPC e

POPG. Foram preparadas vesículas livres do fármaco seguindo-se o procedimento descrito anteriormente, para observar as possíveis alterações.

4.1.2 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência a fim de se verificar a emissão do cromóforo presente na molécula de ibuprofeno foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF5301-PC equipado com uma lâmpada de xenônio e uma cubeta de quartzo de 1 x 1 cm. Os parâmetros experimentais foram $\lambda_{EX} = 224$ nm, $\lambda_{EM} = 288$ nm e slit com 3 nm, valores utilizados por Sa'decka em seus trabalhos com ibuprofeno⁸².

4.1.3 Determinação do tamanho dos lipossomos

O diâmetro médio dos lipossomos livres e contendo o fármaco foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) no Laboratório de Química Orgânica do IQSC – USP em um equipamento Brookhaven equipado com um laser Nd-Yag, $\lambda = 532$ nm, a uma temperatura de 25° C e um ângulo de detecção de 90°.

4.1.4 Liberação do ibuprofeno por diálise

A liberação do ibuprofeno foi feita a partir da solução lipossomo/ibuprofeno. Foram colocados 3 mL da solução em uma membrana de diálise de 3,5 kDa (que permite a passagem somente de moléculas de ibuprofeno), a qual foi imersa em um béquer contendo 50 mL de solução tampão fosfato, 20 mM, pH 6,3 à temperatura de 24° C e sob agitação. Acompanhou-se a concentração de ibuprofeno interna e externa à membrana de diálise por espectroscopia de fluorescência, $\lambda_{EXC} = 224$ nm, a cada 2 horas trocando-se a solução tampão após cada

medida. A Figura 12 representa o aparato utilizado. Foi feita a liberação de ibuprofeno puro (0,1 mM) através da membrana de diálise para comparação.

Figura 12 – Aparato utilizado para liberação do ibuprofeno a partir dos lipossomos em solução.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Espectroscopia de Fluorescência

A Figura 13 apresenta os espectros de absorbância e fluorescência (excitação e emissão) para o ibuprofeno puro (2 mM) em tampão fosfato. Os espectros de excitação e absorbância apresentam duas bandas características: uma em $\lambda_{\text{EXC}} = 224 \text{ nm}$, a qual foi utilizada em todas as demais medidas e outra em $\lambda_{\text{EXC}} = 263 \text{ nm}$.

Figura 13 – Espectros de absorbância e fluorescência (excitação e emissão) para o ibuprofeno puro (2 mM) em tampão fosfato.

A banda de excitação em 224 nm pode ser justificada teoricamente pela absorção de luz pelo elétron que está no nível fundamental (S_0) para o segundo estado singlete excitado (S_2), enquanto que a banda de excitação em 263 nm está associada à promoção do elétron que está no nível fundamental para o primeiro estado singlete excitado (S_1). A banda de excitação em 224 nm possui maior intensidade de fluorescência ou rendimento quântico do que aquela em 263 nm, o que mostra que a probabilidade de se promover o elétron do nível fundamental para o segundo estado singlete excitado é maior do que a probabilidade de promovê-lo para o primeiro estado excitado. O espectro de emissão fornece uma banda com comprimento de onda característico em 288 nm, correspondente à transição do primeiro estado singlete excitado para o estado fundamental.

Os estudos de fluorescência para observar a inclusão do ibuprofeno nos lipossomos mostraram uma alteração significativa na emissão do fármaco após sua incorporação. Os

espectros de fluorescência para o ibuprofeno puro e incorporado nos lipossomos, em solução tampão, estão mostrados na Figura 14. Existem dois pontos a serem discutidos: o primeiro é o aparecimento de uma segunda banda em 366 nm que, em princípio, atribuía-se à incorporação do ibuprofeno nos lipossomos; o segundo é o aumento considerável na intensidade de fluorescência associada à banda de emissão do ibuprofeno (288 nm).

Figura 14 – Espectros de emissão para o ibuprofeno puro (0,1 mM) e incorporado nos lipossomos com $\lambda_{\text{excitação}}=224$ nm.

Uma possível explicação para esses resultados pode ser encontrada nos espectros de emissão obtidos para os lipossomos livres do fármaco (Figura 15). Fosfolipídios não emitem, pois não apresentam grupos cromóforos, porém após várias medidas de emissão concluiu-se que os lipossomos estavam emitindo em 297 nm, ou seja, muito próximo ao comprimento de onda do ibuprofeno e em 366 nm, o que leva a concluir que essa segunda banda não está relacionada à incorporação do fármaco nos lipossomos e sim à emissão dos lipossomos puros.

Segundo o fabricante dos fosfolipídios (Avanti Polar Lipids - USA), por se tratar de uma região de baixo comprimento de onda, esse resultado pode ser devido a algum material fluorescente que provém da sílica usada para purificar os fosfolipídios. Entretanto, não foi

possível determinar o tipo de impureza. Uma outra possibilidade é o espalhamento causado pela formação da bicamada. Um estudo mais detalhado sobre a fluorescência dos fosfolípidios e solventes utilizados encontra-se no Apêndice.

Figura 15 – Espectro de emissão para os lipossomos livres do ibuprofeno com $\lambda_{\text{excitação}}=224$ nm.

O acréscimo na intensidade de fluorescência em 288 nm observado após a incorporação do ibuprofeno, como explicado acima, deve-se à contribuição da fluorescência dos lipossomos. Porém, mesmo descontando-se os espectros de emissão dos lipossomos, observa-se ainda um aumento considerável na intensidade de fluorescência em 288 nm após a incorporação do ibuprofeno. Esse resultado está apresentado na Figura 16. Após a inclusão do ibuprofeno nos lipossomos a intensidade de fluorescência aumentou significativamente em 288nm. Isso é porque os lipossomos oferecem um microambiente mais protegido para o fármaco, ou seja, desativam o processo de transferência de energia não radiativa entre as moléculas de ibuprofeno por deixarem-nas mais distantes umas das outras. Com uma menor perda de energia, aumenta-se a probabilidade de o elétron decair de um estado excitado para o estado fundamental o que é refletido no aumento da intensidade de fluorescência.

Figura 16 – Espectros de emissão para o ibuprofeno em lipossomos subtraindo-se os espectros de emissão dos lipossomos livres do fármaco ($\lambda_{exc} = 224\text{nm}$).

Efeitos similares foram observados por Manzoori e colaboradores que analisaram o comportamento do ibuprofeno em β -ciclodextrinas⁸³. Eles utilizaram a fluorescência para avaliar a habilidade dessas estruturas na inclusão do ibuprofeno. A intensidade de emissão do fármaco também aumentou após sua incorporação em β -ciclodextrinas mostrando que essas estruturas, assim como os lipossomos, desativam o processo de transferência de energia entre as moléculas de ibuprofeno. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos cuja estrutura possui uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica e são muito utilizadas na área farmacêutica para melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade de drogas.

4.2.2 Tamanho médio dos lipossomos por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os dados de DLS mostraram que a incorporação do fármaco em lipossomos constituídos de DPPC e DPPG provocou um decréscimo no tamanho das nanoestruturas, enquanto que o tamanho dos lipossomos de POPG aumentou após a inclusão do fármaco. O diâmetro médio dos lipossomos livres constituídos de DPPG foi 132nm, enquanto que os lipossomos de DPPG contendo ibuprofeno tiveram diâmetro de 63nm (Figura 17), indicando que provavelmente uma pequena fração da droga foi incorporada.

Figura 17 – Distribuição de tamanho dos lipossomos constituídos de a) DPPG e b) DPPG-Ibuprofeno.

Lipossomos constituídos de DPPC tiveram o mesmo comportamento dos lipossomos de DPPG, ou seja, lipossomos livres do fármaco apresentaram maiores diâmetros médios (140 nm) do que os lipossomos contendo ibuprofeno (74 nm), Figura 18. Schutze e Müller-Goymann⁸⁴ observaram resultados semelhantes após a incorporação do diclofenaco de sódio em lipossomos de fosfatidilcolina. O diâmetro médio dos lipossomos livres foi 211 nm e na presença da droga esse valor diminuiu para 194 nm. Eles observaram pela técnica de NMR que, por se tratar de uma droga anfifílica, o diclofenaco encontra-se próximo à cabeça hidrofílica dos fosfolipídios.

a)

b)

Figura 18 – Espalhamento dinâmico de luz para lipossomos constituídos de a) DPPC e b) DPPC-ibuprofeno.

A Figura 19 apresenta a distribuição de tamanho para os lipossomos constituídos de POPG na ausência e presença do ibuprofeno. Neste caso observou-se um comportamento inverso, ou seja, após a inclusão do ibuprofeno ocorreu um aumento no diâmetro médio das vesículas de 110nm (lipossomos livres) para 160 nm (lipossomos contendo ibuprofeno). Uma possível razão para explicar o comportamento diferente dos lipossomos de POPG é apresentada abaixo.

a)

b)

Figura 19 – Distribuição de tamanho para os lipossomos de a) POPG e b) POPG-ibuprofeno.

