

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMAS LIPOSSOMAIS
CONTENDO LEVANA**

Agenor Tavares Jácome Júnior

RECIFE – 2006

Agenor Tavares Jácome Júnior

DESENVOLVIMENTO DE FORMAS LIPOSSOMAIS CONTENDO LEVANA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Áreas de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadores: Prof^a Dra Glícia Maria Torres Calazans

Prof^a Dra Nereide Stela Santos Magalhães

Recife – 2006

Jácome Júnior, Agenor Tavares
Desenvolvimento de formas lipossomais
contendo levana / Agenor Tavares Jácome Júnior. –
Recife : O Autor, 2006.
xx, 67 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Mestrado em Biotecnologia de
Produtos Bioativos, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Lipossomas - Fosfolipídeos. 2. Polissacarídeo
– Levana. 3. Sistema de liberação controlada. 4.
Lipossomas - Câncer – Terapia. I. Título.

577.115
572.57

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-222

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR **AGENOR TAVARES JÁCOME JÚNIOR** AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM **BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 24 DE MARÇO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dr. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR
Departamento de Bioquímica - UFPE



Dra. MARIA DA PAZ CARVALHO DA SILVA
Departamento de Bioquímica - UFPE



Dr. Irapuan de Oliveira Pinheiro
Departamento de Ciências Fisiológicas - UPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

REITOR

Professor Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Professor Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Dr. Celso Pinto de Melo

DIRETORIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Miriam Camargo Guarniere

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Dra. Norma Buarque de Gusmão

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Professora Dra. Ana Maria Souto Maior

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO

Professor Dra. Alexandre José da Silva Góes

***No discernimento entre conhecimento e fé está a
chave para muitos enigmas, pois conhecer e
acreditar são conceitos distintos
(Autor Desconhecido)***

Dedico esta dissertação

*Aos meus pais
Agenor Tavares Jácome
e Maria Dalva Jácome
que sempre acreditaram em meus ideais e
nunca me desampararam.*

*Á Paula Luna por todo o amor, compreensão e
companheirismo*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu infinito amor e misericórdia através de Jesus Cristo (a mais alta expressão do ato de amar). Na presença Dele, os dias de tristeza servem mais para destacar a imensa glória e honra com que vai nos brindar. O temor ao Senhor é o princípio da sabedoria.

À Profa. Dra. Glícia Maria Torres Calazans por ter acreditado na minha pessoa e ter fornecido a orientação necessária para realização desse trabalho. Também sou grato por sua amizade, paciência, conselhos e incentivos, que para mim foram, e ainda são, de grande valia.

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães a qual me iniciou na carreira científica. Tenho profunda admiração pelo seu trabalho e sempre procuro recompensá-la pelo conhecimento adquirido.

Ao Pesquisador (agora recém professor da UPE) Irapuan Oliveira Pinheiro, um cientista nato que me ensinou a ter criatividade e praticidade dentro do conhecimento científico, como também pela sua inestimável participação em uma das etapas dessa dissertação.

À pesquisadora Noemia Pereira dos Santos por sua amizade e contribuições técnicas científicas na área de nanotecnologia.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, seu exemplo como pesquisador, professor e pessoa, bem como os seus incentivos, foram os grandes responsáveis pela minha decisão de seguir a carreira acadêmico-científica.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, pelo apoio e incentivo.

À Profª Dra. Silene Carneiro do Nascimento, Chefe do Departamento de Antibióticos – UFPE, por gentilmente ceder os laboratórios do DANTI para a realização de parte dessa dissertação.

Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, que, através de sua experiência, me ensinou que o sucesso de um experimento não está apenas em condições operacionais favoráveis, mas no conhecimento profundo de todas as variáveis nele envolvidas.

Aos Professores do Departamento de Antibióticos: Profa. Dra. Janete Magali, Profa. Dra. Fátima Queiroz, Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior, Prof. Dr. Carlos Edison Lopes, Prof. Dr. Alexandre Goes, Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, Profa. Dra. Suely Lins Galdino, Profa. Dra. Norma Gusmão; Profa Dra. Eugênia Rios e Profa. Dra Eulália Ximenes que contribuíram para a minha formação no programa de mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos.

À Profa Dra. Fátima Queiroz por todo incentivo e ajuda fornecidos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, Departamento de Física/UFPE, coordenado pelo Prof. Dr. Celso Pinto de Melo, em especial ao doutorando César Andrade e ao técnico Clécio por todo o auxílio prestados na determinação do tamanho de partícula e potencial zeta.

