

Efeito de tensoativos na estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos

Effect of surfactants in the stability of small unilamellar liposomes

Marlus Chorilli^{1,2}, Thereana Cristina Rimério², Anselmo Gomes de Oliveira² & Maria Virgínia Scarpa²

RESUMO – Os lipossomas vêm sendo incorporados em formulações dermocosméticas tanto como veículo para liberação controlada quanto para aumentar a incorporação de substâncias ativas às células. Todavia, grande parte destas formulações apresenta tensoativos, os quais podem levar à desorganização da bicamada dos lipossomas, causando sua ruptura e a formação de micelas mistas. Dentre os métodos usados para verificação da estabilidade dos lipossomas, destaca-se o método turbidimétrico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de tensoativos na estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) por técnica turbidimétrica. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que em concentrações mais elevadas, a proporção de tensoativos predomina sobre a de fosfolípido estrutural, formando gradualmente micelas mistas, o que reflete na diminuição da absorvância. Em lipossomas contendo colesterol, a diminuição de absorvância foi menos intensa devido à maior estabilidade da bicamada proporcionada pelo aumento da rigidez da membrana.

PALAVRAS-CHAVE – Tensoativos, lipossomas, estabilidade, turbidez.

SUMMARY – The liposomes are being incorporated in dermocosmetics formulations as much as vehicle for controlled release how much to increase the incorporation of active substances to the cells. However, great part of these formulations presents surfactants, which can take to the disorganization of the liposomes bilayer, causing rupture and formation of mixed micelles. Amongst the used methods for verification of the liposomes stability, the turbidity method is distinguished. Soon, the objective of this work was to verify the effect of surfactants in the stability of small unilamellar liposomes (SUVs) for turbidity technique. In accordance with the gotten results, it was concluded that in higher concentrations, the ratio of surfactants predominates on the ratio of structural phospholipid, forming gradually mixed micelles, what reflects in the reduction of the absorbance. In liposomes containing cholesterol, the absorbance reduction was less intense due to bigger stability of the bilayer proportionate for the increase of the rigidity of the membrane.

KEYWORDS – Surfactants, liposomes, stability, turbidity.

INTRODUÇÃO

A utilização de lipossomas em formulações dermocosméticas é cada vez mais crescente, pois propicia a encapsulação de agentes ativos tanto hidro quanto lipofílicos, visto serem os lipossomas compostos anfifílicos (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira, 1993; Oliveira & Scarpa, 1992; Fendler, 1982).

Os lipossomas são constituídos de uma ou mais bicamadas dispostas esfericamente, separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso interno. Esses sistemas organizam-se em presença de água, sendo que, em parte, a orientação de bicamada é determinada pela natureza dos grupos polares e das cadeias carbônicas (Israelachvili, 1991; Lasic & Martin, 1989).

As moléculas de princípios ativos podem ser classificadas em quatro categorias: altamente hidrofílicas, altamente lipofílicas, anfifílicas e insolúveis. Uma alternativa para incorporação de princípios ativos é a utilização de lipossomas devido ao seu alto grau de

biocompatibilidade e seu caráter bifásico (Gulati *et al.*, 1998).

De uma forma geral, a encapsulação e a retenção da substância incorporada dependem essencialmente de vários fatores: natureza e concentração do fosfolípido, concentração da substância, carga elétrica dos lipídios, força iônica do meio aquoso, taxa de colesterol, tamanho e condições de fabricação dos lipossomas (Puisieux & Benita, 1984).

Na área dermocosmética, os lipossomas vêm sendo utilizados tanto para aumentar a incorporação de substâncias ativas às células, quanto como veículo para liberação controlada de princípios ativos (Magdassi, 1997; Hayward & Smith, 1990; Suzuki & Sakon, 1990). Eles têm sido empregados principalmente na prevenção da queda de cabelos, promoção do crescimento capilar, desaceleração do processo de envelhecimento da pele, clareamento da pigmentação cutânea e prevenção e tratamento da lipodistrofia ginóide (Di Salvo, 1996; Suzuki & Sakon, 1990).

As principais vantagens do emprego de lipossomas

Recebido em 19/9/2006

¹ Curso de Farmácia - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Metodista de Piracicaba;

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP

para a administração de agentes dermocosméticos são o fato de que eles podem transportar substâncias solúveis tanto em água quanto em óleo; apresentam alta afinidade com membranas biológicas; são naturais e biodegradáveis, além de acentuarem a hidratação natural da pele e cabelo (Citernes & Sciacchitano, 1995).

