

# Estudo da estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína por turbidimetria

## Stability study of small unilamellar liposomes with caffeine by turbidity

Marlus Chorilli<sup>1,2</sup>, Thereana Cristina Rimério<sup>2</sup>, Anselmo Gomes de Oliveira<sup>2</sup> & Maria Virgínia Scarpa<sup>2</sup>

**RESUMO** – Os lipossomas são estruturas compostas por fosfolipídios como fosfatidilcolina de soja (PC) e fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH). Dentre os métodos usados para verificação da estabilidade dos lipossomas, o método turbidimétrico tem sido largamente utilizado. O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos constituídos por PC ou PCH acrescidos ou não de colesterol (CHOL) e contendo cafeína (CAF) por turbidimetria. Os lipossomas foram estocados a 30°C durante 90 dias e periodicamente foram realizadas leituras de absorbância por espectrofotometria em 410nm para verificação de possíveis alterações na turbidez. Verificou-se aumento da turbidez com o decorrer do tempo para lipossomas de PC contendo ou não CAF. Na presença de CHOL, maior turbidez foi obtida, provavelmente, refletindo o aumento no tamanho dos lipossomas. Para lipossomas de PCH, a presença de CHOL e CAF não afetou a turbidez sugerindo maior estabilidade física das estruturas. Também, a adição de CAF aos lipossomas não interferiu na estabilidade das preparações de acordo com o método turbidimétrico.

**PALAVRAS-CHAVE** – Lipossomas, cafeína, estabilidade, turbidez.

**SUMMARY** – Liposomes are structures composed by phospholipids as soy phosphatidylcholine (PS) and soy hydrogenated phosphatidylcholine (PSH). Among the used methods to liposome's stability, turbidity method is widely used. The objective of this work was to study the liposome's stability containing PC or PSH with and without cholesterol (CHOL) containing caffeine (CAF) by turbidity method. Liposomes were stored at 30°C during 90 days and checks the absorbance by spectrophotometry in 410nm to verify possible turbidity alterations. As time goes by turbidity increases occurred to PC liposomes with or without CAF. In the CHOL presence, bigger turbidity was obtained probably reflecting an increase in the liposome's size. To PCH liposomes, the CHOL and CAF presence didn't affect the turbidity, suggesting a bigger physical stability in the structures. Also, the CAF addition to liposomes didn't modify the preparations stability in accordance to turbidity method.

**KEYWORDS** – Liposomes, caffeine, stability, turbidity.

### INTRODUÇÃO

Lipossomas podem ser definidos como estruturas esféricas, fechadas, nas quais uma ou várias membranas concêntricas, compostas por moléculas de fosfolipídios, encapsulam uma fase aquosa em seu interior. As moléculas de fosfolipídios, quando em contato com excesso de água, geralmente se agregam espontaneamente para formar bicamadas, que se fecham sobre si mesmas formando estruturas esféricas onde uma ou várias bicamadas fosfolipídicas englobam parte do solvente no seu interior. Seu tamanho pode variar de cerca de 20nm até algumas dezenas de µm e a espessura da membrana é de aproximadamente 4-5nm (Lasic & Martin, 1989).

Segundo Mozafar (2005), os lipossomas podem ser classificados em três principais grupos:

- lipossomas multilamelares (MLV) – formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos, com diâmetro entre 400 a 3.500nm;
- lipossomas unilamelares pequenos (SUV) – são os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, cons-

tituídos por apenas uma bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso, com diâmetro variando de 20 a 50nm;

- lipossomas unilamelares grandes (LUV) – são constituídos por apenas uma bicamada, mas com grande cavidade aquosa, apresentando diâmetro entre 200 a 1.000nm.

Na preparação de lipossomas, as principais matérias-primas utilizadas são os fosfolipídios, principalmente a fosfatidilcolina, geralmente obtida da soja, e os esteróides, entre eles o colesterol.

Com o propósito de aumentar a estabilidade das membranas lipídicas, pode-se empregar fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) ou colesterol às formulações lipossomais. Pietzyk & Henschke (2000) citam que a PCH é menos susceptível à degradação por oxidação.

