

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo *in vitro* do efeito da ativação do Sistema Complemento na estabilidade de lipossomas de diferentes composições: seleção do melhor sistema de liberação e sua avaliação como carreador de flavonoides

Taís Nader Chrysostomo

Ribeirão Preto

2011

RESUMO

CHRYSOSTOMO, T. N. **Estudo *in vitro* do efeito da ativação do Sistema Complemento na estabilidade de lipossomas de diferentes composições: seleção do melhor sistema de liberação e sua avaliação como carreador de flavonoides.** 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Lipossomas (LUV) são estruturas compostas por uma bicamada lipídica que se organizam de forma semelhante a vesículas, contendo um compartimento aquoso em seu interior. Têm sido avaliados como potenciais carreadores de fármacos. No entanto, após sua administração, *in vivo*, opsoninas do soro adsorvem-se em sua superfície contribuindo para que o sistema fagocitário mononuclear (SFM) reconheça essas partículas, favorecendo sua remoção da circulação. O sistema complemento (SC) parece ter papel importante neste processo, principalmente por gerar fragmentos ativos do componente C3 (C3b/iC3b) que se depositam nas vesículas lipossomais e são reconhecidos por receptores do complemento presentes, por exemplo, nos polimorfonucleares. Antioxidantes, como a quercetina, têm demonstrado importantes e benéficos efeitos sobre a saúde humana, porém sua baixa solubilidade em água e biodisponibilidade limitam seu uso. Assim, o desenvolvimento apropriado de carreadores de flavonoides seria de grande importância para sua aplicabilidade *in vivo*. O objetivo do presente trabalho é avaliar a ativação das proteínas do SC por lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e colesterol (PC:CHOL) ou colesteril-etil-éter (PC:CHOL-OET), contendo ou não quercetina. O consumo das vias clássica (VC) e alternativa (VA) provocado pelas diferentes vesículas foi analisado por ensaio hemolítico e a quantificação de iC3b e anticorpos naturais (IgG e IgM) na superfície dessas partículas foi realizada através de kits de ELISA. A ativação de C3 por vesículas contendo ou não quercetina foi avaliada por imunoeletoforese bidimensional (IEF). Os resultados mostram que lipossomas vazios, compostos por grande quantidade de colesterol, consomem mais os componentes do complemento para ambas as vias, VC e VA. Ainda, a substituição de colesterol por colesteril-etil éter reduziu o consumo das duas vias, mas a ativação do SC ainda é dependente da quantidade deste composto. A incorporação de quercetina não alterou o consumo de ambas as vias. O depósito de iC3b, IgG ou IgM nas vesículas compostas de PC:CHOL-OET na proporção de massa 3:1 foi o menor comparado aos demais. A IEF mostrou que vesículas PC:CHOL vazias induzem maior clivagem de C3 em relação às vesículas PC:CHOL-OET. Ainda, a incorporação de quercetina reduz a conversão de C3 em seus fragmentos. Essas observações sugerem que a preparação lipossomal PC:CHOL-OET em proporção de massa 3:1 parece ser a mais adequada para dar continuidade aos estudos que deverão culminar na tentativa de utilizá-la como carreadora de quercetina para administração *in vivo*.

Palavras-chaves: Lipossomas, Sistema Complemento, Flavonoides, Carreadores de fármacos

ABSTRACT

CHRYSOSTOMO, T. N. ***In vitro* study of the effect of the activation of complement system in the stability of different liposomes compositions: selection of the best delivery system and its evaluation as a flavonoid carrier.** 2011. 106 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Liposomes (LUV) are structures composed by lipid bilayer that are organized similarly to vesicles, containing an aqueous compartment inside. They have been evaluated as potential drug carriers, however, after *in vivo* administration, serum opsonins are adsorb on the surface, contributing to their clearance from the circulation by mononuclear phagocytes system (MPS). The complement system (CS) seems to play an important role in this process, mainly to generate active fragments of the C3 component (C3b/iC3b) that are deposited in the liposomal vesicles and are recognized by complement receptors present, for example, in polymorphonuclear cells. Antioxidants such as quercetin have demonstrated significant and beneficial effects on human health, but its low water solubility and bioavailability limit their use. Thus, the proper development of flavonoids carriers would be of great importance to its applicability *in vivo*. The objective of this study is to evaluate the activation of SC proteins by liposomes composed of soy phosphatidylcholine and cholesterol (PC: CHOL) or cholesteryl ethyl ether (PC: CHOL-OET), with or without quercetin. The consumption of the classical (CP) and alternative pathway (AP) caused by the different vesicles was analyzed by hemolytic assay and quantification of iC3b and natural antibodies (IgG and IgM) on the surface of these particles was performed using ELISA kits. The activation of C3 by vesicles with or without quercetin was assessed by two-dimensional immunoelectrophoresis (IEF). The results show that empty liposomes, composed of large amounts of cholesterol, consume more CS components in both pathways, CP and AP. Moreover the replacement of cholesterol by cholesteryl ethyl ether reduced the consumption of both pathways, but the activation of the SC is still dependent on the amount of the compound. The incorporation of quercetin did not alter the consumption of both pathways. The deposition of iC3b, IgG or IgM in vesicles composed of PC: CHOL-OET at mass ratio of 3:1 was the lowest compared to the others. The IEF showed that empty vesicles of PC:CHOL induce less cleavage of C3 in relation to vesicles of PC: CHOL-OET. In addition, the incorporation of quercetin reduces the conversion of C3 into its fragments. These observation suggest that the liposomes PC:CHOL at mass ratio 3:1 seems to be the most appropriate to continue the studies that could culminate in an attempt to use it as a carrier to administrate quercetin *in vivo*.

Keywords: Liposomes, Complement System, Flavonoids, drug carriers

Sumário

INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema Complemento	2
1.2. Lipossomas	8
1.3. Células Fagocíticas	18
1.4. Flavonoides	19
CONCLUSÕES	25
4. REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é um importante componente tanto da imunidade inata quanto adaptativa. Atuando como primeira linha de defesa, sua função é reconhecer partículas estranhas e marcá-las, sinalizando-as para que sejam adequadamente eliminadas, seja pela lise, remoção da circulação ou englobamento por células fagocíticas e posterior digestão.

Este sistema conta com mais de 30 proteínas solúveis ou de membrana (Tabela 1, Tabela 2). Ele permanece inativo até que um estímulo (micro-organismos, partículas estranhas, autoantígenos) dispara um mecanismo em cascata, gerando proteínas e fragmentos com diversas funções. Neste esquema de ativação, há uma amplificação da produção dessas moléculas proteicas com atividade enzimática, levando, em poucos minutos, a uma grande quantidade de fragmentos que funcionam como opsonina e favorecendo o reconhecimento da partícula estranha por fagócitos, ou facilitando a ligação desta a receptores de células responsáveis por removê-las da circulação e encaminhá-las para a destruição. As anafilatoxinas recrutam células e organizam o microambiente da inflamação. Os formadores do complexo de ataque à membrana, em que várias proteínas se ligam e formam poros na membrana do agente estranho, levam a um desbalanço eletrolítico que favorecerá a lise e morte celular.

A cascata de clivagem das proteínas pode ser iniciada por três vias distintas (Figura 1), mas que funcionam concomitantemente no processo inflamatório. A primeira delas é a Via Clássica (VC) que depende de anticorpos da classe IgG ou IgM ou ainda de proteína C reativa para ter início. A Via Alternativa (VA) é ativada pelos antígenos de superfície e por moléculas iniciais da via hidrolisadas espontaneamente. Já a Via das Lectinas (VL), é ativada por antígenos da superfície do patógeno que contêm regiões ricas em manose. As três vias têm como objetivo formar C3 e C5 convertases que amplificam a clivagem das proteínas, culminando em uma via terminal igual para todas elas e levam às funções anteriormente citadas.

A VC inicia-se quando o complexo proteico C1 (C1q, C1r, C1s) liga-se pelo menos a duas porções Fc de anticorpos (IgG ou IgM) aderidos à superfície do agente

estranho. Com essa ligação a proteína C1 muda sua conformação e expõe a porção C1s que cliva a molécula C4 em C4a e C4b. A porção maior, C4b, liga-se covalentemente a superfícies da partícula desconhecida. Então C1s cliva também C2 em C2a e C2b e C2a une-se a C4b já fixada e juntas formam a primeira convertase denominada C3 convertase.

Tabela 1- Componentes do Sistema Complemento: proteínas plasmáticas envolvidas na ativação

Componente	Peso Molecular em kDa da proteína intacta	Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)
Comum a todas vias de ativação		
C3	185 (α , 110; β , 75)	1.200-1.300
Via Alternativa		
Fator B	93	200
Fator D	24	2
Properdina (predominância de oligômeros)	110,165,200 (monômero:55)	25
Via Clássica		
C1q	460	150
C1r	85	50
C1s	85	50
C4	205 (α , 97; β , 75; γ , 33)	300-600
C2	102	20
Via da Lectina		
MBL (formas predominantes)	200, 300, 400	1 (0,01-20)
MASP-1	100	1,5-12
MASP-2	76	nd
Via Terminal		
C5	190 (α , 115; β , 75)	80
C6	110	45
C7	100	90
C8	150 (α , 64; β , 64; γ , 22)	55
C9	70	60

MBL, lectina ligante de manana; MASP, serina-protease associada à MBL; nd, não determinado. Fonte: adaptado de Paul (1999)

Tabela 2- Proteínas Reguladoras do Complemento

Componente	Peso Molecular em kDa da proteína intacta	Concentração plasmática (µg/mL)	Ação reguladora
No plasma			
Fator I	88	35	Responsável pela conversão de C3b em iC3b
Fator H	150	300-450	Regulador da C3 convertase da via alternativa (C3bBb); cofator para fator I
C1-INH	105	240	Inibe as serino-proteases C1r e C1s e as MASPs.
C4bp	550 (7x70, 1x45)	250	Acelera o decaimento da C3 convertase da via clássica (C2a4b)
Proteína S (Vitronectina)	84	500	Liga-se a complexos intermediários terminais do complemento, prevenindo a montagem do MAC citolítico na membrana celular.
Clusterina (SP-40,40)	70 (35 + 35)	50	Previne inserção de MAC na membrana celular
Carboxipeptidase N	280 (2x90, 2x50)	35	Inativador de anafilatoxinas
Nas membranas celulares		Distribuição tecidual	
CR1 (CD35)	190	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos, células T e B	Acelera o decaimento das C3 e C5 convertases das vias clássica e alternativa. Atua como cofator para fator I.
DAF (CD55)	70	Células sanguíneas periféricas (exceto: NK), eritrócitos, células secretoras e epiteliais, células endoteliais	Dissocia ou previne a formação das convertases (C3 e C5 convertases) das vias clássica e alternativa
MCP (CD46)	45-70 (devido glicosilação)	Igual a DAF (exceto: eritrócitos)	Atua como cofator para o fator I na clivagem de C3b.
CD59	18-20	Igual a DAF	Liga-se a C5b-8 e limita a ligação e polimerização de C9, inibindo o passo final de montagem do MAC na membrana celular

C1-INH, inibidor de C1; CR, receptor do complemento; DAF, fator de aceleração do decaimento; MCP, proteína cofator de membrana; CD, "cluster of differentiation".