À Profa Dra. Ester Gouveia e Profa Dra. Marcia Nascimento, por tão gentilmente ter disponibilizado o Cromatógrafo para o doseamento e determinação da taxa de encapsulação.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, Suzete Mendonça, Maria Rodrigues, Salatiel Santana, Ângela Rodrigues, Fátima Regina, Alberto, Lucilene, Orlando Silva, e os funcionários do LIKA, Otaviano Costa, Moises, Luiz Felipe Wanderley, Maria Helena Madruga, Rafael, Sergio, Izabel, Conceição e Ilma por todo o auxílio técnico prestado.

Aos meus pais, Agenor Tavares Jácome e Maria Dalva Jácome, e a minha namorada, Paula Luna, aos quais eu dedico esse trabalho.

À minha família, Carla, Claudia, Neuza e Vovó Antonia, por terem intercedido por mim durante esses 2 anos de mestrado. As orações delas foram de extrema importância para mim.

Às alunas de iniciação científica, Clarissa Franco Torres e Taciana Lima Salviano, pela colaboração mútua para a realização desse projeto.

Aos colegas do SLC/LIKA, Marcela, Mariane, Marigilson, Cinthia, Mozart e Paula pela amizade e companherismo demonstrados a longo de todos esses anos.

Aos alunos do SLC/LIKA, Cícero, Dáfila, Fábio e André por toda a amizade e cooperação.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, Givanildo, Ian, Fernando, Ricardo, Cynthia, Erika, Sérgio, Talita, David e Diego pela cooperação e pelos bons momentos de descontração.

Aos colegas do LPF, em especial Marcela Oliveira, Marcela Clementino, Ageu, Felipe, Rogério, Fernando, Vanda, Rita, Cynthia Souza, Edelvio e Erick pela amizade e cooperação.

À Maria Suely Cavalcanti pelas inestimáveis contribuições.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xviii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	
Geral	4
Específicos	4
CAPÍTULO 1	
REVISÃO DA LITERATURA	
1.1 Polissacarídeos	6
1.2 Levana	9
1.3 Fracionamento da levana nativa	11
1.4 Uso de microondas na otimização do tempo de hidrólise de levana	13
1.5 Nanomedicina e Sistemas de Liberação Controlada	15
1.6 Lipossomas	16
CAPÍTULO 2	
MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Biosseparação	21
2.1.1 Precipitação fracionada da levana nativa.	21
2.1.2 Hidrólise ácida	22
2.2 Preparação e caracterização das formas lipossomais	23
2.2.1 Obtenção de lipossomas pelo método da formação de filme lipídico	23

2.2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade dos lipossomas	25
2.2.3 Estudos de Liberação <i>in vitro</i>	26
2.3. Doseamento da levana e eficiência de encapsulação nos lipossomas	26
2.3.1 Considerações	26
2.3.2 Doseamento da levana na preparação lipossomal	28
2.3.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Levana	30
CAPÍTULO 3	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Biosseparação	32
3.1.1 Histogramas de distribuição das frações de levana	32
3.2. Preparação e caracterização das formas lipossomais	38
3.2.1 Obtenção de lipossomas pelo método da formação de filme lipídico	38
3.2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade dos lipossomas	38
3.2.3 Estudos de Liberação <i>in vitro</i>	43
3.3. Doseamento da levana e eficiência de encapsulação nas formas Lipossomais	45
3.3.1 Doseamento da levana na preparação lipossomal	45
3.3.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Levana	50
CAPÍTULO 4	
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação de uma vesícula lipossomal unilamelar. <http://www.bioteach.ubc.ca> 16
- Figura 2.** Localização de drogas, de acordo com a sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, nos lipossomas. <http://blog.case.edu/.../2005/09/05/liposome1> 17
- Figura 3.** Esquema do processo de fabricação de lipossomas unilamelares pelo método de formação do filme lipídico seguido de sonicação (Amselen *et al.*, 1990). MLV = Multilamellar Vesicles (vesículas multilamelares). SUV = Small Unilamellar Vesicles (vesículas unilamelares pequenas). 23
- Figura 4.** Histograma de distribuição das frações mássicas, presentes na levana nativa, obtidas por precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $12,86 \pm 2,8\%$. 32
- Figura 5.** Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida a hidrólise ácida em forno microondas (1 minuto), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $12,17 \pm 3,74\%$. 33
- Figura 6.** Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida a hidrólise ácida em forno microondas (1,5 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $34,81 \pm 4,13\%$. 33
- Figura 7.** Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida a hidrólise ácida em forno microondas (2 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $42,21 \pm 14,43\%$. 34
- Figura 8.** Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida a hidrólise ácida em forno microondas (2,5 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $60,93 \pm 5,79\%$. 34
- Figura 9.** Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida a hidrólise ácida em forno microondas (3 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $72,83 \pm 5,07\%$. 35