O colesterol é um esteróide encontrado nas membranas animais, podendo ser utilizado na preparação de lipossomas com o objetivo de melhorar as características da bicamada (Lehninger *et al.*, 2000). Fornovi *et al.* (1989) mencionam que, como o colesterol apre-

Recebido em 14/4/2007

<sup>1</sup>Curso de Farmácia – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Metodista de Piracicaba

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – FCFAR/UNESP

senta propriedades lipofílicas, ele orienta-se na bicamada lipídica entre as moléculas de fosfolípido com o grupo hidroxila dirigido para a fase aquosa e o anel tricíclico ancorado entre os carbonos das cadeias graxas, resultando num efeito de empacotamento de moléculas na bicamada (Fornés & Procópio, 1987). Além disso, modula a fluidez da membrana fosfolipídica, reduzindo a permeabilidade através da bicamada e melhorando a estabilidade na presença de fluídos biológicos (Weiner *et al.*, 1989).

A estabilidade de uma preparação de lipossomas é determinada, em parte, pelos fosfolípidos. Assim, fosfolípidos que contêm duplas ligações são mais sensíveis a peroxidação e, portanto, são mais instáveis (Fornóvi *et al.*, 1989).

Grit *et al.* (1989) atentam para o fato de que a decomposição química dos fosfolípidos (hidrólise ou oxidação) causa instabilidade física das dispersões de lipossomas, visto que os fosfolípidos podem ser hidrolisados a lisofosfolípidos, que estão sujeitos a hidrólise, originando 2-lisofosfolípido (Miguel *et al.*, 1999).

Diversos autores relatam que a medida de turbidez e determinação do tamanho dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz (*light scattering*) são técnicas utilizadas para avaliar a estabilidade de lipossomas (Khlebtsov *et al.*, 2003; Nacka *et al.*, 2001; Sivakumar & Rao, 2001; Mobed & Chang, 1998). Alguns autores ao caracterizarem opticamente lipossomas por espalhamento dinâmico de luz e por turbidez concluíram que, embora a turbidez seja um método menos sensível, é superior ao espalhamento dinâmico de luz para o estudo da estabilidade de lipossomas (Matsuzaki *et al.*, 2000).

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).

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 lípidos, 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).

A utilização de lipossomas na atenuação da lipodistrofia ginóide (LG), conhecida popularmente como celulite, tem se intensificado nos últimos tempos. Dos vários recursos utilizados para a prevenção e tratamento da celulite, tem-se a mesoterapia. Todavia, por se tratar de uma técnica invasiva, busca-se recursos que potencializem os tratamentos tópicos e que não sejam invasivos, como os lipossomas (Rossi & Vergnanini, 2000).

A LG configura-se como uma alteração do relevo

cutâneo, que ocorre principalmente em mulheres, nas regiões da cintura pélvica, membros inferiores e abdome, caracterizada por um aspecto acolchoado e em casca de laranja da pele (Rossi & Vergnanini, 2000).

Para Lotti *et al.* (1990), as mudanças patológicas decorrentes da LG são edemas, alargamento dos vasos linfáticos na derme e um aumento no volume de células adiposas.

Estudos de Rosenbaum *et al.* (1998) apontam para a anatomia topográfica do tecido adiposo como uma das prováveis causas da LG, destacando-se o limite derme-hipoderme e a fáscia superficial. Em mulheres, o limite derme-hipoderme é irregular e os septos de tecido conjuntivo formam vigas verticais. Dessa forma, se houver hipertrofia da hipoderme, ocorrerá a formação de herniações para a derme reticular, resultando no aspecto "casca de laranja" na pele. Tais diferenças estruturais na fáscia superficial são determinadas por hormônio sexual feminino estrógeno (Rosenbaum *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 1997).

A utilização de lipossomas na prevenção e tratamento da LG baseia-se no fato de que a diminuição seletiva e bem sucedida dos depósitos de células de gordura, via liberação tópica, exige o carreamento da substância ativa, para que seja obtida concentração mais elevada na área de depósito adiposo onde se procura obter a lipólise. Essa liberação pode, teoricamente, ser auxiliada pelo uso de lipossomas, visando à ação na camada da hipoderme (Di Salvo, 1996).