Fonte: adaptado de Paul (1999)

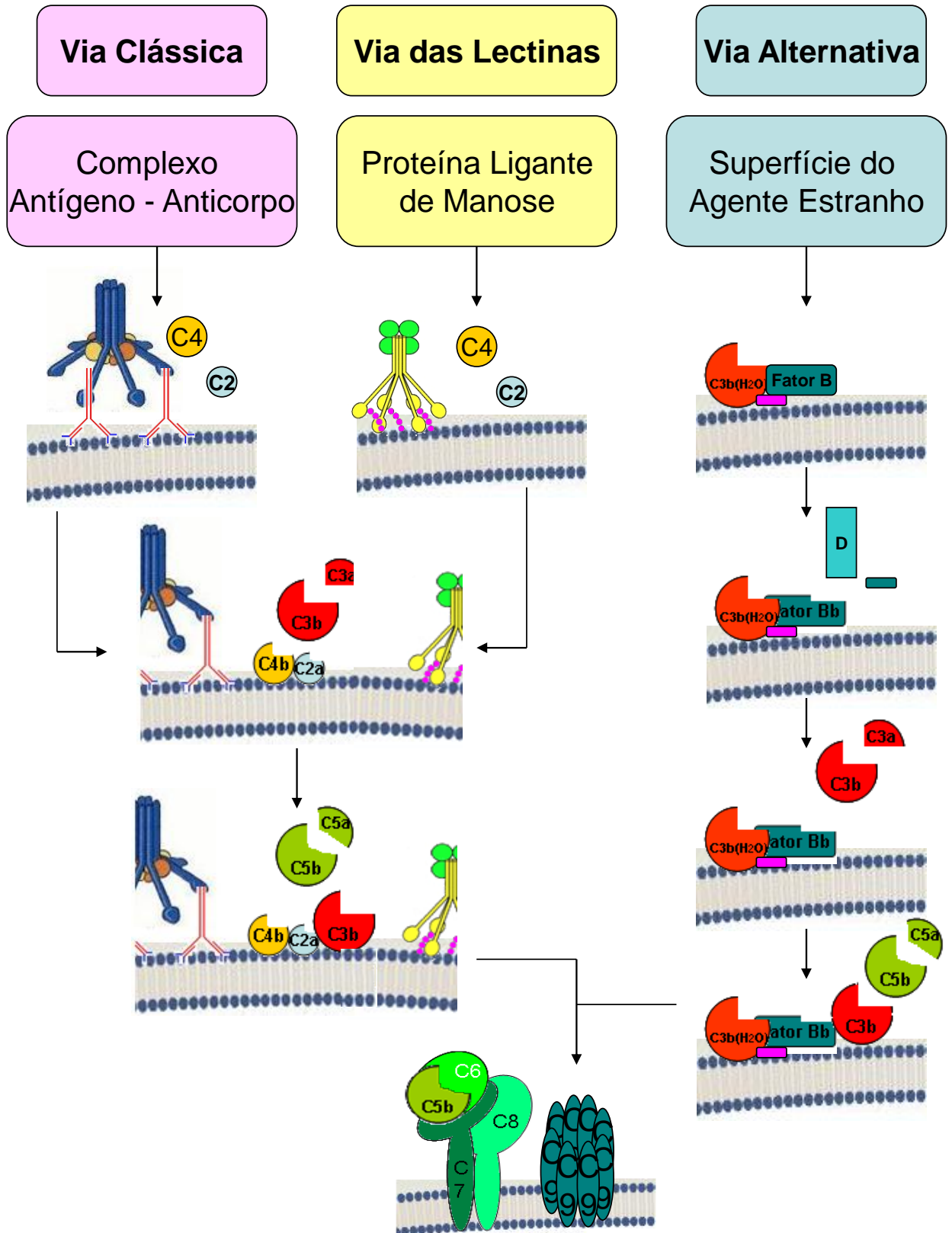


Figura 1. Ativação das vias do Sistema Complemento pelos diferentes estímulos, levando a produção de anafilatoxinas, opsoninas e o complexo de ataque à membrana (MAC).
 Fonte: adaptado de ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008.

Esse complexo agora cliva moléculas de C3 (C3a e C3b) em grande quantidade e a cada C3 convertase formada, a quebra de C3 se amplifica. O fragmento C3b é de extrema utilidade, podendo ser uma opsonina e facilitando o reconhecimento da partícula por parte dos fagócitos ou se ligando a uma C3 convertase (C4b2a) e formando, agora, a C5 convertase (C4b2a3b), que clivará C5 em C5a e C5b. Deste ponto em diante, a via segue para a Via terminal, caminho comum para todas as vias de ativação.

A VA pode ser ativada por diversos estímulos como fungos (HUMMEL et al., 1981 destaques vermelhos ao longo do texto indicam erro na informação: autor não referenciado, faltou autor, ano diferente da referência, etc.), lipopolissacarídeos (FEARON; AUSTEN, 1975), eritrócitos de coelho (PLATTS-MILLS; ISHIZAKA, 1974). Inicia-se pela ligação de uma molécula análoga de C3b, que é hidrolisada espontaneamente na circulação a C3(H₂O), à membrana do agente estranho. Tendo propriedades semelhantes às de C3b (LACHMANN, 1984) essa molécula possui um grupamento tioester exposto que favorece sua ligação covalente à partícula invasora. Com essa primeira ligação o fator B (homólogo a C2) se aproxima e se liga a C3(H₂O) com o auxílio da proteína estabilizadora properdina. Assim, o fator D consegue aproximar-se do complexo e cliva o fator B, formando a primeira C3 convertase desta via (C3(H₂O)Bb). Se, agora, uma nova molécula de C3b, clivada por essa convertase, se ligar a ela, ter-se-á a C5 convertase (C3(H₂O)Bb3b). Daí em diante a via segue para a Via terminal.

A VL tem uma grande semelhança com a VC em termos de estruturas. Sua ativação é iniciada quando um complexo de proteínas ligantes de manose (MBL – análogo de C1) e serino proteases (MASP1 e 2, análogos a C1s e C1r) ligam-se à membrana do patógeno em regiões ricas em manose. MASP2 ativada cliva C4 e C2, formando a mesma C3 convertase da VC (C4b2a). Forma-se a C5 convertase com a ligação de C3b ao complexo de clivagem inicia (C4b2a3b) seguindo para a Via terminal do SC.

A Via terminal culmina na formação do complexo de ataque à membrana (MAC), o poro que tem o objetivo de desestabilizar a célula e estimular sua lise. O MAC é formado então a partir de C5b gerado pelo processo inicial de cada via descrita até o momento. C5b une-se a C6 e formam um complexo de fase fluida (C5bC6), este

binômio junta-se a C7 (hidrofóbica), que auxilia na ancoragem do complexo à membrana da célula invasora. C8 passa a fazer parte do conjunto e favorece a ligação de várias moléculas de C9 (polimerização) que formam, finalmente, o poro.

Células nucleadas podem se recuperar da instabilidade gerada na membrana pelo MAC e escapar da lise (MORGAN, 1989).

Os fragmentos C4a, C3a e C5a, liberados na clivagem dos componentes, se comportarão como anafilatoxinas, ligando-se a receptores celulares e promovendo desgranulação de mastócitos, vasodilatação, perfusão de líquidos e migração de células ativadas (neutrófilos, macrófagos) para o local da inflamação.

Outro papel importante do SC é sua função anti-inflamatória na remoção de imunocomplexos (IC) gerados em doenças autoimunes. A opsonização faz com que a malha de IC se torne mais solúvel além de sinalizá-la para células que contêm receptores CR1, CR3 e CR4 que farão sua remoção do tecido ou circulação.

É importante ressaltar que esse sistema é crucial na defesa do organismo. Sua ativação é rápida e por diversos estímulos, devendo-se reconhecer que um controle muito fino deve estar presente afim de não exacerbar suas funções acarretando danos ao hospedeiro por exagero das atividades. Ainda, como se trata de proteínas (que precisam ser sintetizadas), seu consumo exagerado depleta essas moléculas levando a ausência do sistema em casos de posteriores invasões de agentes desconhecidos. Assim, proteínas regulatórias solúveis e de membrana estão em pontos estratégicos dessa ativação para controlar os efeitos desse sistema. Esses mecanismos envolvem desde a vida curta de alguns componentes ativados (como é o caso de C3(H₂O), que não encontrando rapidamente uma superfície para se ligar é inativado), inativações e o decaimento das convertases (desligamento da properdina, desfavorecendo a clivagem do fator B, por exemplo). Outros exemplos são o inibidor de C1 (C1-INH), fator I, inativador de C3b, fator H, DAF, CD59 e outros, como observado na Tabela 2.

Uma vez que há falta ou disfunção desses reguladores ou de proteínas da cascata, podem ocorrer processos patológicos por alta ativação, por consumo dos

componentes ou por falta de sua ação. Infecções recorrentes, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Angioedema Hereditário, são exemplos de doenças causadas por descontrole desse sistema, levando a lesões teciduais e danos irreparáveis ao hospedeiro.

1.2. Lipossomas

Lipossomas são estruturas semelhantes a vesículas compostas basicamente por fosfolípídeos (fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol) e colesterol e organizadas em bicamada lipídica, podendo ser uni ou multilamelar e contendo um compartimento aquoso em seu interior (CEVCE, 1993), sendo biocompatível e biodegradável (Figura 2).

Devido a sua característica anfipática, podem incorporar substâncias tanto hidrossolúveis em seu compartimento aquoso como lipossolúveis em sua bicamada ou diferentes substâncias em ambos os compartimentos. Isso tem trazido um grande interesse à nanomedicina, uma vez que essas moléculas podem funcionar como carreadores de fármacos através de diversas combinações, protegendo as moléculas ativas de degradações no seu percurso, direcionando-as mais especificamente ao tecido alvo e diminuindo a toxicidade. Ainda, essas moléculas podem ser interessantes ferramentas na medicina diagnóstica e já têm sido empregadas no contraste de exames de imagem (TORCHILIN, 1996, 1997) e como ferramentas de exames laboratoriais (PINHEIRO et al., 1998). Vários produtos estão sendo desenvolvidos para administração por inalação, vias oftálmicas, dérmica, parenteral e intravenosamente (ANSEN; POPOVICH; ALEEN JR., 2000), incluindo agentes anticancerígenos (GABIZON et al., 1994; HUANG et al., 1992; HUANG et al., 1994), antibióticos (CABANAS et al., 1995; DÉGIM et al., 2002; GRAYBILL et al., 1982; LOPEZ et al., 1983), e hormônios peptídicos (BIRUSS; VALENTA, 2006; POTLURI; BETAGERI, 2006).