Os resultados dos diâmetros dos lipossomos com seus respectivos coeficientes de polidispersividade estão apresentados na Tabela 2. A polidispersividade é o desvio padrão relativo da amostra, ou seja, dá informações sobre a heterogeneidade no tamanho das partículas e pode ser dividido em três categorias: uma amostra é monodispersa se a polidispersividade é menor que 20%, possui polidispersividade média se o fator está entre 20% e 30% e é polidispersa se o fator de polidispersividade é maior que 30%, o que indica uma amostra heterogênea⁸⁵. Os pequenos valores de polidispersividade indicam que as populações dos lipossomos exibem uma distribuição de tamanho homogênea o que está de acordo com as dispersões coloidais farmacêuticas.

Tabela 2 – Tamanhos médios dos lipossomos encontrados por espalhamento dinâmico de luz.

<i>Sistema</i>	<i>Diâmetro Médio (nm)</i>	<i>Polidispersividade</i>
DPPG	132	0,216
DPPG/Ibuprofeno	63	0,224
DPPC	140	0,285
DPPC/Ibuprofeno	74	0,263
POPG	110	0,197
POPG/Ibuprofeno	160	0,235

As dispersões lipossomais não são termodinamicamente estáveis. A energia total de um sistema disperso pode ser sempre diminuída pela redução na área interfacial. Essa tendência à agregação é atribuída às forças atrativas de van der Waals. A existência de outras interações entre as partículas determina a estabilidade. Segundo a teoria de DLVO, desenvolvida por Derjaguin, Landau⁸⁶, Verwey e Overbeek⁸⁷, se a repulsão eletrostática entre os lipossomos é muito baixa, os lipossomos devem se agregar rapidamente devido às forças atrativas de van der Waals. O que se observa nas medidas de DLS para os lipossomos

de DPPG e DPPC após a incorporação do ibuprofeno é que a agregação diminui. Se a agregação é menor significa que o ibuprofeno tornou os lipossomos mais estáveis, ou seja, a repulsão eletrostática entre eles é maior. Isso significa que uma outra força, não considerada na teoria DLVO, deve ser responsável para manter os lipossomos distantes o suficiente para evitar a atração de van der Waals. Sabín e colaboradores observaram que essa força é provavelmente a força de hidratação⁸⁸.

Existem vários estudos que analisam o comportamento das bicamadas fosfolipídicas e um fator relevante que se tem observado é a alteração na densidade de carga na interface bicamada/ água⁸⁹. As interações entre as duplas camadas dependem da polarização das moléculas de água. Qualquer distúrbio nas bicamadas, por menor que seja, provoca uma alteração nessa densidade que por sua vez altera a força de hidratação sobre os lipossomos. Quando a força de hidratação é levada em conta uma barreira repulsiva aparece, sobrepondo-se às forças atrativas de van der Waals, sendo responsável pela estabilidade dos lipossomos (Figura 20).

Figura 20 – Representação do efeito da força de hidratação sobre a biomembrana.

Para tentar compreender a diferença de comportamento para os lipídios diferentes, lembramos que tanto o DPPC quanto o DPPG formam estruturas bastante compactas, principalmente porque as duas cadeias alifáticas têm o mesmo comprimento. O POPG, por

outro lado, empacota-se de maneira menos compacta devido à diferença no comprimento das duas cadeias. É provável, por isso, que as forças de hidratação sejam bastante diferentes do que ocorre para as bicamadas de DPPC e DPPG nos lipossomos. A incorporação do ibuprofeno portanto teve efeito diferente, até porque pode ser mais fácil do que nos lipossomos de DPPC e DPPG. A alteração na densidade de carga sobre as bicamadas não contribuiu para a repulsão entre os lipossomos, e as forças atrativas de van der Waals entre as vesículas prevaleceram, causando aumento no tamanho médio dos lipossomos na presença do ibuprofeno.

4.2.3 Liberação do ibuprofeno a partir de soluções

Para o estudo de liberação de princípios ativos *in vitro* o método de diálise é o mais utilizado. As variações nesse método estão associadas ao meio para o qual a droga é liberada, podendo ser desde uma simples solução tampão até soluções mais complexas que possuem aminoácidos, vitaminas e diversos tipos de sais, como a RPMI 1640 ⁷⁹, as quais tentam simular as liberações *in vivo*. Também se costuma diminuir ou aumentar o pH dessas soluções simulando o ambiente gástrico ou intestinal respectivamente, os quais são responsáveis pela absorção da maioria dos princípios ativos.

Conforme descrito no item 4.1.4, para os testes de liberação *in vitro* foram realizados experimentos com os sistemas DPPG/IB e POPG/IB monitorando-se a alteração na intensidade de fluorescência para $\lambda = 288$ nm no decorrer do tempo. Não foram feitas medidas com DPPC porque não foi possível imobilizá-los em filmes e, como a intenção era comparar a liberação em solução e em filmes, não foram investigadas tais medidas.

Os resultados foram comparados com o perfil da liberação do fármaco livre, como mostram as Figuras 21 e 22. Observou-se um decréscimo na velocidade de liberação do

ibuprofeno ligado aos lipossomos em relação a do fármaco livre, indicando que o uso de lipossomos alterou a cinética de liberação do fármaco através da membrana de diálise.

Figura 21 – Espectros de emissão para solução de ibuprofeno livre (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C.

Figura 22 – Decréscimo da concentração de ibuprofeno livre dentro da membrana de diálise.

A concentração do ibuprofeno dentro da membrana de diálise seguiu um decaimento exponencial de primeira ordem segundo a Equação 1.

$$y = A_1 * e^{-x/t_1} + y_0 \quad (1)$$

onde A_1 é a amplitude e t_1 é o de tempo do decaimento.

A liberação do ibuprofeno puro teve um tempo de decaimento igual a $5,2 \pm 0,4$ h horas, ou seja, durante este tempo foram liberados 63,3% do fármaco através da membrana de diálise.

A encapsulação do ibuprofeno em lipossomos constituídos de DPPG (Figuras 23 e 24) reduziu significativamente a liberação em comparação com a liberação do fármaco livre. O tempo necessário para a liberação de 63,3% de ibuprofeno (lembrando-se que essa concentração refere-se ao fármaco livre mais o fármaco encapsulado em lipossomos de DPPG) foi de $9,2 \pm 0,6$ h, contrastando com as 5,2 horas de diálise para a liberação da mesma quantidade de fármaco livre.

Figura 23 – Espectros de emissão da solução DPPG-Ibuprofeno (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C.

Figura 24 – Decréscimo da concentração do ibuprofeno encapsulado em lipossomos constituídos de DPPG dentro da membrana de diálise.

As Figuras 25 e 26 apresentam os resultados encontrados para liberação do ibuprofeno a partir de lipossomos formados por POPG, onde o tempo de decaimento neste caso foi $8,5 \pm 1$ h, aparentemente menor do que a do DPPG, porém considerando o erro observa-se um tempo de decaimento semelhante ao do DPPG.

Figura 25 – Espectros de emissão da solução POPG-Ibuprofeno (0,1 mM) interna à membrana de diálise conforme liberação do ibuprofeno em tampão fosfato, pH 6,3 e 25 °C.

Figura 26 – Decréscimo da concentração de ibuprofeno encapsulado em lipossomos de POPG interno à membrana de diálise.

Estudos sobre a liberação controlada do ibuprofeno em lipossomos constituídos de fosfatidilcolina realizados por Paavola e colaboradores⁸⁰ obtiveram tempo de decaimento da concentração do fármaco livre de aproximadamente 2h, o qual aumentou para 5h após incorporação em lipossomos. A incorporação de ibuprofeno em dendrímeros PAMAM G3 e G4 também foi analisada por Kolhe e colaboradores⁷⁹. Para a liberação de ibuprofeno livre (concentração não informada) eles observaram um tempo de decaimento igual a 1 h aumentando para 3 horas após a incorporação do fármaco em PAMAM G4 e 4 horas em PAMAM G3.

4.3 Conclusões

Após a inclusão do ibuprofeno nos lipossomos observou-se um aumento na intensidade de fluorescência em 288nm mostrando que essas estruturas atuam como espaçadores, desativando o processo de transferência de energia entre as moléculas de

ibuprofeno. Quanto menor a perda de energia maior a probabilidade de o elétron decair de um estado excitado para o estado fundamental o que é refletido no aumento da intensidade de fluorescência.

O tamanho médio dos lipossomos de DPPC e DPPG observado por espalhamento dinâmico de luz diminuiu significativamente após a inclusão do ibuprofeno. Esse fato mostra a alteração na densidade de carga nas bicamadas dos lipossomos provocada pelo ibuprofeno levando a uma variação na força de hidratação e, conseqüentemente, a uma maior repulsão entre os lipossomos. Isso dificulta, ou até mesmo impede o processo de fusão, portanto a estabilidade desses sistemas é maior do que na ausência do fármaco. Por outro lado, o aumento no tamanho médio dos lipossomos de POPG após a incorporação do fármaco revelou a instabilidade desse sistema. A fusão entre os lipossomos é facilitada, ou seja, a alteração na densidade de carga sobre as bicamadas contribuiu para que as forças atrativas de van der Waals prevalecessem sobre a repulsão entre os lipossomos.