- Figura 10.** Variação de pH das formas lipossomais durante 180 dias. Experimentos realizados em triplicata. **39**
- Figura 11.** Determinação do tamanho de partícula da formulação LL0 (sem a levana). O gráfico é bimodal indicando a presença de duas populações de lipossomas, com tamanho de partícula de $37,46 \pm 8,92$ nm e $143,37 \pm 52,01$ nm. A primeira e a segunda população representam 15,94% e 84,06%, respectivamente. Experimento realizado em triplicata. **41**
- Figura 12.** Determinação do tamanho de partícula da formulação LL3 (5 mg/mL). O gráfico é bimodal indicando a presença de duas populações de lipossomas, com tamanho de partícula de $38,23 \pm 12,4$ nm e $143,17 \pm 60,24$ nm. A primeira e a segunda população representam 19,72% e 80,28%, respectivamente. Experimento realizado em triplicata. **41**
- Figura 13.** Determinação do Potencial Zeta da formulação lipossomal LL0 (sem levana). O gráfico é unimodal. A carga efetiva da formulação é de $+23,03 \pm 0,69$ mV. **42**
- Figura 14.** Cinética de Liberação in vitro da levana contida em formas lipossomais numa concentração de 20mg/mL. **44**
- Figura 15.** Gráfico da velocidade de liberação da levana contida em formas lipossomais. **45**
- Figura 16.** Cromatograma da Levana Padrão (Sigma) produzida pela *Erwinia herbicula*, utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Presença de 2 picos. **46**
- Figura 17.** Cromatograma de levana produzida pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C, utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Presença de um único pico. **46**

- Figura 18.** Curva de calibração da levana produzida pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C. **46**
- Figura 19.** Cromatograma da fosfatidilcolina de soja (TR = 4,86 minutos) utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Segundo pico (TR = 17,743) é do metanol utilizado como diluente da fosfatidilcolina de soja. **47**
- Figura 20.** Cromatograma do tampão PBS (TR = 7,23 minutos) utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. **47**
- Figura 21.** Curva Padrão da D-frutose **49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de formulações testadas e suas respectivas concentrações de levana.	23
Tabela 2. Tempos de hidrólise para obtenção das frações com baixo pesos moleculares.	36
Tabela 3. Avaliação da estabilidade acelerada das formulações lipossomais contendo diferentes concentrações de levana. Experimentos realizados em triplicata.	38
Tabela 4. Distribuição bi-modal de tamanho de partícula das formulações lipossomais. Experimento em triplicata.	42
Tabela 5. Determinação do Potencial Zeta das formulações lipossomais.	43
Tabela 6. Comparação de tempos de retenção de diferentes lotes de fração 70 de levana produzida por <i>Zymomonas mobilis</i> ZAG-12 25°C. Experimento em triplicata.	48
Tabela 7. Doseamento da levana encapsulada em formas lipossomais. Experimento em triplicata.	48
Tabela 8. Determinação do melhor tempo para hidrólise total, em banho maria, da fração 70 de levana produzida por <i>Zymomonas mobilis</i> ZAG-12 25°C. Experimento em triplicata.	49
Tabela 9. Doseamento da frutose constituinte de levana encapsulada em formas lipossomais. Concentração inicial de frutose foi de 300 nmol/mL Experimento em triplicata.	50
Tabela 10. . Doseamento por CLAE da levana não encapsulada. Experimento em triplicata.	50

- Tabela 11.** Doseamento pelo método colorimétrico da frutose constituinte da levana não encapsulada. Concentração inicial de frutose foi de 300 nmol/mL Experimento em triplicata. **51**
- Tabela 12.** Determinação da Eficiência de Encapsulação utilizando CLAE para dosagem de levana. Experimento em triplicata. **51**
- Tabela 13.** Determinação da Eficiência de Encapsulação utilizando método colorimétrico para dosagem de frutose constituinte da levana. Experimento em triplicata. **51**
- Tabela 14.** Análise Comparativa entre as Eficiências de Encapsulação calculadas a partir dos métodos cromatográfico (CLAE) e colorimétrico. Experimento em triplicata. **51**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ART = Açúcares Redutores Totais

CH = Colesterol

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CV = Coeficiente de Variância

DP = Desvio Padrão

DNSA = Dinitro-Salicilic Acid (Ácido Dinitro-Salicílico)

F-10 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 10%(p/p)

F-20 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 20%(p/p)

F-30 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 30%(p/p)

F-40 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 40%(p/p)

F-50 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 50%(p/p)

F-60 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 60%(p/p)

F-70 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 70%(p/p)

F-80 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 80%(p/p)

F-90 = Fração de levana total precipitada com solução hidroalcoólica a 90%(p/p)

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

Lev-LIPO = Lipossomas contendo levana

LPF = Laboratório de Processos Fermentativos

LUV = Large Unilamellar Vesicles (Vesículas unilamelares grandes)

MLV = Multilamellar Vesicles (Vesículas Multilamelares)

nRIU x s = Nano Unidades de Índice de Refração vezes segundo

S-180 = Sarcoma 180

SA = Estearilamina

SLC = Sistema de Liberação Controlada

SUV = Small Unilamellar Vesicles (Vesículas unilamelares pequenas)

TE = Taxa de Encapsulação (ou eficiência de encapsulação).