Estas vesículas são convencionalmente definidas de acordo com seu tamanho e o fato de sua estrutura ser formada por uma única ou várias lamelas (Figura 3). Lipossomas multilamelares (MLV – multilamelar vesicles), também chamados de

oligolamelares (OLV –oligolamellar vesicles), possuem um diâmetro médio que varia geralmente de 400 nm a alguns micrômetros. Lipossomas unilamelares são definidos em dois grupos: lipossomas unilamelares grandes (LUV – large unilamellar vesicles) com diâmetros entre 80 nm e 1 μ m e lipossomas unilamelares pequenos (SUV – small unilamellar vesicles) com diâmetros variando entre 20 e 80 nm. Existem ainda os lipossomas gigantes unilamelares (GUV- giant unilamellar vesicles) ou oligolamelares (GOV- giant unilamellar vesicles) com diâmetros superiores a 1 μ m (SANTOS; CASTANHO, 2002).

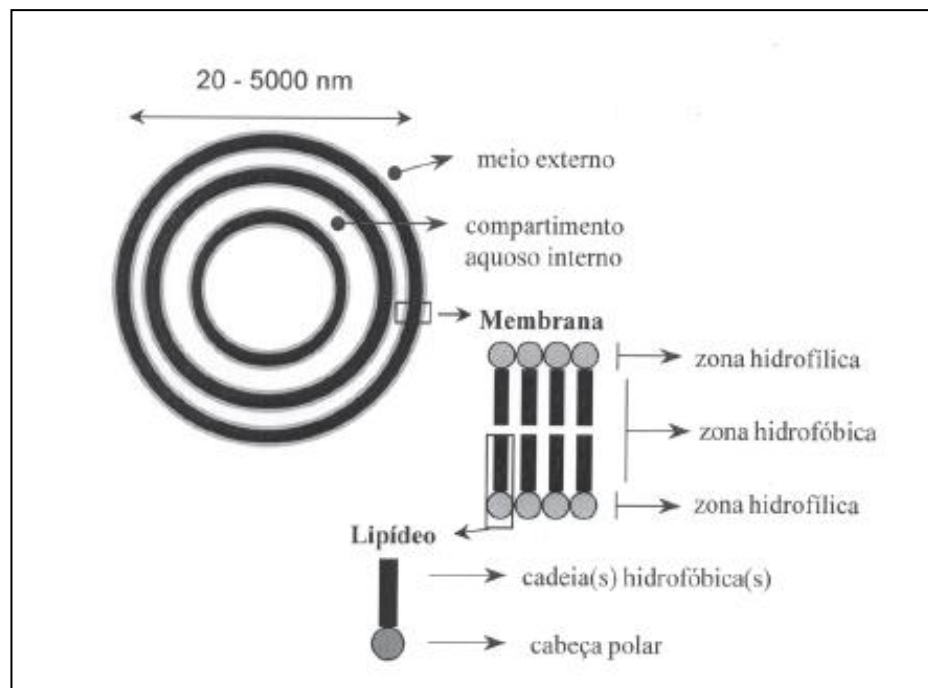


Figura 2 - Características estruturais de lipossomas.
Fonte: adaptado de Frezard et al. (2005)

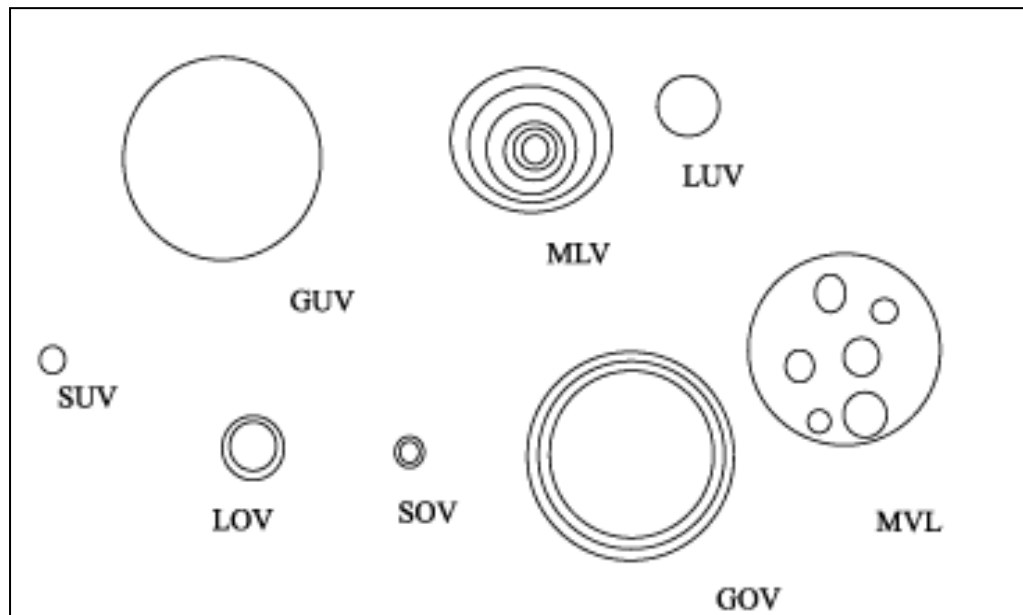


Figura 3 - Representação esquemática dos diversos tipos de lipossomas: SUV (Vesículas unilamelares pequenas), LUV (Vesículas unilamelares grandes), GUV (Vesículas unilamelares gigantes), MLV (Vesículas multilamelares), MVL (lipossomas multivesiculares), SOV (Vesículas oligolamelares pequenas), LOV (Vesículas oligolamelares grandes), GOV (Vesículas oligolamelares gigantes). Cada linha representa uma bicamada lipídica.
Fonte: Santos e Castanho (2002)

Quando administrado *in vivo* de forma parenteral (geralmente intravenosa) possuem a tendência de se acumularem nos macrófagos, responsáveis pela captação e transporte até o fígado e o baço (SAPRA; ALLEN, 2003). Assim, isto deve ser considerado na escolha do lipossoma carreador a ser produzido para um determinado objetivo. Desta forma, os lipossomas podem ainda ser divididos conforme sua composição e aplicação:

a. *Lipossomas convencionais*: suas lamelas de fosfolipídeos podem conter ou não colesterol. Apresentam grandes variações das propriedades físico-químicas, possuem curto tempo de circulação na corrente sanguínea e por isso são utilizados como carreadores de antifúngicos e antimicrobianos para tratamento de infecções do sistema fagocitário mononuclear, de imunomoduladores para aumentar a retenção de células neoplásticas do sistema fagocitário mononuclear (DRUMMOND et al., 1999; GREGORIADIS et al., 2002).

b. *Lipossomas de longa circulação*: suas lamelas contêm fosfolipídeos e glicolipídeos conjugados com poli(etilenoglicol) (PEG), sendo conhecidos como

“stealth” ou lipossomas furtivos ou ainda estericamente estabilizados. As cadeias hidratadas de PEG criam uma barreira impedindo interações com componentes moleculares e celulares do meio biológico, não sendo reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando o tempo de permanência na circulação sanguínea. São a escolha como carreadores de fármacos anticancerígenos e anti-inflamatórios (CHARROIS; ALLEN, 2003; DRUMMOND et al., 1999; SANTOS; CASTANHO, 2005; SAPRA; ALLEN, 2003).

c. *Lipossomas direcionados ou imunolipossomas*: possuem ligantes na sua superfície externa, geralmente anticorpos, que interagem com células de tecidos específicos. Também têm sido revestidos com PEG para aumentar seu tempo de meia vida e estão sendo estudados na vetorização de fármacos a tumores e ao sistema cardiovascular (CROMMELIN et al., 2003; SAPRA; ALLEN, 2003).

d. *Lipossomas fusogênicos*: são compostos de lipídeos catiônicos ou sensíveis ao pH do meio. Como podem condensar DNA e aumentar a transfecção de genes, há grande interesse nestas estruturas como carreadores intracelulares de genes para tratamento de câncer e doenças cardiovasculares (MIZIGUCHI et al., 1996).

e. *Lipossomas polimerizados*: são estudados como carreadores para administração oral por possuírem fosfolipídeos insaturados que podem ser polimerizados pela luz ou que incorporam grupos específicos nas moléculas lipídicas capazes de se polimerizarem em diferentes regiões da estrutura, conferindo-lhes uma maior estabilidade em meios agressivos como o gastrointestinal (ALONSO- ROMANOWSKI et al., 2003).

f. *Magnetolipossomas*: um ferrofluido coloidal é incorporado ao núcleo aquoso da vesícula e desta forma, estas estruturas podem ser orientadas a pontos específicos pela ação de campo magnético (CUYPER et al., 2002).

g. *Lipossomas elásticos*: são constituídos de fosfolipídeos e surfactantes que promovem maior elasticidade da lamela, e conseqüentemente deformações nas vesículas sem serem desestruturadas, sendo adequados para administração transdérmica, penetrando camadas mais profundas da pele (ESSA; BONNER; BARRY, 2002; TOTTRA et al., 2002).

h. *Quitossomas*: são revestidos com o polímero quitosana, polissacarídeo linear de alta densidade e com carga positiva, conferindo maior estabilidade.

Existem inúmeros métodos de preparação de lipossomas que levam à formação de diferentes tipos de vesículas em relação ao seu tamanho, estrutura, números de lamelas, capacidade de encapsulamento, e tempo de retenção das substâncias.

A maioria dos métodos segue as seguintes etapas fundamentais: (1) dissolução dos lipídeos num solvente orgânico; (2) eliminação do solvente por rotaevaporação; (3) dispersão dos lipídeos secos numa solução aquosa (água ou solução aquosa tamponada pH 7,4); (4) dissolução da substância a ser encapsulada na solução orgânica (na primeira etapa) ou na solução aquosa de acordo com o seu caráter hidrofóbico ou hidrofílico, respectivamente e (5) eliminação das substâncias não encapsuladas por uma técnica de separação (filtração, diálise ou centrifugação).