Egbaria & Weiner (1991) citam como principais vantagens de formulações tópicas de lipossomas:

- De forma semelhante às células, lipossomas podem armazenar substâncias hidrossolúveis em seu interior e substâncias lipofílicas e anfífilas em suas membranas, onde os princípios ativos ficam posicionados para serem transferidos a outras membranas, como a pele;

- A maioria dos veículos convencionais são ineficazes em distribuir seus princípios ativos à pele devido à sua impossibilidade em penetrar a camada córnea. Todavia, as bicamadas dos lipossomas penetram eficientemente na pele;

- A incorporação em lipossomas de substâncias ativas que penetram prontamente na pele resulta em uma diminuição de sua absorção sistêmica comparada àquela resultante da administração tópica em veículos convencionais;

- A deposição dos lipossomas no estrato córneo resulta em um efeito reservatório substancial;

- Lipossomas são atóxicos, biodegradáveis e podem ser preparados em larga escala.

Ao estudar a estabilidade das substâncias ativas encapsuladas em lipossomas é interessante atentar para a base cosmética, visto que os fosfolípidios podem interagir incompativelmente com componentes do veículo, prejudicando a estabilidade dos lipossomas. Logo, possuem pequena utilidade em bases que contêm altas concentrações de etanol, como os cosméticos que promovem crescimento capilar, porque estes se rompem na presença de etanol. Além disso, a solubilização ocorre quando lipossomas são adicionados a bases com altas concentrações de tensoativos (Suzuki & Sakon, 1990).

Segundo Fadda *et al.* (1998), a presença de tensoativos em determinadas concentrações nos veículos comumente empregados nas formulações tópicas, por sua vez, leva à desorganização da bicamada dos lipossomas, causando sua ruptura e a formação de micelas mistas.

Os tensoativos não iônicos, como o álcool cetílico etoxilado e propoxilado, estão presentes em formulações cosméticas principalmente como agentes emulsionantes. Tensoativos aniônicos, como o lauril sulfato de sódio, são principalmente utilizados em soluções de limpeza e em shampoos. Os tensoativos catiônicos, como o cloreto de cetiltrimetilamônio, estão presentes em condicionadores, além de serem utilizados como antimicrobianos. Já os tensoativos anfóteros, como o cocoanfocarboxiglicinato, estão presentes em shampoos, especialmente aqueles que minimizam a irritação ocular (Rieger, 1993).

O processo físico-químico envolvido na interação lipossoma-tensoativo, além de permitir verificar incompatibilidades entre lipossomas e tensoativos, propicia melhor entendimento do processo de interação entre pele e tensoativos (Ribosa *et al.*, 1992).

Para verificação da interação lipossoma-tensoativo, diversas técnicas tem sido relatadas pelos autores, dentre elas a medida de turbidez (Khlebtsov

et al., 2003; Nacka *et al.*, 2001; Sivakumar & Rao, 2001; Mobed & Chang, 1998; Matsuzaki *et al.*, 2000).

Ribosa *et al.* (1992) estudaram as modificações físico-químicas de estruturas de lipossomas por interação com tensoativos anfotéricos, catiônicos e aniônicos pela técnica de espectrofotometria de absorção, monitorando a solubilização de lipossomas através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P . Os autores concluíram que a espectrofotometria de absorção foi uma boa técnica para estudo de estabilidade de preparações de lipossomas, e a espectroscopia de RMN ^{31}P uma excelente técnica para monitoração do processo de solubilização de lipossomas por tensoativos. Em relação à capacidade solubilizante dos tensoativos estudados, verificou-se que os tensoativos anfóteros apresentaram maior poder de solubilização, seguido dos tensoativos catiônicos e dos aniônicos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de tensoativos na estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos (SUV), pela técnica de turbidez, com o objetivo de estudar possíveis modificações estruturais decorrentes dessas interações.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método de sonicação a partir de soluções clorofórmicas de fosfatidilcolina de soja (PC) 40mM ou fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) 40mM. Obteve-se um filme pela evaporação do solvente em fluxo de nitrogênio. Hidratou-se o filme com 5mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5 por 30 minutos. A dispersão foi agitada em vórtex por 1 minuto a cada 10 minutos, até desprendimento total do filme. Após a hidratação, a dispersão foi sonicada em *Sonicador Sonicator – Ultrasonic Liquid Processor, Heat Systems* – mod. XL 2020, potência nominal de 400W. O protocolo de formação dos lipossomas foi acompanhado por medidas de espalhamento de luz em espectrofotômetro a 410nm com o objetivo de padronizar o tempo necessário para a formação de lipossomas unilamelares pequenos (SUVs). Devido à presença de resíduos de titânio obtidos pela sonicação, a dispersão de SUV foi submetida à ultracentrifugação a 25000rpm, 25°C, durante 10 minutos para a remoção dos mesmos. Foram preparados também lipossomas contendo colesterol (CHOL), o qual foi acrescido na solução clorofórmica de PC ou PCH na proporção de 1:6 na fase de formação do filme lipídico.