A liberação do ibuprofeno em soluções e incorporado a lipossomos obedece a uma cinética de primeira ordem, com tempo de decaimento consideravelmente maior para o fármaco incorporado. Este resultado é relevante para a liberação controlada. No que concerne ao efeito do lipídio empregado nos lipossomos, não houve diferença significativa para a liberação. Esses resultados estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Liberação de ibuprofeno a partir de lipossomos presentes em solução.

	<i>Constante de Decaimento (h)</i>
<i>Ibuprofeno livre</i>	5,2±0,4
<i>Ibuprofeno em lipossomos constituídos de DPPG</i>	9,2±0,6
<i>Ibuprofeno em lipossomos constituídos de POPG</i>	8±1

CAPÍTULO 5

5. Filmes automontados contendo lipossomos e ibuprofeno

Introdução

A habilidade em incorporar moléculas bioativas pela técnica LbL tem gerado considerável interesse na área de *drug delivery*. Têm sido exploradas estratégias no sentido de liberar moléculas carregadas e de baixa massa molecular aderidas no filme via interações eletrostáticas ou pela formação de ligações de hidrogênio. A aplicação dessas estratégias resulta em sistemas eficientes na entrega controlada⁹⁰. A modificação de superfícies com biomoléculas funcionais pelo método LbL pode ser alcançada com moléculas ativas (proteínas e enzimas⁹¹, DNA⁹², vírus⁹³), por polieletrólitos⁹⁴ e por moléculas ativas dentro de filmes pré-formados⁹⁵. Essas moléculas são liberadas a partir do filme a fim de interagirem com as células sendo que o controle da quantidade de substância aderida e sua liberação controlada a partir do bio-revestimento são de fundamental importância. A capacidade desses filmes em reter/liberarem quantidades suficientes de moléculas ativas tem sido assunto de interesse em nanotecnologia e desenvolvimento de biomateriais.

Poucos trabalhos reportam a liberação de fármacos a partir de filmes automontados⁹⁶ e, até o momento, muito pouco se tem estudado a respeito da liberação de determinadas substâncias (ferrocianeto e carboxifluoresceína) a partir de filmes LbL contendo lipossomos^{97, 98}. Especificamente para a liberação de fármacos a partir de lipossomos em filmes LbL, nenhum trabalho foi encontrado.

As características dos lipossomos permitem a encapsulação de partículas de vários tamanhos (íons, medicamentos, enzimas, proteínas, etc) com alta e baixa massa molecular as quais difundem através das bicamadas lipídicas. Além disso, a biocompatibilidade torna os lipossomos perfeitos reservatórios para encapsular diversos tipos de moléculas permitindo sua utilização em medicina e outras áreas.

O objetivo deste trabalho é o estudo de filmes LbL contendo lipossomos e o fármaco ibuprofeno seguido da liberação deste fármaco a partir dos filmes. Como será mostrado, foram obtidos resultados promissores para a liberação controlada de fármacos em forma de *patches*.

Neste capítulo, o item 5.1 descreve os procedimentos experimentais para a fabricação de filmes automontados, as técnicas empregadas para sua caracterização (espectroscopia de fluorescência, microbalança de cristal de quartzo e microscopia de força atômica) e o processo de liberação do ibuprofeno a partir dos filmes. O item 5.2 contém os resultados de caracterização dos filmes automontados (crescimento observado pela fluorescência do ibuprofeno no filme e pela massa depositada) e de liberação do fármaco (fluorescência do ibuprofeno liberado na solução e sua presença no filme antes e após sua liberação).

5.1 Procedimentos Experimentais

5.1.1 Limpeza dos substratos

As superfícies das lâminas de quartzo e vidro foram limpas utilizando-se o método de hidrofilição⁹⁹, baseado na oxidação e dissolução de impurezas orgânicas e contaminantes metálicos. Neste método os substratos são imersos em uma solução 1:1:5 (em volume) de hidróxido de amônio (NH₄OH) 28%, de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% e de água

ultrapura, respectivamente. Em seguida a solução é aquecida a 75 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 – 15 minutos, quando as lâminas são retiradas e lavadas com água ultrapura em abundância. Na segunda etapa da limpeza, uma solução 1:1:6 (em volume), respectivamente, de ácido clorídrico (HCl) 37%, de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de água ultrapura é aquecida até 75 °C, quando as lâminas são imersas e deixadas por 10 – 15 minutos. Por último as lâminas são lavadas com água ultrapura em abundância e secas com nitrogênio.

5.1.2 Preparação dos filmes automontados

Os filmes automontados foram compostos por camadas alternadas do dendrímero PAMAM (Figura 27) e vesículas contendo o fármaco ibuprofeno cuja concentração foi 2 mM. O substrato foi uma lâmina de quartzo que, após a hidrofilização, foi inicialmente imersa numa solução de PAMAM, pH 6.3, por 5 minutos de maneira que uma camada do PAMAM se adsorvesse na superfície do substrato. Logo após, o substrato foi lavado em solução tampão fosfato, pH 6.3, para retirar o excesso de moléculas PAMAM. Em seguida, o substrato foi imerso na solução de vesículas/ibuprofeno, por 10 minutos, promovendo adsorção dessas biomoléculas na camada previamente adsorvida (PAMAM). Este processo foi repetido até se obter o número de 10 bicamadas. O crescimento do filme foi acompanhado por espectroscopia de fluorescência.

Figura 27 – Representação esquemática do dendrímero PAMAM.

5.1.3 Crescimento dos filmes por espectroscopia de fluorescência

Para as medidas de fluorescência dos filmes utilizaram-se os mesmos parâmetros descritos no Capítulo IV, com um suporte para o substrato de modo que a superfície do filme formasse um ângulo de 45° com o feixe de luz incidente.

5.1.4 Crescimento dos filmes por Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

A técnica de microbalança de cristal de quartzo permite monitorar a variação de frequência de um cristal de quartzo quando uma massa é depositada sobre o mesmo. A QCM compreende basicamente um disco de cristal de quartzo piezoelétrico parcialmente recoberto em ambas as faces com um filme metálico fino. As faces deste cristal são conectadas a um circuito elétrico, onde se aplica um sinal de corrente alternada e que gera um campo elétrico causando a vibração do cristal em uma determinada frequência de ressonância, F^{100} . Como as medidas obtidas pela QCM se referem às variações de frequência e não de massa, utiliza-se a equação de Sauerbrey¹⁰¹ para obter uma relação massa/frequência:

$$\Delta F = \frac{-2\Delta m F^2}{A(\mu\rho)^{1/2}} \quad (2)$$

onde ΔF é a variação da frequência de ressonância, F , a frequência de ressonância fundamental do cristal, Δm , a variação de massa na superfície do eletrodo, μ , o módulo de cisalhamento do cristal, ρ , a densidade do cristal e A , a área geométrica do eletrodo.

Neste trabalho utilizou-se uma QCM 200 da SRS com cristal de quartzo corte AT, cuja frequência de ressonância fundamental é 5 MHz, revestido com ouro dos dois lados. Nesse caso a equação de Sauerbrey resume-se em:

$$\Delta F = - 56,6 \Delta m \quad (3)$$

Com a estabilização do cristal, injetou-se uma quantidade suficiente da solução PAMAM recobrindo toda superfície do cristal com o auxílio de uma micropipeta. Após 5 minutos essa solução foi retirada, a superfície foi lavada com tampão fosfato a fim de retirar

as moléculas não adsorvidas e aplicou-se a solução contendo lipossomos de DPPG a qual foi mantida durante 10 minutos. Em seguida retirou-se essa solução e a superfície foi novamente lavada com tampão fosfato obtendo-se assim a primeira bicamada do filme sobre a superfície do cristal. Seguiu-se esse processo até a formação de 10 bicamadas PAMAM/lipossomos a uma temperatura de 22 °C, pH 6,3 coletando-se os dados da variação de frequência em um software apropriado. Semelhantemente formou-se o filme PAMAM/lipossomos-ibuprofeno sobre outro cristal de quartzo.

5.1.5 Estudo da morfologia dos filmes por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Seguiu-se o procedimento utilizado nos filmes LbL para o preparo de amostras com 7 bicamadas de PAMAM/DPPG-Ibuprofeno, mas neste caso a concentração de ibuprofeno foi 0,1 mM. As medidas de AFM foram feitas em um equipamento da Digital Instruments, modelo Multimode Nanoscope 3 a, no modo de operação contacto intermitente (tapping mode) à temperatura de 23 °C. A frequência de oscilação da ponta foi de 300.000 Hz e a constante de mola do cantilever igual a 70 N/m.