A seguir são descritos alguns métodos de preparação de lipossomas mais difundidos. Deve-se considerar que nenhum é perfeito, todos possuem vantagens e desvantagens. As condições de produção e o objetivo final devem ser considerados no momento da escolha do método a ser empregado (DELATTRE et al., 1993).

a. *Método da hidratação do filme fosfolipídico*: consiste na adição da solução aquosa ao filme fosfolipídico obtido após evaporação do solvente orgânico; a dispersão dos fosfolipídeos é facilitada por ultra-agitação e uso de esferas de vidro; com o contato com a solução aquosa sob agitação, o filme de fosfolipídeos desprende da superfície do balão sob forma de vesículas multilamelares (MLV) e com diâmetros elevados. É um método simples e rápido, mas possui baixa taxa de encapsulamento sendo pouco adequado à produção industrial.

b. *Uso de ultrassom*: com o intuito de reduzir os diâmetros de vesículas obtidas pelo método da hidratação, a suspensão de lipossomas é submetida à ação de ultrassom obtendo-se SUV. No entanto, apesar de produzir vesículas menores e mais homogêneas, possui as mesmas desvantagens do método acima. Além disso, reações químicas podem ocorrer, como por exemplo, quebra das cadeias pela ação do ultrassom.

c. *Extrusão*: foi descrito como um método que emprega membranas de policarbonato. Há também redução de MLV através da extrusão exercida várias vezes sob pressão e uso de filtros de diversas porosidades decrescentes.

d. *Microfluidização*: a suspensão de MLV, através de uma bomba com pressão ao redor de 10.000 psi, passa por um filtro e em seguida por um compartimento de interação onde é submetida a ultra-agitação. Os choques promovem ruptura das partículas maiores que acabam se reconstituindo em vesículas menores e de tamanhos homogêneos; após duas ou três repetições deste processo, obtém-se vesículas com diâmetro ao redor de 100-200 nm e após dez repetições, para menos 100 nm. Além disto, este processo também aumenta a taxa de encapsulamento.

e. *Injeção etanólica*: os lipídeos são dissolvidos em etanol e em seguida a solução é injetada numa solução aquosa sob agitação. O diâmetro dos SUV obtidos irá depender da velocidade de agitação e de injeção além da concentração dos lipídeos no etanol. Após o preparo, o etanol pode ser eliminado por diálise ou por filtração em gel de Sephadex G50 em cromatografia de exclusão. É um método muito simples e rápido e adequado à produção industrial, apesar da baixa taxa de encapsulamento.

f. *Evaporação em fase reversa*: neste caso, os fosfolipídeos são dissolvidos num solvente orgânico e uma solução aquosa é adicionada formando duas fases imiscíveis. A extremidade polar dos fosfolipídeos é atraída pela fase aquosa e assim estes se depositam sob a interface fase orgânica/fase aquosa. O sistema é então submetido ao ultrassom formando uma emulsão água/óleo onde micelas reversas com núcleo aquoso na fase orgânica são estruturadas. Em seguida, ocorre evaporação do solvente orgânico, concentrando as micelas que acabam se rompendo formando um gel líquido cristalino. Sob agitação e adição de solução aquosa, os lipossomas são formados pela autoassociação dos fosfolipídeos em dupla camada, obtendo-se LUV com grande núcleo aquoso, podendo encapsular altas quantidades de substâncias hidrofílicas. No entanto, devido a várias etapas, não é adequado para produção industrial.

g. *Dispersão de micelas mistas*: os lipídeos, com auxílio de detergente ou tensoativo como Tween 20, Triton ou colato de sódio, são dissolvidos no meio

aquoso, formando as micelas mistas. O detergente é eliminado por diálise ou filtração. As micelas lipídicas coalescem e formam SUV ou LUV. A taxa de encapsulamento é baixa e o processo é geralmente demorado.

h. *Liofilização-reidratação*: SUV em solução previamente formados são misturados com a substância a ser encapsulada, sendo a mistura liofilizada. Em seguida, é reconstituída pela adição de solução aquosa, produzindo MLV, que embora de tamanhos heterogêneos, com alta taxa de encapsulamento.

Deve-se considerar que, em processos onde a eficiência de encapsulamento é pequena, pode-se aumentar a quantidade de material a ser encapsulado. Outra estratégia seria o encapsulamento ativo, que consiste na introdução de substâncias em lipossomas pré-formados através da difusão do exterior para o interior das vesículas, através de um gradiente de pH, onde por exemplo, o pH no interior da estrutura é ácido enquanto no meio externo é neutro. Substâncias básicas são adicionadas ao meio externo e são atraídas pela força iônica para o interior das vesículas. Esta técnica permite o controle da taxa de encapsulamento desejada para diferentes substâncias e pode atingir até 90%.

Para atingir de maneira satisfatória o objetivo de serem moléculas carreadoras de fármacos, estudos têm sido propostos para se conhecer a fundo a composição e as características físico-químicas, idéias que favoreçam a permanência dessas partículas na circulação, de maneira que não sejam degradadas nem eliminadas antes do tempo necessário de atingirem seus alvos. Este tem sido um grande problema encontrado para o uso dessas estruturas, uma vez que vários são os mecanismos fisiológicos de metabolização e remoção de agentes estranhos ao organismo.

Além disto, um problema central do uso de lipossomas para liberação de drogas tem sido a sua rápida captura da circulação e conseqüentemente liberação “subótima” do ingrediente ativo no tecido ou órgão-alvo (ISHIDA; HARASHIMA; KIWADA, 2002, ISHIDA et al., 2001; PATEL et al., 1992). Um dos principais responsáveis por esse possível insucesso parece ser o SC. Após a administração dos lipossomas *in vivo*, opsoninas são adsorvidas na superfície por um processo chamado opsonização, disparando um reconhecimento e remoção do lipossoma

pelo sistema fagocítico mononuclear através de fagocitose mediada por receptores ou endocitose e como resultado, eles são rapidamente eliminados da circulação sanguínea (LIU, 1997; PATEL, 1992; SENIOR, 1987). Lipossomas são preferencialmente ingeridos por macrófagos e neutrófilos (DÊGIM et al., 2002).

Em adição, a importância funcional de proteínas séricas na desestabilização dos lipossomas tem sido demonstrada em estudos *in vitro* (FUNATO; YODA; KIWADA, 1992; HARASHIMA et al., 1996; HERNANDEZ-CASELLES; VILLALAIN; GOMEZ-FERNANDEZ, 1993; ISHIDA et al., 1997; PANAGI et al., 1998). As proteínas do SC têm sido consideradas possíveis candidatas para uma principal opsonina dominante no processo de remoção devido ao seu papel importante na eliminação de materiais particulados tais como patógenos através da lise de membrana ou aumento da captura pelas células fagocíticas (MOGHIMI; HAMAD, 2008; PANGBURN, 1983; PORTER; REID, 1979; TOMLINSON, 1993) devido ao depósito do fragmento C3b no alvo ou C3bi que favorece a fagocitose mediada por receptores de SC (BROWN, 1991; WRIGHT, 1992).

Diversos autores concordam com o fato de que o tamanho dos lipossomas, bem como sua composição, a carga, a fluidez de suas membranas são pontos chaves para maior ou menor ativação do SC e alteração do tempo de permanência dessas vesículas na circulação (CARMO et al., 2008; ISHIDA; HARASHIMA; KIWADA, 2002; MOGHIMI; HAMAD, 2008). Carmo et al. (2008) afirma que quanto maior o tamanho da partícula mais fácil é de o SC reconhecê-la e mais eficiente é a opsonização, sendo que partículas menores que 200nm driblam melhor os efeitos deletérios desse sistema.

Além disso, conteúdos altos de colesterol e carga negativa favorecem a ativação das vias do SC de diversas espécies (ISHIDA et al., 2001), favorecendo maior deposição de C3 nas partículas (CARMO et al., 2008). Chonn et al. (1995) mostraram que quanto maior a ligação de proteínas na superfície das vesículas, menos tempo elas permanecem residentes na circulação. Ringstad et al. (2008) descrevem que peptídeo derivado de C3a desestabiliza membranas de origem lipídicas modificando a sua estrutura e carga.

Há que se ressaltar que essas vesículas lipídicas ainda podem interagir com lipoproteínas circulantes da corrente sanguínea, sendo sua estrutura desestabilizada como resultado da interação com certos componentes séricos, como por exemplo, lipoproteína de alta densidade (HDL) (CHOBANIAN, TALL, BRECHER, 1979; SCHERPHOF, VANELEUVEN, WILSCHUT E DAMEN, 1983; SENIOR, GREGORIADES e MITROPOULOS, 1983). O lipossoma parece transferir lipídeos para a lipoproteína (KRUPP, CHOBANIAN, BRECHER, 1976; TALL e SMALL, 1977; SCHERPHOF, VANELEUVEN, WILSCHUT E DAMEN, 1983), levando a poros de tamanhos diferentes, desestabilizando as vesículas e liberando conteúdo ativo antes de atingir seu alvo. Já a lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode fornecer lipídios para estas vesículas lipossomais, aumentando o tamanho e modificando suas propriedades (COMISKEY & HEATH, 1990; SHAHRROKH & NICHOLS, 1982).

Outro fator relevante que envolve lipossomas e o SC é a hipersensibilidade desencadeada pela administração destas vesículas carreadoras. Resultados mostram que injeções intravenosas de lipossomas causam sintomas relacionados a processos alérgicos em paciente, cerca de 5 a 10 minutos após a infusão, que, porém, não são mediados por IgE e sim devido à excessiva resposta do SC pela alta produção de anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a) (MOGHIMI; HAMAD, 2008, SZEBENI, 2006). Ainda, esta pseudoalergia não depende de um segundo contato e tem seus efeitos diminuídos quando a exposição se torna frequente, até desaparecer por completo sendo de resolução espontânea (MOGHIMI; HAMAD, 2008).

A Figura 4 mostra as principais diferenças e semelhanças entre a reação alérgica convencional e a causada por infusão de lipossomas

Chanan-Khan et al. (2003) mostraram que 45% de reação em pacientes com câncer que receberam Doxil pela primeira vez apresentaram sintomas de pseudo alergia. No estudo de Szebeni (2005) a infusão de Doxil causou ativação do SC em 21 dos 29 pacientes (72%), refletido por elevações significativas do complexo 5b-9 no plasma. O tempo de formação de 5b-9 mostrou variação individual considerável,

incluindo desde elevações rápidas (10 minutos) com retorno gradual aos níveis normais dentro de 2 horas, até elevação moderadamente rápida (30 minutos), com retorno parcial dos níveis normais de 5b-9 após 2 horas.

Em suma, além de verificar a farmacocinética do fármaco que se deseja incorporar em sistemas lipossomais e sua compatibilidade com a vesícula, é preciso escolher a composição e o conjunto de características físico-químicas e relacioná-los a todos estes aspectos extrínsecos às partículas, que envolvem um processo mais dinâmico e integrado dos sistemas biológicos, para que se aproxime do ideal, a fim de proporcionar um carreamento do fármaco de maneira eficiente e segura.