Adição de tensoativos aos lipossomas

Adicionou-se, separadamente, concentrações crescentes de tensoativo não iônico, aniônico, catiônico e anfótero, a saber, álcool cetílico etoxilado e propoxilado, solução de lauril sulfato de sódio (LSS) 2%, solução de cloreto de cetiltrimetilamônio (CCTA) 50% e solução de cocoanfocarboxiglicinato de sódio (CACG) 50%, respectivamente, nas amostras de lipossomas e a turbidez foi verificada.

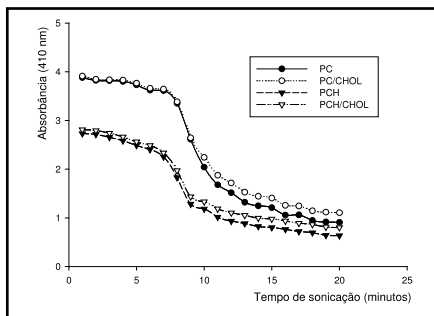


FIG. 1 – Monitoramento espectrofotométrico em 410nm para avaliação da obtenção de SUV contendo PC 40mM, PC 34mM/CHOL 6mM, PCH 40mM e PCH 36mM/CHOL 6mM após período de sonicação (sonicação com potência nominal de 400W).

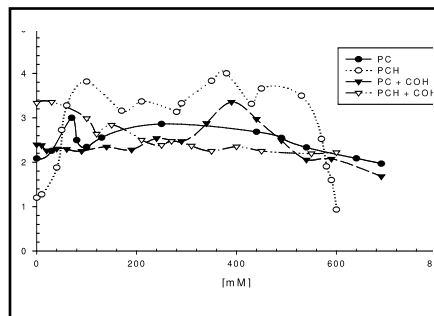


FIG. 2 – Adição de álcool cetílico etoxilado e propoxilado aos SUVs.

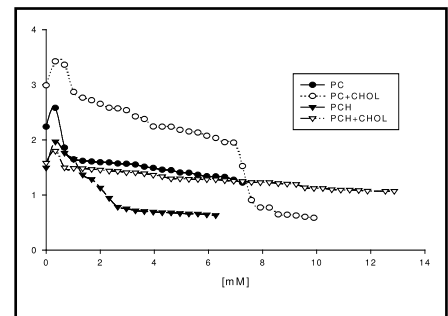


FIG. 3 – Adição de solução de LSS 2% aos SUVs.

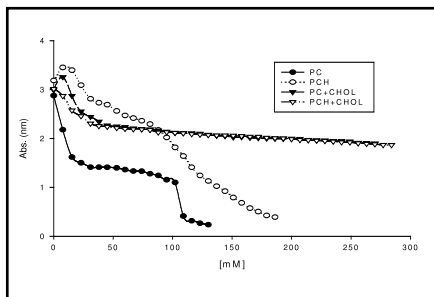


FIG. 4 – Adição de solução de CCTA 50% aos SUVs.

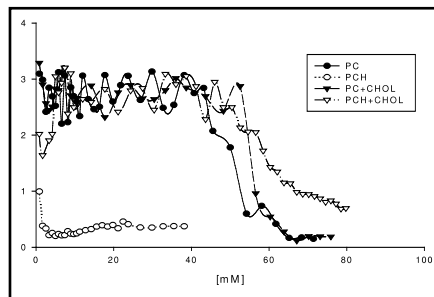


FIG. 5 – Adição de solução de CACG 50% aos SUVs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Monitoramento espectrofotométrico para obtenção de SUV

O monitoramento espectrofotométrico para obtenção de SUV foi realizado em espectrofotômetro UV/VIS Hitachi – mod. U-2000 em 410nm. Os dados apresentados na **Figura 1** mostraram que a absorbância diminuiu com o tempo de sonicação e atingiu valores constantes, indicando que as estruturas de lipossomas formaram-se em aproximadamente 15 minutos.

Adição de tensoativos aos lipossomas

As **figuras 2 a 5** apresentam os efeitos da adição de tensoativos aos SUVs.