Dentre as substâncias empregadas no tratamento da LG, destaca-se a cafeína. Estudos experimentais indicaram que a cafeína atua por inibição da enzima fosfodiesterase, a qual induz a degradação de AMPc transformando-o em 5'AMP inativo, proporcionando a manutenção da taxa de AMPc. A disponibilidade de AMPc ativa a proteinoquinase A e conseqüentemente a lipase hormônio sensível (LHS), induzindo à lipólise através da mobilização de ácidos graxos e glicerol (Murphy *et al.*, 1998; Beavo *et al.*, 1970).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a estabilidade de SUVs contendo cafeína por turbidimetria.

## MATERIAL E MÉTODOS

### - Obtenção dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5  $\mu = 0,1$ . Os anfifílicos estruturais (fosfatidilcolina de soja (PC) e fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH)) foram empregados nas concentrações de 40mM e 34mM e o volume de cada preparação foi de 5mL. A composição da bicamada lipídica dos lipossomas também incluiu colesterol (CHOL).

A Tabela I apresenta as composições dos lipossomas obtidos.

### • Formação do filme lipídico

Em tubo de sonicação foram pesadas quantidades adequadas de PC ou PCH, CHOL e CAF, dependendo da composição do lipossoma, os quais foram dissolvidos em clorofórmio. A evaporação do solvente foi realizada sob uma corrente de gás nitrogênio, promovendo a formação de filme lipídico nas paredes do tubo. Para assegurar a total remoção do clorofórmio, o tubo com o filme lipídico permaneceu em dessecador à vácuo por 2 horas.

**TABELA I**  
Composições dos lipossomas obtidos

Preparações de lipossomas	PC	PCH	CHOL	CAF
1	40mM	-	-	-
2	40mM	-	-	30mg/mL
3	34mM	-	6mM	-
4	34mM	-	6mM	30mg/mL
5	-	40mM	-	-
6	-	40mM	-	30mg/mL
7	-	34mM	6mM	-
8	-	34mM	6mM	30mg/mL

#### • Hidratação e dispersão do filme lipídico

Após ser retirado do dessecador, o tubo contendo o filme lipídico foi hidratado com 5mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5  $\mu = 0,1$  durante 30 minutos. A dispersão foi agitada em vórtex por um minuto a cada 10min, até desprendimento total do filme.

#### • Padronização do monitoramento espectrofotométrico para avaliação da obtenção de lipossomas unilamelares pequenos (SUVs)

Após a hidratação, a dispersão foi sonicada em sonificador Sonicator – *Ultrasonic Liquid Processor, Heat Systems* – Mod. XL 2020, potência nominal de 400W. O protocolo de obtenção de SUV foi acompanhado por medidas de espalhamento de luz em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410nm com o objetivo de padronizar o tempo necessário para a formação de SUV. Assim, as amostras foram sonicadas durante um minuto e em seguida lidas em espectrofotômetro, repetindo-se tal procedimento até os valores de absorbância tornarem-se constantes, obtendo-se assim um patamar, o qual indica a obtenção de SUV. Devido à presença de resíduos de titânio obtidos pela sonicação, a dispersão de SUV foi submetida à centrifugação a 3500 rpm, utilizando rotor H400 com raio de 14,9cm (2039 x g), 25°C, durante 10min para a remoção dos mesmos.

#### Estudo de estabilidade dos lipossomas

#### • Avaliação da integridade dos lipossomas através de método turbidimétrico

Amostras das diferentes composições de lipossomas

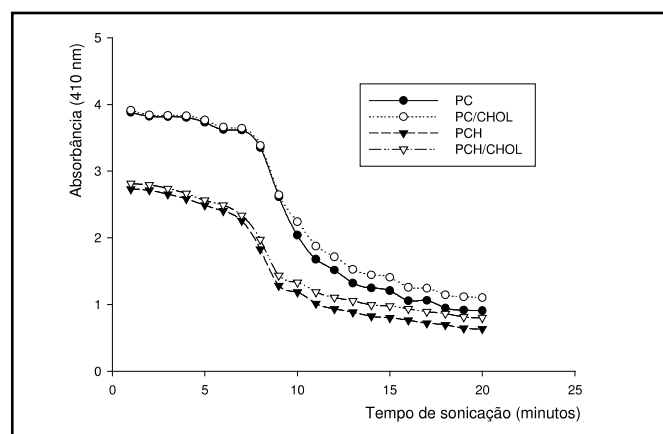


FIG. 1 - Monitoramento espectrofotométrico em 410nm para avaliação da obtenção de SUV isentos de CAF: PC 40mM, PC 34mM/CHOL 6mM, PCH 40 mM e PCH 34mM/CHOL 6mM após período de sonicação (sonicação com potência nominal de 400W).