5.1.6 Liberação do ibuprofeno a partir dos filmes automontados

A liberação do ibuprofeno foi investigada a partir do filme PAMAM/Vesícula-Ibuprofeno. O substrato contendo o filme foi imerso em um béquer contendo 3 mL de solução tampão fosfato 20 mM, pH 6,3 à temperatura de 24° C, sob agitação, acompanhando-se a concentração de ibuprofeno liberado na solução por espectroscopia de fluorescência, $\lambda_{\text{EXC}} = 224 \text{ nm}$ e , a cada 1 hora.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Crescimento dos filmes automontados por espectroscopia de fluorescência

O método mais empregado para estudar crescimento de filmes automontados é a espectroscopia de absorção no UV-VIS., pois a intensidade absorvida pode em geral ser tomada como proporcional à quantidade de material adsorvido. Se o coeficiente de extinção do material sendo depositado for conhecido, e não houver alterações no material durante a adsorção, pode-se inclusive calcular a massa adsorvida. Infelizmente, para os filmes automontados contendo lipossomos, as medidas de absorção não deram bons resultados devido ao alto grau de espalhamento. Isso fica claro na Figura 28, em que a linha de base é alterada com o número de camadas, com o crescente espalhamento para filmes mais espessos.

Resolvemos então empregar espectroscopia de fluorescência, uma vez que a intensidade em princípio poderia ser associada à presença de ibuprofeno. Neste ponto, é importante ressaltar que a fluorescência de um cromóforo é muito mais dependente do meio em que se encontra do que a absorção e, portanto os resultados de fluorescência poderão ter que ser confrontados com resultados de outras técnicas.

Figura 28 – Crescimento do filme PAMAM/DPPG-IB por UV-Vis.

A Figura 29 mostra os espectros de fluorescência para o crescimento do filme LbL cujas bicamadas são formadas por PAMAM e DPPG-Ibuprofeno (2 mM). Esse resultado mostra que a emissão teve um crescimento exponencial (Fig. 30) para a banda referente ao ibuprofeno com pequeno deslocamento (de 288 para 290 nm) e à vesícula formada pelo fosfolípido DPPG (364 nm), mostrando que foram imobilizados com sucesso no filme LbL.

Figura 29 – Espectros de emissão para o filme LbL com bicamadas de PAMAM e DPPG/Ibuprofeno.

Figura 30 – Crescimento do filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno por espectroscopia de fluorescência.

O crescimento do filme PAMAM/lipossomos de DPPG (Figura 31) mostra que a banda em 365 nm é referente à emissão dos fosfolipídios DPPG (veja Apêndice para a justificativa do aparecimento de fluorescência para o fosfolípido). A intensidade de emissão em 290 nm é praticamente constante após a adição das bicamadas contendo lipossomos de DPPG puros, mas cresce exponencialmente na presença do ibuprofeno (Fig. 29 e 30).

Figura 31 – Fluorescência para os filmes PAMAM/DPPG livres de ibuprofeno.

Os resultados para o filme com bicamadas de PAMAM e POPG-Ibuprofeno estão apresentados na Figura 32 em que a emissão do ibuprofeno teve um deslocamento considerável, de 288 para 295 nm. As bandas em 371 e 388 nm estão associadas ao POPG. O desdobramento na banda do POPG pode estar relacionado à sua maior suscetibilidade à oxidação por apresentar uma dupla ligação em sua cadeia hidrofóbica.

Figura 32 – Emissão para o filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno.

O filme formado por lipossomos de POPG-Ibuprofeno também apresentou crescimento exponencial na emissão do ibuprofeno após a deposição das bicamadas (Fig. 33).

Figura 33 – Crescimento do filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno por fluorescência.

Uma possibilidade para o crescimento exponencial dos filmes formados com DPPG-Ibuprofeno e POPG-Ibuprofeno poderia ser que a quantidade de ibuprofeno adsorvida aumenta consideravelmente com o número de camadas. Isso é improvável, porém. É mais provável que o aumento da intensidade esteja relacionado a um ambiente mais propício para a emissão, por exemplo, causado pela difusão da molécula de ibuprofeno, que possui baixa massa molecular, dentro do filme durante cada ciclo da deposição. Estudos realizados por Volodkin e colaboradores ⁹⁸ mostraram que o crescimento de filmes constituídos por carboxifluoresceína encapsulada em lipossomos e pelos polieletrólitos ácido hialurônico e poli-L-lisina de baixa massa molecular apresentaram um perfil exponencial. Eles também verificaram que o uso de poli-L-lisina com maior massa molecular restringe estericamente a difusão de polieletrólitos dentro do filme, exibindo um crescimento linear ¹⁰². De qualquer

forma, a hipótese de aumento da quantidade de material com o número de camadas será checada com medidas de massa adsorvida com uma balança de cristal de quartzo, cujos resultados são apresentados na próxima seção.

Ressalte-se que não foi possível construir filmes LbL a partir das vesículas formadas pelo DPPC, provavelmente porque se trata de um fosfolípido zwitteriônico, ou seja, não apresenta carga líquida total enquanto que o DPPG e POPG apresentam carga líquida negativa, proporcionando interações eletrostáticas necessárias para formação de filmes LbL.

5.2.2 Crescimento dos Filmes por Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

O objetivo de se estudar o crescimento dos filmes automontados por QCM foi observar a adesão e possível ruptura das vesículas sobre a superfície podendo ou não estar associada à influência do ibuprofeno neste processo. Nesse estudo foram construídas, *in situ*, 10 bicamadas de PAMAM e lipossomos de DPPG sobre o cristal de quartzo e um segundo filme, preparado da mesma forma, contendo camadas alternadas de PAMAM e lipossomos de DPPG com ibuprofeno.

A mudança de frequência da microbalança em resposta à adesão de 10 bicamadas PAMAM/lipossomos de DPPG com o tempo está ilustrada na Figura 34. Após a adsorção de PAMAM sobre a superfície do cristal, lipossomos de DPPG foram adicionados sobre a superfície formando a primeira bicamada. O ΔF_{abs} (deslocamento de frequência absoluto) é proporcional à massa de material adsorvido sobre o cristal.

Figura 34 – Deslocamento da frequência com o tempo mostrando a adsorção de PAMAM e de lipossomos constituídos de DPPG sobre o cristal de quartzo.

Utilizando-se a equação de Sauerbrey ($\Delta F = - 56,6 \Delta m$) obtém-se a variação de massa adsorvida após a deposição de cada bicamada sobre o cristal com relação ao tempo (Figura 35). A adsorção do material é heterogênea, ou seja, num mesmo intervalo de tempo, observam-se valores muito diferentes na massa adsorvida por cada bicamada de PAMAM/lipossomos.

Figura 35 - Massa adsorvida sobre o cristal durante a formação do filme PAMAM/lipossomos de DPPG.

Enquanto os dados de fluorescência revelam um crescimento exponencial para o crescimento do filme PAMAM/DPPG-IB, os dados de QCM mostram que, como já se esperava, a massa de material adsorvido não obedece tal função (Fig. 36).

Figura 36 – Acúmulo de massa de PAMAM/lipossomos de DPPG depositada sobre o cristal.

A diferença de massa adsorvida por cada bicamada também pode ser observada na Figura 37 em que se relaciona a variação de massa com o número de bicamadas depositadas.

Figura 37 – Massa adsorvida por cada bicamada de PAMAM/lipossomos depositada sobre o cristal de quartzo.

Essa irregularidade se deve a efeitos provocados por propriedades viscoelásticas dos lipossomos que, por se tratarem de estruturas substancialmente maiores e menos compactas, estão sujeitas a maiores deformações. Nota-se, por exemplo, que a quantidade de material adsorvido aumenta nas primeiras camadas – o que pode ser devido a efeito de substrato ou porque o filme está ficando mais rugoso. Entretanto, a partir da 5ª bicamada, a quantidade de material decresce e o filme quase pára de crescer com 10 bicamadas. Essa variação em longo prazo sugere algum rearranjo estrutural nas camadas e relaxação dos lipossomos após a adsorção.

Embora seja difícil definir todas as mudanças que estão ocorrendo, a adição de uma camada sobre lipossomos já aderidos provoca deformações de lipossomos previamente depositados, ou seja, camadas externas influenciam as internas e observa-se uma variação de

frequência diferenciada daquela obtida em camadas anteriores. Além de sentir a presença de uma nova camada, o cristal sente a deformação ou o “achatamento” das camadas já aderidas.

A ruptura de vesículas ocorre quando forças adesivas elevadas causam a tensão na membrana da cápsula esférica de uma vesícula adsorvida excedendo o limite para o rompimento da membrana. Esse processo depende da densidade de carga na superfície. Quanto maior essa densidade, maior será a energia de adesão o que leva ao rompimento da biomembrana. Depende também da rigidez, pois lipossomos com maior módulo de ligação, tais como DPPC e DPPG, são mais difíceis de romper pelas forças de adesão do que o POPG, por exemplo ¹⁰³. Faiss e seus colaboradores explicaram que o rompimento do lipossomo leva a um menor ΔF_{abs} , enquanto que vesículas intactas aumentam esse valor, ou seja, a massa adsorvida é maior quando as vesículas permanecem intactas ou menos deformadas ¹⁰⁴. Vesículas contendo lipídios no estado gel exibem maior módulo de ligação (DPPG) e resistem à deformação consideravelmente melhor do que vesículas com lipídios no estado líquido cristalino (POPG).