DISCUSSÃO

Os lipossomas vêm sendo empregados em terapêutica a mais de 40 anos, apresentando inúmeras vantagens, principalmente relacionadas com a biocompatibilidade, já que apresentam os mesmos constituintes estruturais presentes nas membranas biológicas, principalmente os fosfolipídios.

Inicialmente, foram realizados ensaios de padronização do monitoramento espectrofotométrico em 410nm para avaliação da obtenção de SUVs. O comprimento de onda de 410nm foi escolhido, pois permite observar o espalhamento de luz. Os fosfolipídios não exibem picos de absorção específicos, porém devido à presença de insaturações e de grupos funcionais como carboxila e fosfato, há uma absorção razoável na região de comprimento de onda entre 203-214nm. Como esta região é crítica, pois muitas substâncias são absorvidas nesta faixa, optou-se por acompanhar o espalhamento de luz (Hax & Van Kessel, 1977).

Desse modo, a **Figura 1** representa o acompanhamento por espectrofotometria da absorbância em 410nm para avaliação da obtenção de SUV constituídos por PC, PC/CHOL, PCH, PCH/CHOL à medida que a dispersão lipídica foi submetida ao ultra-som.

Vários trabalhos relatam medidas de turbidez como uma maneira paralela de obter informações sobre o comportamento dos fosfolipídios nas dispersões (Hao *et al.*, 2005;

Matsuzaki *et al.*, 2000; Zuidam & Crommelin, 1995).

Para todas as composições de lipossomas, a adição de tensoativo não iônico e aniônico (**Figuras 2 e 3**) levou a aumento da absorbância em baixas concentrações, com subsequente diminuição, alcançando valores mínimos em concentrações mais elevadas.

A adição de CCTA 50% (**Figura 4**), para todas as composições de lipossomas, exceto para lipossomas compostos somente por PC, levou também a um aumento da absorbância em baixas concentrações, com subsequente diminuição, alcançando valores mínimos em concentrações mais elevadas.

A adição de CACG 50% (**Figura 5**) em lipossomas compostos por PC e PCH, todavia, não apresentou aumento inicial da absorbância. Já em lipossomas compostos por PC/CHOL e PCH/CHOL, a adição de CACG apresentou resultado semelhante ao apresentado para os outros tipos de tensoativos.

Fadda *et al.* (1998) relatam quatro principais passos na interação tensoativo – lipossomas, conforme aumenta a concentração do tensoativo. Inicialmente monômeros do tensoativo são incorporados na bicamada lipídica, aumentando as dimensões da vesícula; os fosfolipídios são gradualmente solubilizados levando à coexistência de lipossomas e micelas mistas; ocorre completa solubilização dos fosfolipídios e, por fim, a presença de micelas mistas somente.

Pelas **Figuras 2 a 5**, nota-se também que, nos lipossomas contendo CHOL, há uma diminuição menos intensa da absorbância, devido ao aumento da rigidez da membrana conferido pelo CHOL, aumentando a estabilidade da bicamada. Lee *et al.* (2005) verificaram que a incorporação de CHOL à bicamada dos lipossomas proporciona uma influência positiva na sua estabilidade, exercendo um maior empacotamento das moléculas fosfolipídicas e induzindo à formação de uma estrutura organizada, mais rígida e com menor mobilidade. Isso parece indicar que lipossomas crescidos

de CHOL são mais estáveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Liu *et al.* (2000), que, por técnicas microcalorimétricas, observaram os efeitos de rigidez conferidos pelo CHOL, aumentando a estabilidade de vesículas lipídicas.

CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais, pode-se concluir que em concentrações mais elevadas, a proporção de tensoativos predomina sobre a de fosfolípido estrutural, formando gradualmente micelas mistas, o que reflete na diminuição da absorvância. Já em lipossomas contendo CHOL, a diminuição de absorvância foi menos intensa devido à maior estabilidade da bicamada proporcionada pelo aumento da rigidez da membrana.