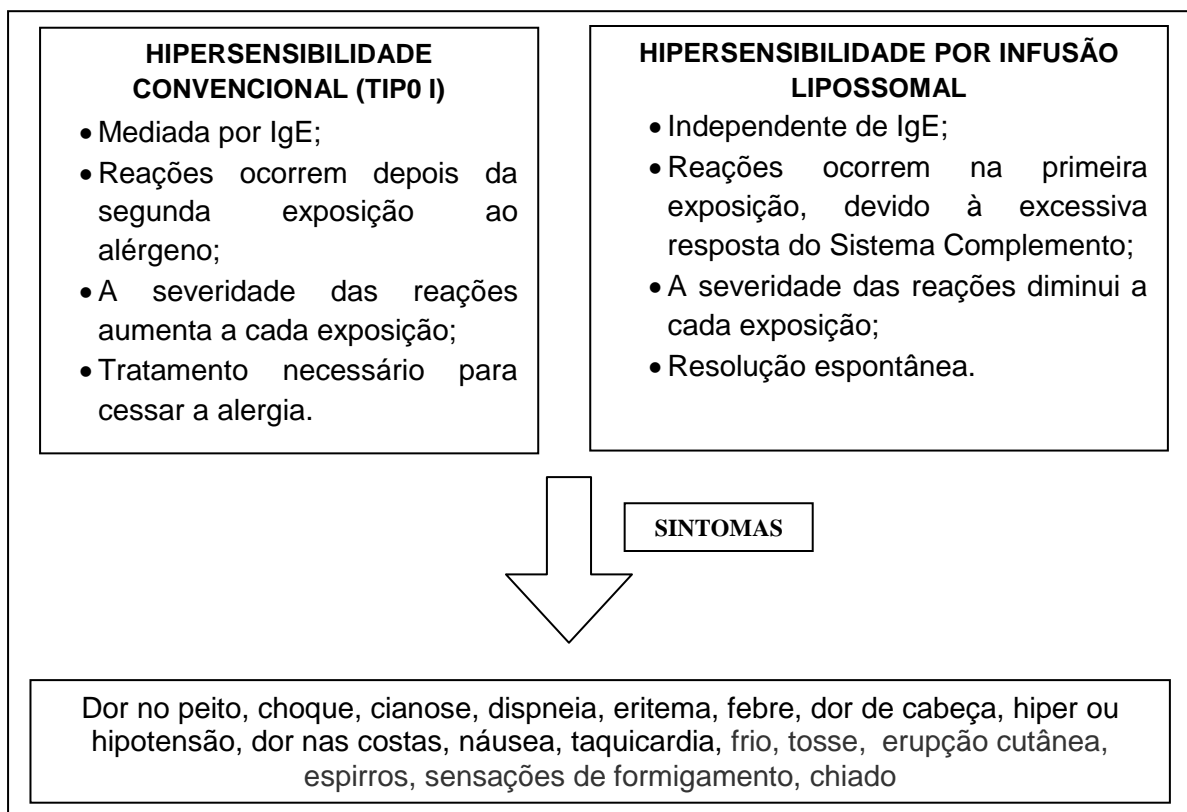


Figura 4 - Comparação dos mecanismos que desencadeiam reações alérgicas tipo I e mediada por infusão lipossomal e seus sintomas.

Fonte: adaptada de Moghimi & Hamad (2008).

1.3. Células Fagocíticas

Relatos da literatura evidenciam que a captura de lipossomas por células polimorfonucleares (PMNs) é reduzido na presença de soro inativado pelo calor, sugerindo a participação de componentes do SC no processo fagocítico como C3bi (SCIESZKA et al., 1991).

Huong, Harashima e Kiwada (1998) mostram que o tratamento de soro de rato com anti-C3 inibiu completamente a remoção de grandes lipossomas contendo um alto e médio conteúdo de colesterol (44 e 33%, respectivamente), sugerindo que a fagocitose mediada por receptores de SC pode ser um mecanismo de eliminação de lipossomas deste tipo. No entanto, nenhuma inibição foi observada na captura de lipossomas de pequeno conteúdo de colesterol (22%) quando o soro recebeu o mesmo tratamento. Estes resultados fornecem evidências que PMNs “ingerem” lipossomas via dependente e independente de complemento dependendo do conteúdo de colesterol.

Wassef e Alving (1993) descreveram um modelo *in vitro* de fagocitose de lipossomas dependente de complemento. Lipossomas opsonizados pelo SC são avidamente ingeridos por macrófagos peritoneais e macrófagos derivados de cultura de medula óssea. No entanto, quando lipossomas contêm certos lipídeos como fosfatidilinositol, gangliosídeo GM1 e ceramida sulfogalactosil, o tempo de circulação aumenta *in vivo* em camundongos ao passo que diminui drasticamente em ratos (LIU; SONG; LIU, 1995).

A remoção hepática de lipossomas contendo fosfatidilserina tem sido estudada e parece ser dependente de soro (LIU; LIU; SONG, 1995). A eficácia da remoção pelo fígado depende do tamanho do lipossoma, onde os maiores são opsonizados mais eficientemente e mais ingeridos que os menores. Em adição, o aquecimento do soro a 56°C por 30 minutos aboliu esta atividade, sugerindo o envolvimento de componentes do SC.

Em síntese, estes estudos revelam que há uma heterogeneidade de resultados em relação à eliminação de lipossomas da circulação e que esta eliminação é resultado da captura por células fagocíticas, de maneira dependente ou

independente do SC adsorvido nas vesículas; das características físico-químicas dos lipossomas como tamanho, conteúdo de colesterol e fosfolípídeo empregado e além disto do modelo *in vitro* utilizado, ou seja, da fonte de SC e fonte de células fagocíticas.

Neste contexto, percebe-se que, para aumentar o tempo de meia-vida ou permanência na circulação sanguínea, os lipossomas devem “evadir”, “driblar” os dois mecanismos principais de eliminação descritos anteriormente. Além disso, é importante considerar os componentes usados e suas quantidades numa preparação de vesículas lipossomais.

1.4. Flavonoides

Desde a antiguidade, compostos derivados de plantas são utilizados por exercer uma influência benéfica na saúde humana e têm sido empregados como medicamentos. Além disto, várias hipóteses sugerem o efeito benéfico do consumo elevado de vegetais e frutas, através de resultados obtidos com estudos *in vitro* e *in vivo*, nos quais os flavonoides têm sido extensivamente avaliados.

Os flavonoides correspondem a um grupo de substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis encontradas em frutas, vegetais, raízes, flores, chá e vinho cujo esqueleto básico é formado por dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono, sendo derivados de benzo- γ -pireno (anéis A e C na Figura 5). Considerando a natureza química da molécula, e as posições de substituintes nos anéis A, B e C, os flavonoides podem ser divididos em 14 grupos diferentes, sendo seis deles bem caracterizados e classificados com base na estrutura molecular em flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonols, flavanols (catequinas) e antocianinas (Figura 5). Uma visão geral e sumarizada da ocorrência natural dos flavonoides em alimentos está apresentada na Tabela 3.

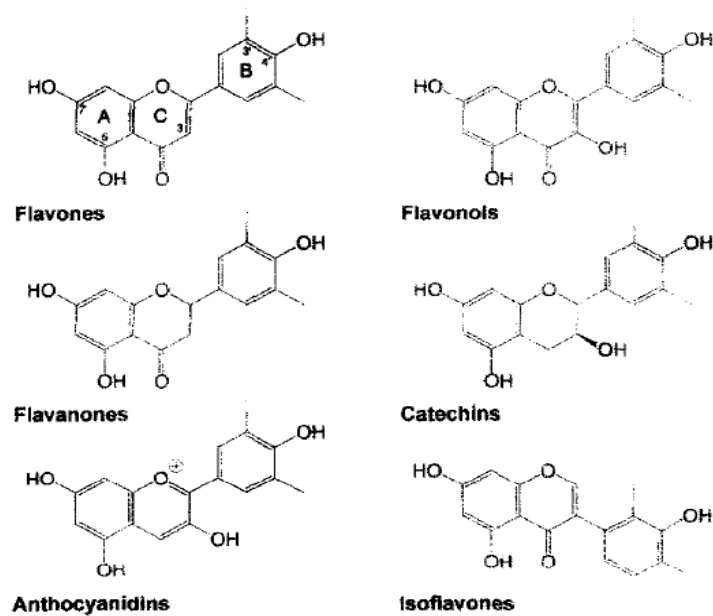


Figura 5 - Subclasses de flavonoides. Classificação de acordo com variações no anel heterocíclico C. Fonte: adaptado de Hollman e Katan (1997). Melhorar a resolução. Talvez escanear de novo a figura.

Dados epidemiológicos suportam o papel de flavonoides como antioxidantes na prevenção de doenças coronarianas. Entretanto, a absorção a partir da dieta é um pré-requisito para a relação causal entre flavonoides e estas doenças. Além disto, o metabolismo destes compostos após sua absorção não deveria substancialmente inibir sua capacidade antioxidante.

Tabela 3 - Flavonoides e sua ocorrência nos alimentos

Subclasses de flavonoides	Principais fontes nos alimentos
Flavonols	Cebola, brócoli, repolho, maçãs, cerejas, chá, vinho tinto
Flavonas	Salsa, tomilho
Flavanonas	Frutas cítricas
Catequinas	Maçã, chá
Antocianidinas	Cerejas, uvas
Isoflavonas	Soja, legumes

Informações a respeito da absorção, metabolismo e excreção dos flavonoides em humanos são ainda raras e contraditórias. A absorção e subsequente distribuição, metabolismo e excreção dos flavonoides em humanos são pouco estudados. Como estão ligados a açúcares como glicosídeos (com exceção das catequinas), a sua absorção tem sido considerada negligenciável. Somente flavonoides livres, sem a molécula de açúcar, denominados agliconas, são considerados capazes de passar pela parede intestinal e nenhuma enzima que poderia predominantemente quebrar as ligações β -glicosídicas é secretada neste meio (GRIFFITHS, 1982; KÜHNAU, 1976). No entanto, hidrólise das formas éster, glicosídeos ou polímeros pode ocorrer no cólon por enzimas intestinais ou pelos microrganismos, os quais ao mesmo tempo degradam as agliconas liberadas, produzindo ácidos aromáticos muito simples no processo. Desta forma, somente uma porção bem pequena de flavonoides pode ser absorvida a partir da dieta. Embora, somente flavonoides agliconas sejam considerados capazes de atravessar a parede intestinal, absorção pobre (menor que 1%) de quercetina aglicona administrada oralmente foi encontrada em humanos (GUGLER; LESCHIK; DENGLER, 1975). Em contraste, em ratos, a sua absorção foi aproximadamente de 20% (UENO et al., 1983). Dietas contendo quercetina são as mais estudadas e este flavonoide é absorvido em quantidade significativa (52%) (HOLLMAN; KATAN, 1997), sugerindo que formas glicosiladas são mais facilmente absorvidas que as formas agliconas.

Mas é importante considerar que os polifenóis, abundantes na nossa alimentação, não serão necessariamente muito ativos no nosso organismo, uma vez que possuem uma pequena atividade intrínseca, são pouco absorvidos pelo intestino e são altamente metabolizados e rapidamente excretados. Além disto, os metabólitos encontrados no sangue ou outros tecidos podem apresentar-se diferentes da forma nativa quanto à atividade biológica. Após a absorção destes compostos, o seu metabolismo é bem conhecido em modelos animais, mas poucos dados foram obtidos praticamente com humanos (GRIFFITHS, 1982; HACKETT, 1986). Os grupos hidroxilas são conjugados com ácido glucurônico e sulfato no fígado. Em adição, metilação também pode ocorrer. Este processo metabólico de detoxicação ocorre para reduzir os efeitos tóxicos de xenobióticos, facilitando sua eliminação biliar ou urinária, por aumentarem sua hidrofiliabilidade. Os polifenóis

circulantes são derivados conjugados, extensivamente ligados à albumina. São capazes de penetrar nos tecidos, particularmente naqueles onde foram metabolizados, mas estudos adicionais se tornam necessários para investigar a habilidade de se acumular em sítios específicos. Quando excretados pela bile, estão sujeitos à ação de enzimas bacterianas (β -glucuronidase), os quais podem ser reabsorvidos e entrar no ciclo entero-hepático, levando a uma longa presença dos polifenóis no organismo.