Para o rompimento dos lipossomos, os valores de ΔF_{abs} devem ser iguais ou menores que o Δf teórico para uma bicamada planar de fosfolipídio o qual é calculado a partir da equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = -S_f \frac{\Delta m}{A} \quad (4)$$

onde Δm é a massa adsorvida, A é a área do eletrodo de ouro (diâmetro = 5 mm) e S_f é a constante de Sauerbrey, que neste caso é $0,057 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$. A massa molar do DPPG é $744,96 \text{ g/mol}$ e a área superficial da cabeça hidrofílica de uma molécula deste fosfolipídio é $70 \text{ \AA}$ ¹⁰⁴. Considerando esses dados, cerca de $2,8 \times 10^{13}$ moléculas de DPPG podem ser aderidas sobre o eletrodo de ouro e, portanto, o Δf teórico que uma bicamada planar de DPPG

produz sobre o cristal é aproximadamente 20 Hz. O resultado teórico encontrado por Faiss foi de 23 Hz para uma bicamada de POPG/POPC aderida sobre o cristal de quartzo¹⁰⁴.

Os valores experimentais de ΔF_{abs} são maiores do que o teórico sugerindo que os lipossomos de DPPG permaneceram intactos durante sua adsorção, embora ora mais ora menos deformados. A partir da 6ª bicamada as interações eletrostáticas diminuem e a adesão tanto de PAMAM quanto de novos lipossomos é dificultada. Finalmente a massa adsorvida diminui e o filme praticamente pára de crescer. Portanto, fica claro que o crescimento exponencial da fluorescência apresentado na última seção se deve a um maior rendimento quântico da emissão do ibuprofeno, e não a uma maior quantidade de material adsorvido.

O mesmo efeito pode ser observado com a deposição do filme PAMAM/lipossomos-ibuprofeno (Figura 38) em que a massa adsorvida é mais intensa nas cinco primeiras bicamadas do filme quando as forças de adesão são maiores. A partir de então, observa-se um decréscimo na massa adsorvida até a saturação do filme.

Figura 38 – Variação da frequência com o tempo conforme a adsorção de bicamadas PAMAM/lipossomos-ibuprofeno.

As Figuras 39 e 40 mostram o acúmulo da massa de PAMAM/lipossomos-ibuprofeno adsorvida sobre o cristal, que é maior do que para os lipossomos livres, $65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o que era esperado devido à adição do fármaco.

Figura 39 - Massa adsorvida sobre o cristal durante a formação do filme PAMAM/lipossomos-ibuprofeno.

Figura 40 – Acúmulo de massa de PAMAM/DPPG-IB adsorvida sobre o cristal de quartzo.

O aumento de massa adsorvida para cada bicamada em relação à deposição de lipossomos livres também é observado. Esse valor é maior em todas as bicamadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Massa adsorvida em cada bicamada sobre o cristal de quartzo.

Bicamada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Massa de PAMAM/DPPG adsorvida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	1,74	2,72	4,07	5,95	8,25	7	5,37	2,78	1,11	1,66
Massa de PAMAM/DPPG-Ibuprofeno adsorvida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	3,13	3,62	7,16	10,36	12,82	9,25	8,64	6,41	3,85	1,86

5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de AFM dos filmes de PAMAM/DPPG e PAMAM/DPPG-Ibuprofeno estão apresentadas nas Figuras 41 e 42, respectivamente. Os resultados estão coerentes com os diâmetros encontrados por espalhamento de luz, em que se verificaram aglomerados maiores para lipossomos de DPPG livres (132nm) do que para lipossomos contendo ibuprofeno (63nm).

Figura 41 – AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/DPPG.

Figura 42 – AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/DPPG-Ibuprofeno.

O modo contato intermitente é conhecido por reduzir as forças de fricção que freqüentemente interferem nas imagens de amostras macias e, portanto foi usado neste estudo. Observou-se que o ibuprofeno alterou significativamente o estado de agregação e o processo de fusão entre as bicamadas fosfolipídicas dificultando que estas interagissem entre si. Além disso, as imagens de AFM mostram a formação de um filme bastante irregular com regiões de diferentes amplitudes evidenciando uma menor ruptura das membranas após a incorporação do ibuprofeno.

Os filmes formados de POPG apresentaram comportamento diferente. A Figura 43 apresenta a imagem de AFM para o filme de POPG livre do fármaco na qual se observam agregados menores e maior estabilidade das membranas quando comparado com a imagem dos filmes de POPG contendo ibuprofeno da Figura 44. Após a incorporação do fármaco, observa-se um rompimento praticamente total das membranas seguido de uma fusão intensa devido à instabilidade provocada pelo ibuprofeno. A imagem apresenta regiões com diferentes “degraus planares” resultantes da fusão e rompimento das membranas. Esse aumento no tamanho das partículas também está coerente com as medidas de DLS para lipossomos constituídos de POPG (110nm para o POPG e 160nm para o POPG-IB). Além disso, a imagem do filme contendo lipossomos constituídos de POPG mostra maior rompimento desses sistemas quando comparado com lipossomos de DPPG. Esse fato é devido à baixa temperatura de transição de fase do POPG ($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) quando comparada com a temperatura do DPPG ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Figura 43 – AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/POPG.

Figura 44 – AFM para o filme com 7 bicamadas de PAMAM/POPG-Ibuprofeno.

Um outro ponto a ser discutido é a altura dos filmes em que os maiores valores são para os filmes de lipossomos de DPPG e DPPG-Ibuprofeno (500 nm). Neste caso não há diferença entre esses dois sistemas. Observa-se maior integridade das vesículas de DPPG comparando com os valores da altura dos filmes formados por POPG (200 nm) e POPG-Ibuprofeno (80 nm). Nota-se uma diferença considerável para esse segundo sistema em que a presença do fármaco resulta em menor espessura do filme.

O decréscimo na espessura do filme de POPG-Ibuprofeno evidencia a instabilidade dos lipossomos provocada pelo fármaco o que leva ao rompimento de um número considerável de vesículas em bicamadas planares de fosfolipídios sobre o substrato. Esses resultados estão de acordo com os tamanhos encontrados para vesículas de POPG e POPG-Ibuprofeno nos experimentos de DLS, em que também se observa uma maior instabilidade dos lipossomos na presença de ibuprofeno (110nm para lipossomos livres do fármaco e 160nm para lipossomos com ibuprofeno).

5.2.4 Liberação do ibuprofeno a partir dos filmes automontados

Para investigar a liberação de ibuprofeno dos filmes automontados, inicialmente repetimos os procedimentos empregados para as soluções, ou seja, medíamos o espectro do filme logo após a deposição e depois em intervalos regulares com o filme imerso numa solução. Para os filmes de PAMAM/DPPG-ibuprofeno, os espectros são mostrados na Figura 45. Observa-se que o decréscimo na fluorescência não é monotônico com o tempo, provavelmente porque a quantidade de ibuprofeno liberada é pequena e as medidas eram realizadas em partes diferentes do filme. De qualquer forma, fica claro que o tempo para a liberação do ibuprofeno leva de 4 a 7 h, mas não é possível precisar quantitativamente a taxa de liberação.

Figura 45 – Fluorescência do filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno antes e após a liberação do ibuprofeno.

Diante das dificuldades apontadas nas medidas com os filmes, decidimos estudar a cinética de liberação com medidas da fluorescência da própria solução em contacto com o filme. Assim, a fluorescência inicial era nula, antes da liberação, e deveria aumentar com o tempo de contacto. De fato, os espectros de emissão do ibuprofeno da solução, liberado de um filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno, têm intensidade crescente com o tempo, como mostra a Figura 46. Nota-se também pela banda de emissão em 365 nm que as vesículas DPPG não foram liberadas do filme.

Figura 46 – Fluorescência da solução em contacto com o filme PAMAM/DPPG-ibuprofeno durante a liberação do ibuprofeno.

Como são apenas 3 pontos, é difícil identificar o mecanismo de liberação, mas se supusermos uma cinética de primeira ordem, obtém-se um tempo de decaimento de 0,46 h, como ilustrado na Figura 47. De fato, da Figura 46 observa-se que boa parte do ibuprofeno a ser liberado já o foi após uma hora. Este resultado é contraditório à expectativa a partir dos dados com os filmes da Figura 45 de que várias horas seriam necessárias.

Caso a cinética de liberação de ibuprofeno dos filmes seja de fato mais rápida, com tempo de decaimento de menos de uma hora em comparação com 9,2 h para lipossomos de DPPG dispersos em solução (cap. IV), uma possível explicação é que apenas o ibuprofeno das camadas mais externas seja liberado de forma espontânea. É necessário estudar uma forma de provocar a liberação do fármaco, alterando-se o pH do meio, por exemplo. Este é um ponto que ficou em aberto e novos experimentos precisarão ser realizados para dirimir a dúvida.