REFERÊNCIAS

1. Fendler, J.H. Membrane Mimetic Chemistry. New York: Wiley-Interscience, 1982.
2. Oliveira, A.G. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. *Cad. Farm.* 1993 (9): 71-76.
3. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e cosméticas, novas perspectivas. *Infarma* 1992 1(3): 20-23.
4. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V.; Leite, C.Q. Lipossomas: estratégia biotecnológica para liberação controlada de fármacos com efeito antimicrobacteriano. *Rev. Ciênc. Farm.* 1997 18(1): 109-121.
5. Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces. 2nd.ed. San Diego: Academic Press, 1991.
6. Lasic, D.D.; Martin, F.J. Liposomes. *Farm. Vestn.* 1989 (40): 197-208.
7. Gulati, M.; Grover, M.; Singh, S.; Singh, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int. J. Pharm.* 1998 (165): 129-168.
8. Puisieux, F.; Benita, S. Les liposomes: problèmes technologiques. *Bull. Soc. Pharm.* 1984 (123): 111-126.
9. Magdassi, S. Delivery systems in cosmetics. *Colloid and Surfaces A* 1997 (123-124): 671-679.
10. Hayward, J.A.; Smith, W.P. Potential of liposomes in cosmetic science. *Cosm. Toil.* 1990 105(7): 47-54.
11. Suzuki, K.; Sakon, K. The application of liposomes to cosmetics. *Cosm. Toil.* 1990 105(5): 65-78.
12. Di Salvo, R.M. Controlando o surgimento da celulite. *Cosm. Toil.* 1996 8(4): 56-62.
13. Citeresi, U.; Sciacchitano, M. Phospholipid/active ingredient complexes. *Cosm. Toil.* 1995 110(11): 57-68.
14. Egbaria, K.; Weiner, N. Topical application of liposomal preparations. *Cosm. Toil.* 1991 106(3): 79-93.
15. Fadda, A.M.; Baroli, B.M.; Maccioni, A.M.; Sinico, C.; Valenti, D.; Alhaique, F. Phospholipid-detergent systems: effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. *II Farmaco* 1998 (53): 650-654.
16. Rieger, M.M. Surfactant encyclopedia. Wheaton: Allured Publishing, 1993.
17. Ribosa, I.; Garcia, M.T.; Parra, J.L.; Maza, A.; Sanchez-Leal, J.; Trullas, C.; Tsi, A.; Balaguer, F.; Pelejero, C. Physico-chemical modifications of liposome structures through interaction with surfactants. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1992 (14): 131-149.
18. Khlebtsov, B.N.; Kovler, L.A.; Bogatyrev, V.A.; Khlebtsov, N.G.; Shchyogolev, S.Y. Studies of phosphatidylcholine vesicles by spectroturbidimetric and dynamic light scattering methods. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2003 (79-80): 825-838.
19. Nacka, F.; Cansell, M.; Gouygou, J.P.; Gerbeaud, C.; Méléard, P.; Entressangles, B. Physical and chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions. *Colloid Surfaces B* 2001 (20): 257-266.
20. Sivakumar, P.A.; Rao, K.P. Polymerized (ethylene glycol) dimethacrylate-cholesterol methyl methacrylate liposomes: preparation and stability studies. *React. Funct. Polym.* 2001 (49): 179-187.
21. Mobed, M.; Chang, T.M.S. Comparison of polymerically stabilized PEG-grafted liposomes and physically adsorbed carboxymethylchitin and carboxymethylglycolchitin liposomes for biological applications. *Biomaterials* 1998 (19): 1167-1177.
22. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Sugishita, K.; Yoneyama, S.; Akada, K.; Ueha, M.; Nakamura, A.; Kobayashi, S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim. Biophys. Acta* 2000 (146): 219-226.
23. Hax, W.M.A.; Van Kessel, W.S.M.G. High performance liquid chromatographic separation and photometric detection of phospholipids. *J. Chromatogr* 1977 (142): 735-741.
24. Hao, Y.L.; Deng, Y.J.; Chen, Y.; Wang, X.M.; Zhong, H.J.; Suo, X.B. In vitro and in vivo studies of different liposomes containing topotecan. *Arch. Pharm. Res.* 2005 28(5): 626-35, 2005.
25. Zuidam, N.J.; Crommelin, D.J.A. Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-liposomes upon hydrolysis. *Int. J. Pharm.* 1995 (126): 209-217.
26. Lee, S.C.; Lee, K.E.; Kim, J.J.; Lim, S.H. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. *J. Liposome Res.* 2005, 15(3-4): 2005.
27. Liu, D.Z.; Chen, W.Y.; Tasi, L.M.; Yang, S.P. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloid Surfaces A* 2000 (172) p.57-67.

Endereço para correspondência

Marlus Chorilli
Faculdade de Ciências da Saúde – Curso de Farmácia
Universidade Metodista de Piracicaba
Rodovia do Açúcar, km 156 – Campus Taquaral – CEP 13400-911 – CP 88
E-mail: mlchoril@unimep.br