foram preparadas por sonicação e adequadamente diluídas em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5  $\mu = 0,1$ . Assim, 200 $\mu$ L da dispersão de lipossomas compostos por PC e PC/CAF e 50 $\mu$ L da dispersão de lipossomas contendo PC/CHOL e PC/CHOL/CAF foram adicionados a 2mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5  $\mu = 0,1$ . Para lipossomas compostos por PCH, as diluições foram as seguintes: 500 $\mu$ L de dispersão de lipossomas compostos por PCH, 100 $\mu$ L de dispersão de lipossomas compostos por PCH/CHOL e 50 $\mu$ L daqueles compostos por PCH/CAF e PCH/CHOL/CAF foram adicionados a 2mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5  $\mu = 0,1$ .

As diferentes composições de lipossomas foram armazenadas em estufa incubadora BOD a 30°C durante 90 dias, sendo que periodicamente alíquotas eram retiradas e a sua absorbância em 410nm verificada utilizando espectrofotômetro UV-VIS, Hewlett Packard, Mod. 8453.

## RESULTADOS

#### - Monitoramento espectrofotométrico para obtenção de SUV

O monitoramento espectrofotométrico para obtenção de SUV isentos de CAF foi realizado em espectrofotômetro UV/VIS Hitachi – mod. U-2000 em 410nm. (Figura 1).

A medida espectrofotométrica da absorbância em 410nm também foi utilizada para avaliação da obtenção de SUV com CAF após período de sonicação (Figura 2).

#### Estudo de estabilidade dos lipossomas

#### • Avaliação da integridade dos lipossomas por método turbidimétrico

A Figura 3 avalia a integridade dos lipossomas de PC armazenados a 30°C durante 90 dias em função do tempo (dias),  $\lambda = 410$ nm, utilizando método turbidimétrico.

Já a Figura 4 avalia a integridade dos lipossomas de PCH armazenados a 30°C durante 90 dias em função do tempo (dias),  $\lambda = 410$ nm, utilizando método turbidimétrico.

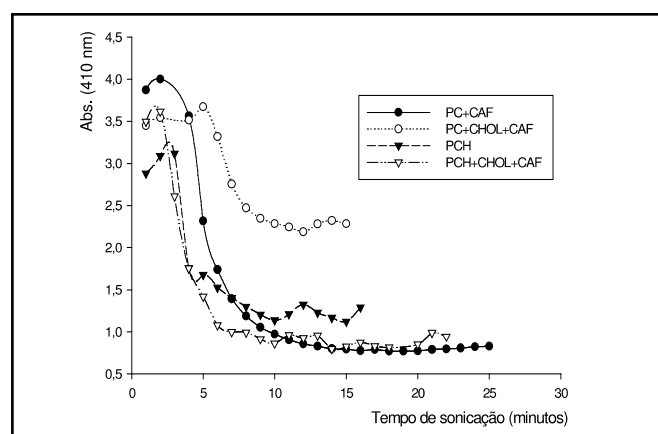


FIG. 2 - Monitoramento espectrofotométrico em 410nm para avaliação da obtenção de SUV contendo CAF: PC 40mM e CAF 30mg/mL; PC 34mM, CHOL 6mM e CAF 30mg/mL; PCH 40mM e CAF 30mg/mL; PCH 34mM, CHOL 6mM e CAF 30mg/mL) após período de sonicação (sonicação com potência nominal de 400W).