Figura 47 – Cinética da liberação do ibuprofeno a partir de lipossomos de DPPG imobilizados em filmes LbL.

É relevante também que a quantidade de fármaco liberada é bastante pequena. Observando-se a curva padrão do ibuprofeno da Figura 48, infere-se que a quantidade do fármaco liberado a partir do filme PAMAM/DPPG-Ibuprofeno foi aproximadamente 0,03 mM, o que corresponde a 1,5% da solução inicial (2 mM), ou seja, aquela utilizada para o preparo dos filmes. Isso pode ser bastante importante para aplicações práticas, porque aparentemente uma quantidade de ibuprofeno não foi liberada nos intervalos de tempos dos experimentos. Acrescente-se que em alguns ensaios, não foi possível observar liberação de ibuprofeno dos filmes. Este também é um tópico para futura investigação.

Figura 48 – Curva padrão para o ibuprofeno tampão fosfato pH 6,3.

Alguns trabalhos sobre liberação de substâncias em filmes de multicamadas de lipossomos também mostraram liberação espontânea de moléculas. Michel e colaboradores mostraram, por experimentos de eletroquímica, que ferrocianeto, inicialmente encapsulado em vesículas, foi espontaneamente liberado a partir de filmes LbL em cerca de 10 h ⁹⁷. Estudos realizados por Volodkin e colaboradores também mostram a liberação de carboxifluoresceína encapsulada em lipossomos de DPPG/DPPC imobilizados em filmes LbL ⁹⁸. Eles observaram que 75% das moléculas inicialmente encapsuladas são liberados em 30 minutos.

O resultado da liberação do ibuprofeno a partir dos filmes PAMAM/POPG-Ibuprofeno encontra-se na Figura 49, primeiramente com os espectros para o filme a diferentes tempos de contacto com uma solução. Observa-se ligeiro decréscimo na intensidade tanto na banda atribuída ao ibuprofeno quanto na banda devida aos lipossomos. Obviamente que a quantidade de ibuprofeno liberada foi pequena, sendo difícil de quantificar, principalmente porque o decréscimo na intensidade não foi monotônico com o tempo.

Figura 49 – Fluorescência do filme PAMAM/POPG-Ibuprofeno durante a liberação do fármaco.

De maneira similar ao que foi feito para o DPPG, obtivemos medidas na solução em contacto com o filme de PAMAM/POPG-ibuprofeno, cujos espectros são mostrados na Figura 50. Neste caso houve uma banda extensa em 330 nm, que pode estar associada à liberação conjunta do ibuprofeno e vesículas de POPG. Isso ocorre devido à baixa temperatura de transição de fase do POPG o que facilita sua desestabilização. A interferência da temperatura de transição de fase do fosfolipídio na liberação de carboxifluoresceína também foi analisada por Volodkin e seus colaboradores. Eles observaram que a liberação é mais rápida e completa quando a temperatura de transição de fase do fosfolipídio é menor do que a temperatura na qual a liberação é realizada.

Figura 50 – Fluorescência para liberação do ibuprofeno a partir de filmes de PAMAM/POPG-ibuprofeno.

A presença da banda referente ao POPG dificulta a quantificação do fármaco liberado a partir desse filme, de maneira que não é possível nem mesmo especular sobre a cinética de liberação. Como a quantidade liberada também é pequena, em trabalhos futuros deve-se tentar alternativas para facilitar a liberação.

5.3 Conclusões

Lipossomos de DPPG e POPG contendo o fármaco ibuprofeno foram imobilizados em filmes automontados com o dendrímero PAMAM. Observou-se um crescimento exponencial por espectroscopia de fluorescência em 290nm para o ibuprofeno encapsulado em DPPG e em 295nm, em POPG, que não pode ser atribuído a um grande aumento na quantidade de ibuprofeno adsorvido. Ao contrário, com as medidas de microbalança de cristal de quartzo, mostrou-se que a adsorção praticamente pára após a deposição de 10 bicamadas. Conclui-se que o aumento do número de camadas permite uma localização do ibuprofeno, que induz

aumento de seu rendimento quântico de emissão. Não foi possível a imobilização de lipossomos constituídos de DPPC em filmes automontados devido à ausência de carga líquida deste fosfolípido.

Verificou-se a adesão de lipossomos de DPPG contendo ou não o ibuprofeno por microbalança de cristal de quartzo (QCM). A massa adsorvida com 10 bicamadas do sistema PAMAM/DPPG foi igual a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aumentando para $65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ com o mesmo número de bicamadas para o sistema PAMAM/DPPG-Ibuprofeno. Não se observou ruptura dos lipossomos de DPPG após sua adesão no cristal de quartzo, porém notou-se grande deformabilidade desses sistemas com alterações na massa adsorvida por cada bicamada depositada. Verificou-se que até a 5ª bicamada a massa adsorvida foi crescente e, a partir da 6ª bicamada a adsorção de massa por cada bicamada depositada foi diminuindo até a saturação do filme.

As medidas de AFM mostraram que o filme PAMAM/DPPG apresenta maior número de agregados do que o sistema PAMAM/DPPG-Ibuprofeno. Neste caso, lipossomos de DPPG foram mais estáveis na presença do fármaco. Por outro lado, os filmes contendo POPG se tornaram menos estáveis após a inclusão do ibuprofeno apresentando rompimento e formação de bicamadas lipídicas planares sobre o substrato.

Os dados de liberação do ibuprofeno a partir de filmes PAMAM/DPPG-Ibuprofeno foram um tanto contraditórios. As medidas de decréscimo na fluorescência do filme mostram que a liberação deveria levar várias horas, porém as medidas de fluorescência da solução receptora indicaram que boa parte do ibuprofeno é liberada em apenas 1h, e supondo-se uma cinética de primeira ordem obteve-se um tempo de decaimento de 0,46 h. Notou-se também que a quantidade de ibuprofeno liberado é pequena (0,03mM), ou seja, boa parte do fármaco não foi liberada em intervalos de tempo e condições experimentais.

Observou-se a liberação do fármaco a partir do sistema contendo POPG, porém sua quantificação por fluorescência foi dificultada, pois além do fármaco, também foram liberados lipossomos de POPG cuja banda de emissão coincide com a do ibuprofeno (Apêndice).

Esses resultados contribuem para obtenção de membranas adsorvidas em substratos sólidos como sistemas para a liberação de princípios ativos ou até mesmo como sistemas de revestimento de materiais para implante em bioengenharia.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho mostrou a eficiência da técnica de automontagem por adsorção física para obtenção de biomembranas suportadas para a liberação do ibuprofeno. Foram preparados lipossomos de DPPC, DPPG e POPG nos quais se incorporou o fármaco. Esses sistemas foram caracterizados por DLS em que se verificou um diâmetro médio de 132 nm para o DPPG, 140 nm para o DPPC e 110 nm para o POPG. Na presença do ibuprofeno, lipossomos de DPPG e DPPC tornaram-se mais estáveis com tamanhos médios de 63nm e 74nm, respectivamente. Por outro lado, os lipossomos de POPG ficaram mais instáveis na presença do fármaco, com diâmetro médio de 160 nm. Essa estabilidade/instabilidade dos lipossomos está associada à alteração na densidade de carga nas bicamadas provocada pelo ibuprofeno levando a uma variação na força de hidratação e, conseqüentemente, a uma maior repulsão/atração entre as vesículas. Os dados de fluorescência mostraram que após a inclusão do ibuprofeno nos lipossomos a intensidade em 288nm aumentou. Aqui, o processo de transferência de energia entre as moléculas de ibuprofeno diminuiu na presença das vesículas.

Os testes de liberação *in vitro*, através do método de diálise, revelaram que o tempo de decaimento para a liberação do ibuprofeno aumentou significativamente após sua incorporação em lipossomos. A cinética de liberação do ibuprofeno puro apresentou um tempo de decaimento igual a 5,2h, enquanto que a partir de DPPG o tempo foi de 9,2h. Em lipossomos de POPG o tempo de decaimento da concentração do ibuprofeno foi de 8,5h.

Não foi possível acompanhar o crescimento dos filmes automontados por medidas de absorção óptica, principalmente por causa do espalhamento. Ao utilizar espectroscopia de fluorescência, verificamos que a intensidade de emissão do ibuprofeno aumentava exponencialmente com o número de camadas depositadas. Isto poderia indicar um grande aumento na quantidade de ibuprofeno depositado por camada à medida que o filme ficava mais espesso. Entretanto, com medidas de massa adsorvida através de uma microbalança de cristal de quartzo, verificamos que a adsorção se torna na verdade menos eficiente com o número de camadas. Portanto, o aumento na intensidade de emissão deve ser creditado a um aumento considerável na eficiência quântica de emissão do ibuprofeno para filmes mais espessos.