O metabolismo hepático da quercetina tem sido estudado empregando modelo de perfusão em rato (SHAH; BHATTACHARYA, 1986) e os derivados são encontrados na urina nas formas livre e conjugada (WAKUI et al., 1992).

Vários trabalhos mostram inúmeras atividades biológicas de flavonoides como antioxidantes, efeito importante para doenças crônicas degenerativas relacionadas à presença de radicais livres; inibidores de enzimas-chave (lipooxigenase, ciclooxigenases) envolvidas no metabolismo oxidativo do ácido araquidônico durante processos inflamatórios; agentes antiulcerogênico, antiespasmódico e antidiarreicos, analgésicos, estrogênicos, imunoestimulantes, antialérgicos, antidiabético e anti-inflamatório (DI CARLO et al., 1999).

Radicais livres de oxigênio e peroxidação de lipídeos parecem estar envolvidos em várias situações patológicas como aterosclerose, câncer e inflamação crônica (HALLIWELL, 1994). O papel antioxidante e inibidor da peroxidação lipídica reside principalmente na capacidade “scavenger” do que no fato de quelare metais (FRAGA et al., 1987; RATTY, 1988). No entanto, pode-se pensar que após capturar os radicais, um radical do flavonoide poderia ser formado, se propagar e promover efeitos deletérios no organismo. Na realidade, o que ocorre é que o radical formado do flavonoide apresenta alta estabilidade devido a características estruturais a saber: (1) grupos σ -dihidroxilas no anel B, (2) dupla ligação entre C2 e C3 na conjugação com o grupo 4-oxo e (3) presença simultânea dos grupos 3- e 5-hidroxilas, não reagindo prontamente e conseqüentemente atuando como um antioxidante. Quercetina, 3,5,7,3', 4'-pentahidroxi-flavona, possui estas três características estruturais e é um excelente antioxidante (DE WHALLEY et al., 1990), prevenindo até a oxidação *in vitro* de LDL (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Com relação a estas propriedades antioxidantes de flavonoides, análise *in vitro* da atuação destes compostos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos PMNs pode ser avaliada por ensaios de quimioluminescência, empregando sondas de luminol e lucigenina.

Em relação à fagocitose, metabolismo oxidativo de neutrófilos e produtos naturais, estudos realizados em nosso laboratório mostram resultados interessantes. Kanashiro et al. (2004) avaliaram o efeito de oito flavonoides isolados de *L. granmongolense*, *L. salicifolia* e *L. ericoides* na geração de EROs por PMNs de coelho estimulados por partículas de zymosan opsonizadas com soro e imunocomplexos insolúveis, através de ensaio de quimioluminescência. Os resultados obtidos revelaram que compostos 5 e 7-dihidroxiados inibiram quase totalmente a quimioluminescência desencadeada por ambos estímulos, sugerindo que a ação de flavonoides na geração de EROs por PMNs estimulados é dependente da estrutura do composto. Efeito inibitório de cumarinas foi observado na quimioluminescência de neutrófilos de coelho após estimulação com zymosan opsonizado (KABEYA et al., 2002), revelando ainda uma relação estrutura do composto e atividade na produção de EROs pelos neutrófilos. A atividade *in vitro* de quatro flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol e galangina) sobre a produção de EROs foi avaliada empregando-se PMNs estimulados com imunocomplexos de IgG ou imunocomplexos de F(ab')₂, opsonizados ou não com SC e os resultados mostram que a atividade inibitória foi dependente da concentração e está também relacionada a sua estrutura química (MOREIRA et al., 2004). Um outro trabalho avaliou a atividade de misturas de própolis obtidas de diferentes regiões, de extratos de própolis verde e de compostos isolados deste produto sobre o metabolismo oxidativo de PMNs estimulados com zymosan opsonizado (SIMÕES et al., 2004). Todas as amostras inibiram a produção de quimioluminescência de maneira dependente da concentração e este efeito variou ao longo do período de meses estudado, demonstrando que fatores sazonais desempenham importante influência sobre a atividade de própolis verde.

Vários estudos têm sido realizados com objetivo de preparar formulações lipossomais encapsulando flavonoides no sentido de superar sua insolubilidade em água e preparar formulações para administração *in vivo*, além de permitir o estudo da ação antioxidante dos compostos quando incorporados em lipossomas, entre

outras atividades biológicas. Gordon e Roedig-Penman (1998) avaliaram a atividade antioxidante dos flavonoides quercetina, miricetina e alfa-tocoferol em lipossomas unilamelares pequenos. Os resultados mostram que miricetina foi mais efetiva como antioxidante em lipossomas seguida da quercetina e alfa-tocoferol. Resultados obtidos em nosso laboratório indicam que foi possível obter preparações lipossomais com alta eficiência de incorporação e expressiva atividade antioxidante de flavonoides em sistemas livres de células (LANDI-LIBRANDI et al., 2011).

Outro estudo investigou a atividade antineoplásica de lipossomas contendo quercetina, rutina, isoscutelareína e isoscutelareína glicosilada, sendo estes dois últimos compostos do mesmo grupo da genisteína, um potente agente anticâncer (GONIOTAKI et al., 2004). Os resultados mostram que a formulação lipossomal de rutina foi mais ativa que o flavonoide livre e apresentou considerável atividade inibitória do crescimento contra as linhagens celulares H460 e SF268. Já isoscutelareína lipossomal apresentou a melhor atividade antineoplásica entre todos os flavonoides estudados. A eficiência de lipossomas contendo quercetina tem sido testada *in vitro* contra dano oxidativo hepático induzido por tetracloreto de carbono em ratos (MANDAL et al., 2002). Níveis séricos de enzimas como alanina transaminase (TGP) e fosfatase alcalina foram significativamente reduzidos devido ao pré-tratamento com lipossomas de quercetina (0,5mL de lipossoma contendo 0,27mg de quercetina) enquanto a mesma quantidade do flavonoide livre não produziu o mesmo efeito.

Estudos ainda são muito contraditórios e pouco conclusivos sobre a ação pró ou anticomplementar da quercetina e outro flavonoides (CIMANGA et al., 1995; PIERONI et al., 2000; MIN et al., 2003; LEE et al., 2005; ZHANG & CHEN, 2008).

Sendo os flavonoides moléculas com propriedades relevantes para diferentes tratamentos e considerando sua baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade em água, torna-se interessante desenvolver um carreador para transportar estas substâncias a fim de otimizar suas propriedades *in vivo*.

CONCLUSÕES

Com todo o exposto e de acordo com objetivos propostos para esse trabalho, conclui-se que:

1. O método de injeção etanólica é simples, de baixo custo para o preparo de lipossomas de diferentes composições lipídicas, mostrando alta eficiência de incorporação da quercetina nas vesículas.

2. A caracterização físico-química de todas as composições de LUV ou LUV-Q foi favorável para uma menor ativação do SC devido à ausência de carga e aos tamanhos pequenos e homogêneos das vesículas obtidas, mostrando ainda uma boa polidispersão das suspensões lipossomais.

3. O conteúdo e o tipo de colesterol empregados no preparo das vesículas foram determinantes para a desestabilização dos diversos LUV e LUV-Q pelo SHN. Preparações com maior conteúdo de colesterol, em proporção de massa com fosfatidilcolina, apresentaram maior consumo das vias clássica e alternativa do SC.

4. A substituição por éter de colesterol diminuiu consideravelmente o consumo de SC, mostrando ser mais eficiente na manutenção da integridade das vesículas.

5. A substituição de colesterol por éter de colesterol nas preparações mostrou uma importante redução na deposição de iC3b, IgG e IgM na superfície das vesículas, não havendo, no entanto, uma resposta linear com a variação das quantidades desses lipídios.

6. A incorporação de quercetina nas diversas preparações de lipossomas não alterou o padrão de resposta de ativação (consumo) das vias do Sistema Complemento obtido com as vesículas vazias nos ensaios hemolíticos.

7. A análise de ativação enzimática de C3 por IEF revelou que LUV (vazios) compostos de PC:CHOL 2:1 e 5:1 promoveram maior degradação de C3, quando comparados às vesículas de PC:CHOL-OET 2:1 e 3:1, sugerindo que o maior consumo de SC se deve a maior ativação deste sistema e não um processo de ligação inespecífica de seus componentes a superfície lipossomal.

8. Embora não observado no ensaio hemolítico, a incorporação de quercetina nas vesículas parece diminuir a clivagem de C3 do soro humano em seus fragmentos, conforme avaliado por IEF.

9. Em geral, a composição PC:CHOL-OET em proporção de massa 3:1 promoveu menor ativação do Sistema Complemento, contendo a vesícula quercetina ou não e a menor deposição dos componente iC3b, IgG e IgM, possivelmente levando a uma menor opsonização e provavelmente a menor produção de fragmentos anafiláticos (C5a e C3a) que levariam a pseudoalergia mediada por SC. Sendo assim, essa seria a preparação mais adequada para futura verificação *in vivo* de seu comportamento como carreadora de substâncias com potencial terapêutico, uma vez que teria mais condições de se manter íntegra na circulação e por mais tempo, chegando ao tecido ou órgão alvo.

4. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALEXPOULOU, E.; GEORGOPOULOS, A.; KAGKADIS, K. A.; DEMETZOS, C. Preparation and Characterization of Lyophilized Liposomes with Incorporated Quercetin. **J. Liposome Res.**, Athens, v. 16, p. 17-25, 2006.

ALONSO-ROMANOWSKI, S.A.; CHIARAMONI, N.S.; LIOY, V.S.; GARGINI, R.A.; VIERA, L.I.; TAIRA, M.C. Characterization of diacetylenic liposomes as carriers for oral vaccines. **Chemistry and Physics of Lipids**, Bernal, v.122, p.191-203, 2003.

ALVING, C.R.; SWARTZ, G.M. JR. Antibodies to cholesterol, cholesterol conjugates and liposomes: implications for atherosclerosis and autoimmunity. **Crit Rev Immunol.**, Washington, v. 10, p. (5):441-53., 1991.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALEEN JR., L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000.

APERS, S.; HUANG, Y.; VAN MIERT, S.; DOMMISSE, R.; BERGHE, D.V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Characterisation of new oligoglycosidic compounds in two Chinese medicinal herbs. *Phytochem Anal.*, Antwerp, v.13,p.202-6, 2002.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, Michigan State University, v. 24, p. 1355-1363, 1998.