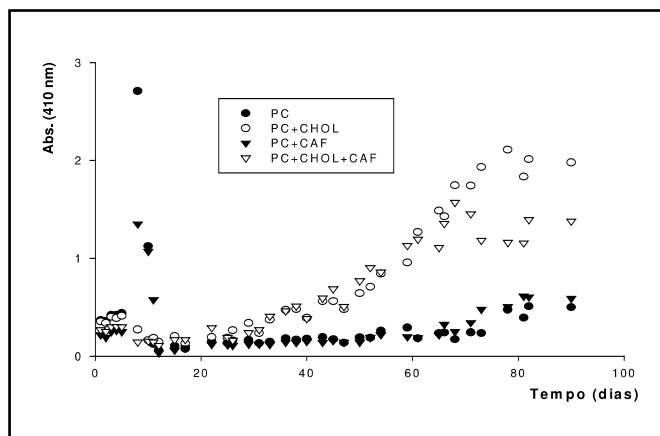


FIG. 3 - Avaliação da integridade das amostras de lipossomas de PC armazenados a 30°C durante 90 dias em função do tempo (dias) por método turbidimétrico em  $\lambda = 410\text{nm}$ : PC 40mM; PC 34mM e CHOL 6mM; PC 40mM e CAF 30mg/mL; PC 34mM, CHOL 6mM e CAF 30mg/mL.

## DISCUSSÃO

Os lipossomas vêm sendo empregados em terapêutica há mais de 40 anos, apresentando inúmeras vantagens, principalmente relacionadas com a biocompatibilidade, já que os lipossomas apresentam os mesmos constituintes estruturais presentes nas membranas biológicas, principalmente os fosfolípidios (Mozafari, 2005).

A concentração de fosfolípidios interfere diretamente na encapsulação de substâncias ativas lipofílicas (Betageri & Parsons, 1992). As concentrações de fosfatidilcolina empregadas neste estudo foram de 30mg/mL ou de 25,5mg/mL, sendo utilizadas PC e PCH. Normalmente, utiliza-se concentrações na faixa de 1 a 100mg/mL, sendo suficientes concentrações entre 10 e 50mg/mL (Maierhofer, 1989).

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. De acordo com Hax & Van Kessel (1977), os fosfolípidios 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.

Desse modo, a Figura 1 representa o acompanhamento por espectrofotometria da absorbância em 410nm para avaliação da obtenção de SUV isentos de CAF e a Figura 2 representa o acompanhamento por espectrofotometria da absorbância em 410nm para avaliação da obtenção de SUV contendo CAF à medida que a dispersão lipídica foi submetida ao ultra-som. Tais resultados mostraram que a absorbância diminuiu com o tempo de sonicação e atingiu valores constantes, indicando que as estruturas de lipossomas formaram-se em aproximadamente 15min para SUVs isentos de substância ativa e em aproximadamente 10min para SUVs contendo CAF. Logo, a adição de CAF parece diminuir o tempo de sonicação necessário para obtenção de SUV. Resultados semelhantes foram encontrados por Lima (1998), que verificou diminuição do tempo de sonicação necessário para obtenção de SUV após a adição de diclofenaco sódico nos lipossomas.

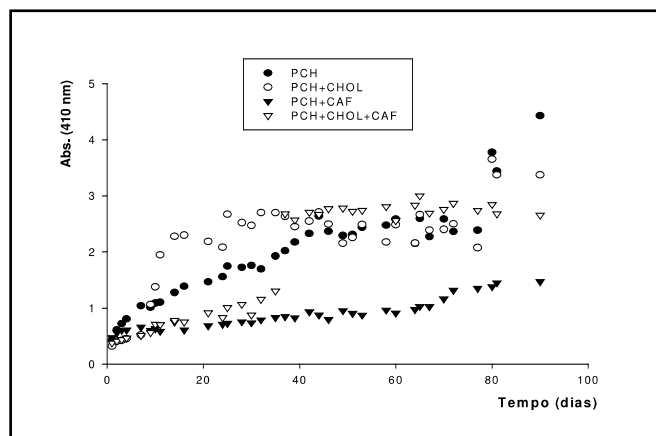


FIG. 4 - Avaliação da integridade das amostras de lipossomas de PCH armazenados a 30°C durante 90 dias em função do tempo (dias) por método turbidimétrico em  $\lambda = 410\text{nm}$ : PCH 40mM; PCH 34mM e CHOL 6mM; PCH 40mM e CAF 30mg/mL; PCH 34mM, CHOL 6mM e CAF 30mg/mL.

Zuidam & Crommelin (1995) também utilizaram medidas de turbidez como uma maneira paralela de obter informações sobre o comportamento dos fosfolípidios nas dispersões.