No que concerne à massa adsorvida, os experimentos de QCM mostraram uma adsorção de $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 10 bicamadas do sistema PAMAM/DPPG e $65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o mesmo sistema contendo ibuprofeno. Aqui se observou o comportamento de adesão diferenciado dos lipossomos durante sua adsorção sobre o cristal de quartzo, devido às propriedades de deformação das vesículas. As imagens de AFM revelaram a estabilidade de lipossomos de DPPG na presença do ibuprofeno, mas a instabilidade e ruptura do POPG após a incorporação do fármaco, com a formação de bicamadas planares sobre o substrato. Isso é consistente com os resultados obtidos das medidas de espalhamento de luz.

Verificou-se a liberação espontânea do fármaco a partir dos filmes contendo lipossomos de DPPG, a qual aparentemente seguiu uma cinética de primeira ordem. A constante de decaimento neste caso foi igual a 0,46 h e a concentração liberada foi muito pequena (0,03mM). Medidas de fluorescência revelaram que os lipossomos de DPPG não foram liberados enquanto que lipossomos constituídos de POPG foram liberados a partir dos filmes LbL, devido a sua baixa temperatura de transição de fase. Por esse motivo não foi

possível quantificar a concentração do ibuprofeno liberado a partir de lipossomos de POPG imobilizados em filmes LbL.

As perspectivas para o futuro são o estudo da liberação do ibuprofeno alterando-se alguns parâmetros como pH e temperatura da solução receptora, a fim de se verificar possível alteração na quantidade de fármaco liberado. Isso será particularmente importante para os filmes automontados, uma vez que aparentemente só uma pequena quantidade de ibuprofeno era liberada. Se por um lado isso representa uma limitação, por outro é uma oportunidade de controle de liberação em tempos bastante longos, desde que otimizadas as condições de fabricação. Esta possibilidade de liberação em tempos muito longos obviamente é interessante para aplicações médicas. Pretende-se estudar também a interação deste fármaco com modelos de membrana utilizando-se as técnicas de Langmuir e Langmuir-Blodgett e verificar uma possível liberação do ibuprofeno a partir de filmes LB.

REFERÊNCIAS

-
1. SHULTZ, L.; ZIMMERMAN, S. Dendrimers: potential drugs and drug delivery agents. *Pharmaceutical. News*, n.6, p. 25–29, 1999.
 2. LANGER, R. Drug delivery and targeting, *Nature*, S392, p. 5–10, 1998.
 3. SCHWARTZ, R. S. Paul Ehrlich's magic bullets (Perspective). *The New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 11, p 1079-1080, 2004.
 4. BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.
 5. SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, v. 9, p. 310-318, 1968.
 6. STOECKENIUS, W. An electron microscope study of myelin figures. *The Journal of Cell Biology*, v. 5, p. 491-500, 1959.
 7. SESSA, G.; WEISSMANN, G. Incorporation of lysosyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 245, n. 13, p. 3295-3301, 1970.
 8. GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B.E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters*, v. 14, n. 2, p. 95-99, 1971.
 9. MANCONI, M.. et al. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 234, n. 1-2, p. 237–248, 2002.
 10. HANES, J. et al. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection. *Biomaterials*, v. 23, n. 22, p. 4425–4433, 2002.

-
11. DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v. 210/211, n. 1-2, p. 831-835, 1992.
 12. WOOD, K. C. et al. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films, *Langmuir*, v. 21, n. 4, p. 1603-1609, 2005.
 13. GUZMAN, L. et al. Vapour deposited Zn–Cr Alloy coatings for enhanced manufacturing and corrosion resistance of steel sheets. *Surface & Coatings Technology*, v. 125, n. 1-3, p. 218-222, 2000.
 14. INBERG, A. et al. Electroless-deposited Ag-W films for microelectronics applications. *Thin Solid Films*, v. 389, n. 1-2, p. 213-218, 2001.
 15. CHENG, Z.; TEOH, S. Surface modification of ultra thin poly (ϵ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials*, v. 25, n. 11, p. 1991-2001, 2004.
 16. ASSIS, O. B. G.; HOTCHKISS, J. H. Surface hydrophobic modification of chitosan thin-films by HMDS plasma deposition: effects on water vapor, CO₂ and O₂ permeabilities. *Packaging Technology and Science*, v. 20, p. p, 2007.
 17. LVOV, Y. et al. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemistry Society*, v. 117, n. 22, p. 6117-6123, 1995.
 18. KUNITAKE, T. et al. Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 51, n. 2, p. 163-167, 1996.
 19. LANG, J.; LIU, M. Layer-by-layer assembly of DNA films and their interactions with dyes. *Journal of the Physical Chemistry B*, v. 103, n. 51, p. 11393-11397, 1999.
 20. LVOV, Y. et al. Successive deposition of alternate layers of polyelectrolytes and a charged virus. *Langmuir*, v. 10, n. 11, p. 4232-4236, 1994.
 21. ETIENNE, O. et al. Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 3662–3669, 2004.

-
22. DRUMMOND, D.C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological Reviews*, v. 51, p. 691-743, 1999.
 23. LANGNER, M.; UGORSKI, M. The macromolecular aggregate as drug carrier. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 5, p. 433-440, 2000.
 24. TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, 2005.
 25. FORTE, T. M. et al. Synthetic nano-low density lipoprotein as targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 328, n. 1, 2, p. 86-94, 2007.
 26. LANGER, R. et al. Microparticulate formulations for the controlled release of interleukin-2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, n. 5, p. 1100-1109, 2004.
 27. RENSEN, P. C. N. et al. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, n. 2-3, p. 251-276, 2001.
 28. PIAO, M. G. et al. Enhanced oral bioavailability of piroxicam in rats by hyaluronate microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 33, n. 4, p. 485 – 491, 2007.
 29. ROKHADE, A. P. et al. Rokhade semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate Polymers*, v. 65, n. 3, p. 243-252, 2006.
 30. GROETTRUP, M. et al. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine*, v. 24, n. 11, p. 1847-1857, 2006.
 31. DHANARAJU, M. D. et al. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 268, n. 1-2, p. 23-29, 2003.
 32. VALLÉE, J. N. et al. In vitro study of the compatibility of tris-acryl gelatin microspheres with various chemotherapeutic agents. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 14, n. 5, p. 621-628, 2003.

-
33. BANGHAM, A. D.; STANDISH, H. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.
34. SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, v. 9, p. 310-318, 1968.
35. GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *New England Journal of Medicine*, v. 295, p. 704-710, 1976.
36. GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *New England Journal of Medicine*, v. 295, p. 765-770, 1976.
37. LASIC, D. D.; PAPAHAJOPOULOS, D. Liposomes revisited. *Science*, v. 267, p. 1275-1276, 1995.
38. LAIDY, C. et al. Ripples and the formation of anisotropic lipid domains: imaging two-component supported double bilayers by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 5, p. 2625-2633, 2002.
39. EICHHORN, M. E. et al. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels of solid tumours. *Angiogenesis*, v. 7, n. 2, p. 133-141, 2004.
40. LINKE, G. T.; LIPOWSKY, R.; GRUHN, T. Free fluid vesicles are not exactly spherical. *Physical Review E*, v. 71, n. 5, p. 051602-1/051602-7, 2005.
41. LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.
42. LASIC, D. D.; NEEDHAM, D.; The "stealth" liposome: a prototypical biomaterial. *Chemical Reviews*, v. 95, n. 8, p. 2601-2628, 1995.
43. GORDON, L. A. et al. A theoretical basis for biopharmaceutical drug classification: The correlation of "in vitro" drug product dissolution and "in vivo" bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

-
44. BLODGETT, K. B. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of the American Chemical Society*, v. 57, n. 6, p. 1007-1022, 1935.
45. DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v. 210/211, Parte 2, p. 831-835, 1992.
46. OLIVEIRA JR., O. N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
47. SAGIV, J.; NETZER, L. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 3, p. 674-676, 1983.
48. SAGIV, J.; NETZER, L.; ISCOVIC, R. Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers—Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. *Thin Solid Films*, v. 99, n. 1-3, p. 235-241, 1983.
49. LVOV, Y. et al. Assembly of Polyelectrolyte Molecular Films onto Plasma-Treated Glass. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 97, n. 49, p. 12835-12841, 1993.
50. DECHER, G.; LVOV, Y.; MÖHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir*, v. 9, n. 2, p. 481-486, 1993.
51. ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.
52. ARIGA, K.; LVOV, Y. KUNITAKE, T. Assembling alternate dye-polyion molecular films by electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 9, p. 2224-2231, 1997.
53. HE, J.A. et al. Oriented bacteriorhodopsin/polycation multilayers by electrostatic layer-by-layer assembly. *Langmuir*, v. 14, p. 1674-1679, n. 7, 1998.
54. LVOV, Y. et al. Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A and glycogen. *Thin Solid Films*, v. 284, p. 797-801, 1996.