BATZRI, S.; KORN, E.D. Interaction of phospholipids vesicles with cells- endocytosis and fusion as alternate mechanism for uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. **J. Cell. Biol.**,Maryland, v. 66, p. 621-634, 1975.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Vienna, v. 62, p. 210-219, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, E.J. Complement receptors and phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, St. Louis, v. 3, p. 76-82, 1991.

CABANAS, A.; REIG, F.; GARCIA ANTON, J.M.; ARBOIX, M. Sustained release of liposome-encapsulated Enrofloxacin after intramuscular administration in rabbits. **Am. J. Vet. Res.**, Barcelona, v. 56, p. 1498-1501, 1995.

CARMO, V.A.S.; OLIVEIRA, M.C.; REIS, E.C.O.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S. et al. Phisicochemical Cracterization and Study of in vitro Interactions of Ph-sensitive Lipossomes whit the Complement System. **Journal of Liposome Research**, London, v. 18, p. 59-70, 2008.

CEVCE, G. Lipid properties as a basis for membrane modeling and rational liposome design. In: GREGORIADIS, G. (Ed.). **Liposome technology**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 1-36. v. 1.

CHANAN-KHAN, A.; SZEBENI, J.; SAVAY, S.; LIEBES, L.; RAFIQUE, N.M.; ALVING, C.R. et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. **Ann. Oncol.**, New York, v. 14, p. 1430–1437, 2003.

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

CHOBANIAN, J.V.; TALL, A.R.; BRECHER, P.I. Interaction between unilamellar egg yolk lecithin vesicles and human high density lipoprotein. **Biochem.**, v. 18, p. 180-187, 1979.

CHONN, A.; SEMPLE, S.C.; CULLIS, P.R. Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of “non-self” particles. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 25825-25849, 1995.

CHONN, A.; CULLIS, P.R.; DEVINE, D.V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. **J Immunol.**, Vancouver, v. 146, p. 4234-41, 1991.

CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; LASURE, A.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.; KAMBU, K.; TONA, L. In vitro anticomplementary activity of constituents from *Morinda morindoides*. **J Nat Prod.**, Kinshasa, v.58, p. 372-8, 1995.

COMISKEY, S.J.; HEATH, T.D. Serum-induced leakage of negatively charged liposomes at nanomolar lipid concentrations. **Biochemistry. Madison**, v. 29, p. 3626-31, 1990.

CROMMELIN, D.J.A.; STORM, G.; JISKOOT, W.; STENEKES, R; MASTROBATTISTA, E.; HENNINK, W.E. Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, Utrecht, v. 87, p. 81-88, 2003.

CULLIS, P.R.; CHONN, A.; SEMPLE, S.C. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Burnaby, v. 32, p. 3-17, 1998.

CUYPER, M.D.; HODENIUS, M.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R.B.; SILVA, M.F.; MORAIS, P.C.; SANTANA, M.H.A. Attachment of water-soluble proteins to the surface of (magnetizable) phospholipid colloids via NeutrAvidin-derivatized phospholipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, Kortrijk, v. 245, p. 274-280, 2002.

DE WHALLEY, C.; RANKIN, S.M.; HOULT, J.R.S.; JESSUP, W.; LEAKE, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low lipoprotein by macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, London, v. 39, p. 1743-1750, 1990.

DÊGIM, Z.; DÊGIM, T.; BAS, L.; ELMAS, M. The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in Kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes. **Inc. J. Biomed. Mater Res.**, Ankara, v. 61, p. 246-251, 2002.

DEMEL, R.A.; LALA, A.K.; KUMARI, N.S.; VAN DEENEN, L.L.M. The effect of the sterol oxygen function on the interaction with phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 771, p. 142-150, 1984.

DEVINE, D.V.; WONG, K.; SERRANO, K.; CHONN, A.; CULLIS, P.R. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. **Biochim Biophys Acta**, Vancouver, v. 1191, p.43-51, 1994.

DI CARLO, G.; MASCOLE, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, Naples Federico, v. 65, p. 337-353, 1999.

FEARON, D.T.; AUSTEN, K.F. Properdin: Binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. **J. Exp. Med.**, Boston, v. 142, p. 856-863, 1975.

FRAGA, C.G.; MARTINO, V.S., FERRARO, G.E.; COUSSIO, J.F.; BOVERIS, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.717-720, 1987.

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

FUNATO, K.; YODA, R.; KIWADA, H. Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. **Biochim. Biophys. Acta**, Tokushima, v. 1103, p. 198-204, 1992.

GABIZON, A.; CATANE, R.; UZIELY, B.; KAUFMAN, B.; SAFRA, T.; COHEN, R. et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. **Cancer Res.**, Jerusalem, v. 54, p. 987-992, 1994.

GONIOTAKI, M.; HATZIANTONIOU, S.; DIMAS, K.; WAGNER, M.; DEMETZOS, C. Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines. **JPP**, Athens, v. 56, p. 1217-1224, 2004.

GORDON, M.H.; ROEDIG-PENMAN, A.R. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. **Chem. Phys. Lipids**, Whiteknights, v. 97, p. 79-85, 1998.

GRAYBILL, J.R.; CRAVEN, P.C.; TAYLOR, R.L.; WILLIAMS, D.M.; MAGEE, W.E. Treatment of murine cryptococcosis with liposomes associated amphotericin. **Br. J. Infect. Dis.**, v. 145, p. 748-751, 1982.

GREGORIADIS, G.; BACON, A.; WANDERLEY, W.C.; MCCORMACK, BRENDA. A role for liposomes in genetic vaccination. **Vaccine**, London, v.20, p. B1-B9, 2002.

GRIFFITHS, L.A. Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harbone, J.; Mabry, T. eds., **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982;681-718.

GRIFFITHS, L.A. Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harbone, J.; Mabry, T. eds., **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982;681-718.

GUGLER, R., LESCHIK, M.; DENGLER, H.J.; Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 9, p. 229-234, 1975.

HACKETT, A.M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In: Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J. Eds, **Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological, Structure-Activity Relationships**. New York: Alan R Liss Inc., 1986;177-194.

HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, London, v. 344, p. 721-724, 1994.

HARASHIMA, H.; HUONG, T.M.; ISHIDA, T.; MANABE, Y.; MATSUO, H.; KIWADA, H. Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats. **Pharm. Res.**, Tokushima, v. 13, p. 1704-1709, 1996.

HERNANDEZ-CASELLES, T.; VILLALAIN, J.; GOMEZ-FERNANDEZ, J.C. Influence of liposomes charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. **Mol. Cell. Biochem.**, Murcia, v. 120, p. 119-126, 1993.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Letters**, Wageningen, v. 114, p. 139-140, 1997.

HUANG, S.K.; MAYHEW, E.; HONG, K.; FRIEND, D.S.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma. **Cancer Res.**, San Francisco, v. 52, p. 6774-6781, 1992.

HUANG, S.K.; STAUFFER, P.R.; HONG, K.; GUO, J.W.; PHILLIPS, T.I.; HUANG, A. et al. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumour uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. **Cancer Res.**, San Francisco, v. 54, p. 2186-2191, 1994.

HUMMEL, D.S.; BERNINGER, R.W.; TOMASZ, A.; WINKELSTEIN, J.A. The fixation of C3b to pneumococcal cell wall polymers as a result of activation of the alternative complement pathway. **J. Immunol.**, v. 127, p. 1287-1289, 1981.

HUMPHRIES, G.M.; McCONNEL, H.M. Antigen mobility in membranes and complement-mediated immune attack. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 2483-2487, 1975.

HUONG, T.M.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Complement dependent and independent liposome uptake by peritoneal macrophages: cholesterol content dependency. **Biol. Pharm. Bull.**, Takushima, v. 21, p. 969-973, 1998.

ISHIDA, T.; FUNATO, K.; KOJIMA, S.; YODA, R.; KIWADA, H. Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation. **Int. J. Pharm.**, Takushima, v. 156, p. 27-37, 1997.

ISHIDA, T.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. **Curr. Drug. Metab.**, Sapporo, v. 2, p. 397-409, 2001.

ISHIDA, T.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Liposome clearance. **Biosci. Rep.**, Takushima, v. 22, p. 197-224, 2002.

ISHIDA, T.; KOJIMA, H.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Biodistribution of liposomes and C3 fragments associated with liposomes: evaluation of their relationship. **Int. J. Pharm.**, Takushima, v. 205, p. 183-193, 2000.

ISHIDA, T.; YASUKAWA, K.; KOJIMA, H.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Effect of cholesterol content in activation of the classical versus alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. **Int. J. Pharm.**, Takushima, v. 224, p. 69-79, 2001.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. **J. Pharm. Pharmacol.**, Campinas, v. 57, p. 23-30, 2005.

KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A.E.; SORIANI, F.M.; LOPES, J.L.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, Ribeirão Preto, v. 111, p. 103-113, 2002.

KAMPS, J.A.; SCHERPHOF, G.L. Receptor versus non-receptor mediated clearance of liposomes. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Groningen, v. 32, p. 81-97, 1998.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; POLIZELLO, A.C.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytother. Res.**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 61-5, 2004.

KRUPP, I.; CHOBANIAN, A.V.; BRECHER, J.P. the in vivo transformation of phospholipid vesicles to a particle resembling HDL in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Boston, v. 72, p. 1251-58, 1976.

KÜHNAU, J. The Flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev. Nutr. Diet**, v. 24, p. 117-191, 1976.

LACHMANN, P.J. Inherited complement deficiencies. **Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, London, v. 6, n. 306(1129), p. 419-440, 1984.

LANDI-LIBRANDI, A.P.; DE OLIVEIRA, C.A.; AZZOLINI, A.E.; KABEYA, L.M.; DEL CIAMPO, J.O.; BENTLEY, M.V.; LUCISANO-VALIM, Y.M. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system. **J. Microencapsul.**, London, v. 28, p. 258-67, 2011.

LALA, A.K.; KUMARI, S.N. Cholesteryl-(2'-hydroxyl)-ethyl ether – A potential cholesterol substitute for studies in membranes. **J. Biosci.**, v. 13, p. 147-151, 1988.

LEE, S.Y.; MIN, B.S.; KIM, J.H.; LEE, J.; KIM, T.J.; KIM, C.S.; KIM, Y.H.; LEE, H.K. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. **Phytother Res.**, Daejeon, v. 19, p. 273-6, 2005.

LIU, D. Biological factors involved in the blood clearance of liposome by liver. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Pittsburgh, v. 24, p. 201-213, 1997.

LIU, D.; LIU, F.; SONG, Y.K. Recognition and clearance of liposome containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. **Biochim. Biophys. Acta**, Pittsburgh, v. 1235, p. 140-146, 1995.

LIU, D.; SONG, Y.K.; LIU, F. Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. **Pharm. Res.**, Pittsburgh, v. 12, p. 1775-1780, 1995.

LOPEZ, B.; MEHTA, G.R.; HOPFER, R.L.; MILLS, K.; KASI, L.; MEHTA, K. et al. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome encapsulated amphotericin. **Br. J. Infect. Dis.**, v. 147, p. 939-945, 1983.