Pelas Figuras 1 e 2, observa-se que a adição de 15% de CHOL aos lipossomas não acarretou profundas alterações no tempo de formação dos lipossomas. Tal resultado corrobora os de Lima (1998), que não observou alteração do perfil de formação dos lipossomas ao adicionar 5 e 15% de CHOL. Todavia, ao adicionar 25% de CHOL, observou-se aumento no tempo de formação dos lipossomas.

Segundo Lima (1998), fosfolípidios e CHOL são os principais componentes das bicamadas lipídicas das membranas celulares, sendo que o CHOL é um dos principais moduladores das propriedades físicas das membranas. A proporção entre estes componentes e o nível de insaturação dos fosfolípidios determina o estado físico da membrana com relação à sua organização e dinâmica.

Para Long *et al.* (1970), a incorporação de CHOL à bicamada dos lipossomas proporciona uma influência positiva na sua estabilidade, exercendo um maior empacotamento das moléculas fosfolípídicas, aumentando significativamente a temperatura de transição de fase e induzindo à formação de uma estrutura organizada, mais rígida e com menor mobilidade.

Segundo Tirosh *et al.* (1997), uma molécula de CHOL interage com duas moléculas de fosfolípidios, impedindo que estas sofram a transição da fase gel para líquido cristalino. Além disso, tais autores afirmam que nas membranas ricas em colesterol, as moléculas de CHOL estão distribuídas em ambas as monocamadas, entre os fosfolípidios, em um empacotamento bastante fechado, deixando praticamente nenhum volume livre, sendo que quando a concentração de CHOL supera 15mol% ocorre uma diminuição na permeabilidade da bicamada à água.

Em relação aos estudos de estabilidade, Hunt & Tsang (1981) afirmam que os lipossomas constituem sistema inerentemente estável, desde que não submetidos a condições extremas. Logo, a avaliação da integridade dos lipossomas é importante e dentre os métodos utilizados tem-se o turbidimétrico. Assim, lipossomas foram mantidos em estufa incubadora BOD a 30°C durante 90 dias e periodicamente a absorbância foi verificada. Vários trabalhos utilizando os valores de ab-

sorbância para verificar a estabilidade de lipossomas são citados, como o de Paternostre *et al.* (1988), que acompanharam as mudanças na preparação de lipossomas também por medidas de absorbância ao espectrofotômetro.

Segundo Lasic (1997), dentre os parâmetros mais importantes na caracterização de lipossomas tem-se a aparência visual e a turbidez. Diversos autores relatam que a medida da turbidez e a determinação do tamanho dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz (*light scattering*) são técnicas utilizadas para avaliar a estabilidade de lipossomas (Khlebtsov *et al.*, 2003; Nacka *et al.*, 2001; Sivakumar & Rao, 2001; Mobed & Chang, 1998). Para Matsuzaki *et al.* (2000), a turbidez, embora seja um método menos sensível, é superior ao espalhamento dinâmico de luz para o estudo de estabilidade dos lipossomas.

Para Maza & Para (1996, 1994), alterações na turbidez das preparações de lipossomas são devidas a alterações no tamanho (diâmetro) dos mesmos. Para Komatsu & Okada (1995), o aumento de turbidez pode estar relacionado à agregação e/ou fusão de vesículas pequenas sonificadas. Isto permite correlacionar diretamente a turbidez com o diâmetro dos lipossomas na dispersão, independente do fenômeno envolvido.

A **Figura 3** avalia a integridade dos lipossomas de PC armazenados a 30°C durante 90 dias em função do tempo (dias),  $\lambda = 410\text{nm}$ , utilizando método turbidimétrico e a **Figura 4** avalia a integridade dos lipossomas de PCH armazenados a 30 °C durante 90 dias em função do tempo (dias),  $\lambda = 410\text{nm}$ , utilizando método turbidimétrico.

Observou-se pela **Figura 3**, inicialmente, um aumento da turbidez para os lipossomas constituídos por PC. Com o passar dos dias, verificou-se diminuição da absorbância até se atingir praticamente um patamar. Tal perfil de turbidez praticamente indica ruptura dos lipossomas. Há de se salientar que os lipossomas constituídos por PC, por conterem duplas ligações, são mais sensíveis a peroxidação e, portanto, mais instáveis (Fornovi *et al.*, 1989).