-
55. ONDA, M. et al. Molecularly flat films of linear polyions and proteins obtained by the alternate adsorption method. *Japanese Journal of Applied Physics* 2, v.36, n. 12A, L1608-L1611, 1997.
56. LVOV, Y. et al. Formation of ultrathin multilayer and hydrated gel from montmorillonite and linear polycations. *Langmuir*, v. 12, n. 12, p. 3038-3044, 1996.
57. LVOV, Y. et al. Alternate assembly of ordered multilayers of SiO_2 and other nanoparticles and polyions. *Langmuir*, v. 13, n. 23, p. 6195-6203, 1997.
58. OLIVEIRA JR, O. N. et al. *Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications*, Los Angeles CA: American Scientific Publishers, 2002. v. 1, cap. 1, p. 1-37.
59. ZUCOLOTTO, V. et al. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2004. v. 10, cap.1. p. 1-25.
60. HOOGEVEEN, N. G.; STUART, M. A. C.; FLEER, G. J. Formation and stability of multilayers of polyelectrolyte. *Langmuir*, v. 12, n. 15, p. 3675-3681, 1996.
61. LÖSCHE, M. R. et al. Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry. *Macromolecules*, v. 31, n. 25, p. 8893-8906, 1998.
62. PARK, S. Y. et al. Anomalous adsorption of polyelectrolyte layers. *Macromolecules*, v. 34, n. 10, p. 3384-3388, 2001.
63. ZUCOLOTTO, V. et al. Molecular engineering strategies to control photo-induced birefringence and surface-relief gratings on layer-by-layer films from an azopolymer. *Thin Solid Films*, v.453-454, p.110-113, 2004.
64. STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Electrically conducting compatible blends of polyaniline/poly(vinyl pyrrolidone). *Materials Research Society Symposium Proceedings*, v. 328, p. 257-262, 1994.

-
65. STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Molecular-level processing of conjugated polymers. 4. layer-by-layer manipulation of polyaniline via hydrogen-bonding interactions. *Macromolecules*, v.30, n. 9, p. 2717-2725, 1997.
 66. ANZAI, J. et al. Layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s. *Langmuir*, v.15, n. 1, p. 221-226, 1999.
 67. SHIMAZAKI, Y. et al. Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charge-transfer interaction. *Langmuir*, v. 13, n. 6, p. 1385-1387, 1997.
 68. LVOV, Y. et al. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 22, p. 6117-6123, 1995.
 69. MOTESHAREI, K.; GHADIRI, M. R. Diffusion-limited size-selective ion sensing based on sam-supported peptide nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 42, p. 11306-11312, 1997.
 70. BOWER, C. K. et al. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, v. 25, p. 81-90, 2002.
 71. HAMMOND, P. T. et al. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. *Langmuir*, v. 21, p. 1603-1609, 2005.
 72. RUBNER, M. F.; et al; Controlled Drug release from porous polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, v. 7 , n. 1, p. 357 -364, 2006.
 73. FERREIRA , M. et al. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the layer-by-layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, n. 12, p. 1611-1615, 2004.
 74. YAMADA, M.; SHIRATORI, S. S. Smoke sensor using mass controlled layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes films. *Sensors and Actuators B*, v. 64, n. 1-3, p. 124-127, 2000.
 75. OLIVEIRA JR., O. N. et al. Nanostructured films employed in sensors. In: RAM, M. K. *Supramolecular Engineering of Conducting Materials*. Kerala: Research Signpost, 2005. p 399-425.

76. MOTRIN. Bulapfizer. Disponível em: <http://backoffice.pfizer.com.br/Bula_Pfizer/Motrin.pdf> Acesso em 12 JAN. 2008.

77. SMALLEY, W.E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of hospitalizations for peptic ulcer disease in elderly persons. *American Journal of Epidemiology*, v. 141, p. 539–545, 1995.
78. HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*, v. 119, p.521–535, 2000.
79. KOLHE, P. et al. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 259, p. 143-160, 2003.
80. PAAVOLA, A. et al. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, p. 85-93, 2000.
81. LIMA, E. M.; OLIVEIRA, A. G. Tissue tolerance of diclofenac sodium encapsulated in liposomes after intramuscular administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.28, n.6, p.673-680, 2002.
82. SADECKA, J. et al. Determination of ibuprofen and naproxen in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, p. 881–891, 2001.
83. MANZOORI, J. L.; AMJADI, M. Spectrofluorimetric study of host-guest complexation of ibuprofen with β -cyclodextrin and its analytical application. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 59, p. 909-916, 2003.
84. SCHUTZE, M.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading. *Pharmaceutical Research*, v.15, n. 4, p. 538-543, 1998.
85. BIONITY.COM. Disponível em: <http://bionity.com>. Acesso em: 11 JAN. 2008.
86. DERJAGUIN, B.V.; LANDAU, L.D. *Acta Physicochim. URSS* 14, 633 (1941).
87. VERWEY, E. J. B.; OVERBECK, J. Th. G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloid*. Amsterdam: Elsevier, 1948.

-
88. SABÍN, J. et al. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *The European Physical Journal E*, v. 20, p. 401-408, 2006.
89. ŠEGOTA, S.; TEŽAK, D. Spontaneous formation of vesicles. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 121, p. 51-75, 2006.
90. VAZQUEZ, E. Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes. *Journal of the American Chemistry Society*, v. 124, n. 47, p. 13992-12993, 2002.
91. JESSEL, N. et al. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins, *Advanced Materials*, v. 15, n. 9, p. 692–695, 2003.
92. JEWELL, C. M. et al. Multilayered polyelectrolyte films promote the direct and localized delivery of DNA to cells, *Journal of Controlled Release*, v.106, n. 1-2, p. 214-223, 2005.
93. DIMITROVA, M. et al. Adenoviral gene delivery from multilayered polyelectrolyte architectures, *Advanced Functional Materials*, v. 17, n.2, p. 233–245, 2007.
94. THIERRY, B. et al. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers, *Journal of the American Chemistry Society*, v. 127, n.6, p. 1626–1627, 2005.
95. VODOUHÊ, C. et al. Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials*, v. 27, n. 22, p. 4149–4156, 2006.
96. WOOD, K. C. et al. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films, *Langmuir*, v. 21, p. 1603-1609, 2005.
97. MICHEL, M. et al. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles obtained by spraying: integrity of the vesicles, *Langmuir*, v. 21, p. 7854-7859, 2005.
98. VOLODKIN, D. et al. Composite multilayered biocompatible polyelectrolyte films with intact liposomes: stability and temperature triggered dye release, *Soft Matter*, v.4, p. 122-130, 2008.

-
99. KERN, W. Purifying Si and SiO₂ surfaces with hydrogen peroxide, *Semiconductor International*, April, p. 94 – 99, 1984.
100. O' SULLIVAN, C. K., GUILBAULT, G. G. Commercial quartz crystal microbalance – theory and applications. *Biosensors & Bioelectronics*. v.44, p. 663-670, 1999.
101. BUTTRY, D. A. *A series of advances* In: BARD, A. J. *Electroanalytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker. 1990. p. 23.
102. DECHER, G. et al. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime, *Langmuir*, v. 23, n. 4, p. 1898–1904, 2007.
103. FRISKEN, B. J., ASMAN, C., PATTY, P. J. Studies of vesicle extrusion. *Langmuir*, v. 16, n.3, p. 928-933, 2000.
104. FAISS, S., LÜTHGENS, E., JANSHOFF, A. Adhesion and rupture of liposomes mediated by electrostatic interaction monitored by thickness shear mode resonators, *Biophysics Letter*, 33, 555-561, 2004.

APÊNDICE

A dúvida sobre a fluorescência exibida pelos lipossomos livres do fármaco levou a um estudo mais detalhado sobre a fluorescência dos fosfolipídios e solventes utilizados. Os lipossomos foram preparados na própria cubeta de quartzo e as medidas de fluorescência foram realizadas após cada etapa do preparo com os mesmos parâmetros empregados para a obtenção dos resultados do Capítulo IV ($\lambda_{\text{EXC}} = 224\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 288\text{nm}$ e fenda de 3nm).

A Figura A.1 apresenta a fluorescência para os solventes utilizados. Observou-se pequena emissão para o metanol, porém na mistura clorofórmio/metanol essa emissão não foi evidente, lembrando que se utilizou essa mistura e não o metanol puro no preparo dos lipossomos.

Figura A.1 – Fluorescência dos solventes utilizados no preparo dos lipossomos.

Em seguida, dissolveu-se o fosfolipídio DPPG (1 mM) em clorofórmio/metanol (2:1) e mediu-se a fluorescência (Figura A.2). Neste caso também não houve emissão. Após a eliminação do solvente orgânico com fluxo de N_2 e vácuo, ou seja, com a formação dos filmes de fosfolipídios secos observam-se três bandas de emissão, uma delas bastante intensa em 365

nm. Essas bandas permanecem após a formação dos lipossomos em tampão fosfato (Figura A.2), com um aumento considerável na intensidade de emissão em 298 nm e uma forte diminuição de intensidade em 365nm.

Figura A.2 – Fluorescência durante o preparo dos lipossomos.

Esses resultados se repetem utilizando-se também os fosfolipídios de DPPC e POPG. Conclui-se, portanto, que por se tratar de uma região de baixo comprimento de onda, a emissão pode estar relacionada ao espalhamento causado pela formação da bicamada de fosfolipídios.