MANDAL, A.K.; SINHA, J.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; DAS, N. Targeting of liposomal flavonoid to liver in combating hepatocellular oxidative damage. **Drug Deliv.**, Kolkata, v. 9, p. 181-185, 2002.

MARJAN, J.; XIE, Z.; DEVINE, D.V. Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. **Biochim Biophys Acta**, Vancouver, v. 1192, p. 35-44, 1994.

MAYER, M.M. Complement and complement fixation. In: KABAT, E.A.; MAYER, M.M. (Ed.). **Experimental immunochemistry**. Charles C. Thomas Publisher, p. 133-240, 1971.

MILLER, C.R.; BONDURANT, B.; MCLEAN, S.D.; MCGOVERN, K.A.; O'BRIEN, D.F. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. **Biochemistry**, Tucson, v. 37, p. 12875-12883, 1998.

MIN, B.S.; LEE, S.Y.; KIM, J.H.; LEE, J.K.; KIM, T.J.; KIM, D.H.; KIM, Y.H.; JOUNG, H.; LEE, H.K.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; HATTORI, M. Anti-complement activity of constituents from the stem-bark of *Juglans mandshurica*. **Biol Pharm Bull**. Daejeon, v.26, p. 1042-4, 2003.

MIZZUGUCHI, H.; NAKAGAWA, T.; NAKANISHI, M.; IMAZU, S.; NAKAGAWA, S.; MAYUMI, T. Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome.

Biochemical and Biophysical Research Communications, Osaka, v.218, p.402-407, 1996.

MOGHIMI, S.; HAMAD, I. Liposome Mediate Tiriggering of Complement Cascade. **J. Liposso. Res.**, Brighton, v. 18, p. 195-209, 2008.

MOREIRA, M.R. Estudo do mecanismo de ação de flavonóides no processo de produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados por imunocomplexos de IgG/OVA. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 131p. , 2004.

MORGAN, B. P.Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non- letal effects. **Biochemical J.**, London, v. 15, p.1- 14, 1989.

MURA, P.; MAESTRELLI, F.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L.; MICHELACCI, I.; GHELARDINI, C.; RABASCO, A.M. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Florence, v. 67, p. 86-95, 2007.

NEWMAN, S.L.; MIKUS, K.K. Deposition of C3b and iC3b onto particulate activators of the human complement system. Quantitation with monoclonal antibodies to human C3. **J. Exp. Med.**, North Carolina, v. 161, p. 1414-1431, 1985.

OLIVEIRA, C.A.; MACHADO, A.E.H.; PESSINE, F.B.T. Preparation of 100nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine, using ethanol injection method. **Chem. Phys. Lipids**, Uberlandia, v. 133, p. 69-78, 2005.

PANAGI, Z.; AVGOUSTAKIS, K.; EVANGELATORS, G.; ITHAKISSIOS, D.S. Protein-induced CF release from liposomes in vitro and its correlation with the BLOOD/RES biodistribution of liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 163, p. 103-114, 1998.

PANGBURN, M.K. Activation of complement via the alternative pathway. **Fed. Proc.**, v. 42, p. 139-143, 1983.

PANGBURN, M.K.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, p. 2416-2420, 1978.

PATEL, H.M. Serum opsonins and liposome: their interaction and opsonophagocytosis. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, London, v. 9, p. 39-90, 1992.

PAUL, E.W. Complement. In: **Fundamental Immunology**, Lippincott-Raven Publishers, 4^a ed, chapter 9, p. 967-995, 1999.

PIERONI, A.; PACHALY, P.; HUANG, Y.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae). **J Ethnopharmacol.** ,Firenze, v.70, p. 213-7, 2000.

PFROMMER, G.S.; DICKENS, S.M.; WILSON, M.A.; YOUNG, B.J.; KOZEL, T.R. Accelerated decay of C3b to iC3b when C3b is bound to the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Infect. Immun.**, Reno, v. 61, n. 10, p. 4360-4366, 1993.

PINHEIRO, M.M.; PERES, S.K.; MARQUES, L.; OLIVEIRA, R.M.; ANDRADE, L.E.C. Desempenho do ensaio enzimático baseado em imunólise de lipossomas para determinação da atividade total do complemento em pacientes com nefrite lúpica. **Ver. Bras. Reumatol.**, São Paulo, V. 38, p. 337-38, 1998.

PLATTS-MILLS, T.A.; ISHIZAKA, K. Activation of the alternate pathway of human complements by rabbit cells. **J. Immunol.**, v. 113, p. 348-58, 1974.

PONS, M.; FORADADA, M.; ESTELRICH, J. Liposomes obtained by ethanol injection method. **Int. J. Pharm.**, v. 95, p. 51-56, 1993.

PORTER, P.R.; REID, K.B.M. Activation of the complement system by antibody-antigen complex: the classical pathway. **Adv. Prot. Chem.**, v. 33, p. 1-71, 1979.

POTLURI, P.; BETAGERI, G.V. Mixed-micellar proliposomal systems for enhanced oral delivery of progesterone. **Drug Deliv., Pomona**, v. 13, p. 227-232, 2006.

RACKOVA, L.; FIRAKOVA, S.; KOSTALOVA, D.; STEFEK, M.; STURDIK, E.; MAJEKOVA, M. Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: quantitative structure-activity relationship. **Bioorg. Med. Chem.**, Bratislava, v. 13, p. 6477-6484, 2005.

RATTY, A.K. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, Singapore, v. 39, p. 69-79, 1988.

REID, K.B. Activation and control of the complement system. **Essays Biochem.**, v. 22, p. 27-68, 1986.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, London, v. 20, p. 933-956, 1996.

RINGSTAD, L.; PROTOPAPA, E.; LINDHOLM-SETHSON, B.; SCHMIDTCHEN, A.; NELSON, A.; MALMSTEN, M. An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono and bilayers. **Langmuir**, Uppsala, v. 24, p. 208-216, 2008.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: A Bala Mágica Acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, Edmonton, v. 42, p. 439-462, 2003.

SIMÕES, L.M.; GREGÓRIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J. Ethnopharmacol.**, Monte Alegre, v. 94, p. 59-65, 2004.

SCHERPHOF, G.; VANELEUWEN, B.; WILSCHUT, J.; DAMEN, J. Exchange of phosphatidylcholine between small unilamellar liposomes and human plasma high-density lipoprotein involves exclusively the phospholipid in the outer monolayer of the liposomal membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 732, p. 595-599, 1983.

SCHERPHOF, G.L.; VELINOVA, M.; KAMPS, J.; DONGA, J.; WANT, H.; KUIPERS, F. et al. Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 24, p. 179-191, 1997.

SCIESZKA, J.F.; MAGGIORA, L.L.; WRIGHT, S.D.; CHO, M.J. Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. **Pharm. Res.**, Kalamazoo, v. 8, p. 65-69, 1991.

SENIOR, J.; GREGORIADIS, G.; MITROPOULOS, K.A. Stability and clearance of small unilamellar liposomes. Studies with normal and lipoprotein-deficient mice. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 760, p. 111-118, 1983.

SHAH, G.M.; BHATTACHARYA, R.K. Modulation by plant flavonoids and related phenolics of microsomal catalyzed adduct formation between benzo(a)pyrene and DNA. **Chem. Biol. Interact.**, v. 59, p. 1-15, 1986.

SHAHROKH, Z.; NICHOLS, A.V. Particle size interconversion of human low density lipoproteins during incubation of plasma with phosphatidylcholine vesicles. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 108, p. 888-95, 1982.

STEWART, J.C.M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Anal. Biochem.**, v. 104, p. 10-14, 1980.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. **Toxicology**, Silver Spring, v. 216, p. 106-121, 2005.

SZEBENI, J.; BARANJI, L.; SÁVAY, S.; BODÓ, M.; MILOSEVITS, J.; ALVING, C.R.; BRUNGER, R. Complement activation-related cardiac anaphylaxis in pigs: Role of C5 anaphylaxin and adenosine in liposome-induced abnormalities in ECG and heart function. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** Maryland, v. 290, p.1050-58, 2006.

TALL, A.R.; SMALL, D.M. Solubilization of phospholipid membranes by human high density lipoproteins. **Nature**, v. 265, p. 163-64, 1977.

TOMLINSON, S. Complement defense mechanism. **Curr. Opin. Immunol.**, New York, v. 5, p. 83-89, 1993.

TORCHILIN, V.P.; PAPISOV, M.I. Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? (molecular mechanism of liposome steric protection with polyethylene glycol: role of polymer chain flexibility). **J. Liposome Res.**, New York, v. 4, p. 725-739, 1994.

TORCHILIN, V.P. Liposomes as delivery agents for medical imaging. **Mol. Med. Today**. Charlestown, V.2, p.242-49, 1996.

TORCHILIN, V.P. Surface-modified liposomes in γ and MR-imaging. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.24, p.301-313, 1997.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; DEBERNARDI, F.; GALLARATE, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, Turin, v. 241, p. 319-327, 2002.

UENO, I.; NAKANO, N.; HIRONO, I. Metabolic fate of [14C]quercetin in the ACI rat. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 53, p. 41-50, 1983.

VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; SCHMITZ, H.H.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radic. Biol. Med.**, Buenos Aires, v. 34, p. 84-92, 2003.

VOGT, W.; VON ZABERN, I.; DAMERAU, B.; HESSE, D.; LÜHMANN, B.; NOLTE, R. Mechanisms of complement activation by crystalline cholesterol. **Mol. Immunol.**, v. 22, p. 101-106, 1985.

VONARBOURG, a.; PASSIRANI, C.; SALNEIR, P.; BENOIT, J.P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**. Angers, v. 27, p. 4356-73, 2006.

WAKUI, Y.; YANAGISAWA, E.; ISHIBASHI, E.; MATSUZAKI, Y.; TAKEDA, S.; SASAKI, H. et al. Determination of baicalin and baicalein in rat plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, Ibaraki, v. 13, p. 131-136, 1992.

WASSEF, N.M.; SWARTZ, G.M. JR.; ALVING, C.R.; KATES, M. Antibodies to liposomal phosphatidylcholine and phosphatidylsulfocholine. **Biochem Cell Biol.**, Washington, v.68, p.54-8, 1990.

WRIGHT, S.D. Receptors for complement and the biology of phagocytosis. In: GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SUNDERMAN, R. (Ed.). *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, 1992. p. 477-495.

ZHANG, T.; CHEN, D. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. **J Ethnopharmacol.**, Shanguai, v.117,p.351-61, 2008.

];CHRYSOSTOMO, T. N. **Estudo *in vitro* do efeito da ativação do Sistema Complemento na estabilidade de lipossomas de diferentes composições: seleção do melhor sistema de liberação e sua avaliação como carreador de flavonoides.** 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

ERRATA

Folha	Parágrafo/linha	Onde se lê	Leia-se
8	3/4	moléculas	Vesículas
8	3/7	moléculas	Vesículas
10	2/6	Neoplásticas do	Neoplásicas no
11	4/3	moléculas	Vesículas