Para os lipossomas constituídos por PC/CHOL e PC/CHOL/CAF, não se observou aumento inicial da turbidez, mas um aumento gradual da mesma (**Figura 3**). Tal resultado pode estar relacionado à presença do CHOL. LONG *et al.* (1970) verificaram que a incorporação de CHOL à bicamada dos lipossomas proporciona uma influência positiva na sua estabilidade, exercendo um maior empacotamento das moléculas fosfolípídicas e induzindo à formação de uma estrutura organizada, mais rígida e com menor mobilidade. Isso parece indicar que lipossomas acrescidos de CHOL são mais estáveis. O aumento da turbidez pode estar relacionado, então, a agregação e/ou fusão de vesículas pequenas sonificadas como citado anteriormente.

Observou-se, pela **Figura 4**, aumento gradual da turbidez para todas as composições de lipossomas. Todavia, esse aumento foi menos evidente nas amostras acrescidas de CHOL. Talvez isto tenha ocorrido justamente pelo fator da menor mobilidade proporcionada pelo CHOL na bicamada (Long, 1970). Outro ponto interessante é que não houve aumento inicial da turbidez com posterior queda como para os lipossomas compostos por PC. Isso indica, provavelmente, maior estabilidade deste fosfolípídio. Pietzyk & Henschke (2000) citam que a PCH é menos susceptível à degradação

por oxidação. Além disso, Chou *et al.* (2003) verificaram o efeito da composição na estabilidade de irinotecan encapsulado em lipossomas e concluíram que lipossomas compostos de lipídios com alta temperatura de transição de fase (acima de 60°C), como PCH, foram mais estáveis que aqueles compostos por lipídios com baixas temperaturas de transição de fase, como a fosfatidilcolina do ovo.

## CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais, pode-se concluir que: a padronização do monitoramento espectrofotométrico em 410nm mostrou-se um método eficaz para avaliação da obtenção de SUVs; a adição de CAF parece diminuir o tempo de sonicação necessário para obtenção de SUV; a presença de CHOL na concentração de 15% não alterou o perfil de formação dos lipossomas; o método turbidimétrico mostrou adequado para avaliação da estabilidade dos lipossomas; lipossomas constituídos por PCH apresentaram-se mais estáveis que lipossomas constituídos por PC; a adição de CHOL em lipossomas compostos por PC e PCH, acrescidos ou não de CAF, aumentou a estabilidade dos mesmos; a adição de CAF aos lipossomas não interferiu na estabilidade das preparações de acordo com o método turbidimétrico.

## REFERÊNCIAS

1. Beavo, J.A.; Rogers, N.L.; Crofford, O.B.; Hardman, J.G.; Sutherland, E.W.; Newman, E.V. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5' monophosphate diesterase activity. *Mol. Pharmacol.* 1970 6: 597-603.
2. Betageri, G.V.; Parsons, D.L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int. J. Pharm.* 1992 81: 235-241.
3. Chou, T.H.; Chen, S.C.; Chu, I.M. Effect of composition on the stability of liposomal irinotecan prepared by a pH gradient method. *J. Biosci. Bioeng.* 2003 95(4): 405-408.
4. Di Salvo, R.M. Controlando o surgimento da celulite. *Cosm. Toil.* 1996 8(4): 56-62.
5. Fendler, J.H. *Membrane Mimetic Chemistry*. New York: Wiley-Interscience, 1982.
6. Fornés, J.A.; Procópio, J. Influence of cholesterol on the surface charge density and surface potential of lipid bilayer membranes. *J. Colloid Interf.* 1987 117(2): 570-573.
7. Fornovi, I.R.; Ramón, M.T.G.; Rivera, A.M. Métodos de preparación y caracterización de estructuras liposómicas. *Afinidad* 1989 46(424): 460-466.
8. Grit, M.; Smidt, J.H.; Struijke, A.; Crommelin, D.J.A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int. J. Pharm.* 1989 50: 1-6.
9. Hayward, J.A.; Smith, W.P. Potential of liposomes in cosmetic science. *Cosm. Toil.* 1990 105(7): 47-54.
10. 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.
11. Hunt, C.A.; Tsang, S.  $\alpha$ -tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf-life of liposomes. *Int. J. Pharm.* 1981 8: 101-110.
12. 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.
13. Komatsu, H.; Okada, S. Etanol-induced aggregation and fusion of small phosphatidylcholine liposome: participation of interdigitated membrane formation in their processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1995 1235: 270-280.
14. Lasic, D.D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J. Control. Release* 1997 48: 203-222.
15. Lasic, D.D.; Martin, F.J. Liposomes. *Farm. Vestn.* 1989 (40): 197-208.
16. Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p., p.356-358.
17. Lima, E.M. Estudo da encapsulação do diclofenaco em lipossomas unilamelares e avaliação da toxicidade tissular após administração intramuscular. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade de São Paulo, 1998. 233p.

18. Long, R.A.; Hruska, F.; Gesser, H.D. Membrane condensing effect of cholesterol and the role of its hydroxyl group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970 41 (2): 321-327.
19. Lotti, T.; Ghersetich, I.; Grappone, C.; Dini, G. Proteoglycans in so-called cellulite. *Int. J. Dermatol.* 1990; 29(4): 272-274.
20. Magdassi, S. Delivery systems in cosmetics. *Colloid and Surfaces A* 1997 (123-124): 671-679.
21. Maierhofer, G. *Liposomas: estabilidad, manejo y control de calidad.* Barcelona: Sociedad Española de Químicos Cosméticos, 1989.
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. Maza, A.; Parra, J.L. Changes in phosphatidylcholine liposomes caused by a mixture of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1996 1300: 125-134.
24. Maza, A.; Parra, J.L. Vesicle-micelle structural transition of phosphatidylcholine bilayers and Triton X-100. *Biochem. J.* 1994 303: 907-914.
25. Miguel, I.; Roueche, A.; Betbeder, D. Separation of dipalmitoyl phosphatidylcholine, cholesterol and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a perfluorinated stationary bonded phase. *J. Chromatogr. A* 1999 840: 31-38.
26. 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.
27. Moretti, E.; Schapira, A.; Kaplan, G.; Alonso, E. Estudo macro e microscópico da fáscia superficial em membros inferiores: um conceito diferente sobre a celulite. *Mesoter. Atual*, 1997.
28. Mozafari, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005 10: 711-719.
29. Murray, R.; Granner D.; Mayes, P.; Rodwell, V. Harper: bioquímica. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p.267-68.
30. 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.
31. Oliveira, A.G. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras. *Cad. Farm.* 1993 (9): 71-76.
32. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V. Lipossomas: aplicações farmacêuticas e cosméticas, novas perspectivas. *Infarma* 1992 1(3): 20-23.
33. 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.
34. Paternostre, M.T.; Roux, M.; Rigaud, J.L. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. I. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* 1988 27: 2668-2677.
35. Pietzyk, B.; Henschke, K. Degradation of phosphatidylcholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions. *Int. J. Pharm.* 2000 196: 215-218.
36. Puisieux, F., Benita, S. Les liposomes: problèmes technologiques. *Bull. Soc. Pharm.* 1984 (123): 111-126.
37. Rossi, A. B.; Vergnanini, A. L. Cellulite: a review. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2000 14(4): 251-62.
38. Rosenbaum, M.; Prieto, V.; Hellmer, J.; Boschmann, M.; Krueger, J.; Leibel, R.; Ship, A. An exploratory investigation of the morphology and biochemistry of cellulite. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998 101(7): 1934-1939.
39. 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.
40. Suzuki, K.; Sakon, K. The application of liposomes to cosmetics. *Cosm. Toil.* 1990 105(5): 65-78.
41. Tirosh, O.; Kohen, R.; Katzhendler, J.; Alon, A.; Barenholz, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 1997 87: 17-22.
42. Weiner, N.; Martin, F.; Riaz, M. Liposomes as a drug delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989 15(10): 1523-1554.
43. Zuidam, N.J.; Crommelin, D.J.A. Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-liposomes upon hydrolysis. *Int. J. Pharm.* 1995 (126): 209-217.

*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 - Caixa Postal 68  
 E-mail: mlchoril@unimep.br