RESUMO

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de formas lipossomais contendo levana (Lev-LIPO) com potencial ação antitumoral e imunomoduladora na terapia contra o câncer. Lev-LIPO foram obtidos pelo método de formação do filme lipídico. Análises físico-químicas foram realizadas imediatamente após a preparação dos lipossomas. Adicionalmente, testes de estabilidade acelerada e em longo prazo foram realizados. O tamanho de partícula e a carga de superfície foram determinados utilizando contador de partículas zetasizer[®]. A quantidade de levana incorporada nos Lev-LIPO foi determinada após solubilização dos mesmos com metanol (1:1), extração e hidrólise ácida da levana para doseamento da frutose constituinte, por espectrocolorimetria a 530 nm, ou doseamento da levana, diretamente, por CLAE, usando detector de índice de refração, para análise comparativa entre os dois métodos. A eficiência de encapsulação foi determinada após ultrafiltração-centrifugação. O perfil de liberação *in vitro* da levana a partir de Lev-LIPO foi determinado utilizando o método de diálise. Lev-LIPO tendo concentrações de levana até 1,8 mg/mL apresentaram um aspecto opalescente, leitoso, com brilho azulado, mantendo as características iniciais por mais de 180 dias quando armazenadas a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Lev-LIPO apresentou um tamanho de partícula igual a $145 \pm 75,01$ nm. O potencial zeta dos Lev-LIPO tende a diminuir a medida que se aumenta a concentração da levana na formulação, variando de 21,33 (1 mg/mL) até 2,51 mV (20 mg/mL). A eficiência de encapsulação foi de $87,59 \pm 1,21\%$ por espectrocolorimetria e de $88,67 \pm 1,69\%$ por CLAE. A cinética de liberação da levana apresentou um efeito de rajada de $10,59 \pm 3,49\%$ na primeira hora, seguida por uma liberação lenta e controlada do produto bioativo, com velocidade constante de 0,27 mg/h na segunda fase (8 – 72 horas). A levana encapsulada se difundiu no meio após 96 horas ($98,70 \pm 0,85\%$). O desenvolvimento de lipossomas estáveis contendo levana é um passo importante no desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica para a terapia do câncer.

ABSTRACT

The present study proposes the manufacture of liposomes containing levan as an antitumor and immunomodulator for the cancer therapy. Levan-loaded liposomes (Lev-LIPO) were prepared according to the thin film formed method. Physicochemical characterization was performed immediately after their preparation. Additionally, both accelerated and long-term stability testing of Lev-LIPO were carried out. The size distribution and surface charge of particles were determined using a zetasizer[®]. The assessment of levan content into liposomes was performed after the extraction of levan from liposomes with methanol and acid hydrolysis yielding fructose constituents, which were detected by spectrophotometry at 530 nm, and HPLC, using Refraction Index Detector, to make a comparative analysis each other. The encapsulation ratio of levan into liposomes was determined in the filtrate after ultrafiltration by centrifugation of samples. The *in vitro* release profile of Lev-LIPO was evaluated using dialysis method. Lev-LIPO (1.8 mg/ml) presented a bluish milky opalescent appearance and maintained its initial characteristics over 180 days when stored at 4°C ± 1°C. Lev-LIPO had a mean diameter of 145 ± 75 nm. The Lev-LIPO Zeta potential decreased (21.33 to 2.51 mV) when levan content was increased. The encapsulation ratio of levan into liposomes was 87.6 ± 1.2% determined by spectrophotometry and 88.67 ± 1.69% by HPLC. The *in vitro* kinetics of Lev-LIPO showed an initial burst of 10.59 ± 3.49% at the first hour followed by a slow and controlled drug release during the second stage (8 – 72 h) with 0.27 mg/h rate. The loaded levan amount diffused out (98.70 ± 0.85 %) within 96 h. Lev-LIPO suggest a potential drug delivery system that can be used in the cancer therapy.

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são os polímeros naturais, biodegradáveis, mais abundantes da biosfera. Constituem a maior parte da matéria orgânica do planeta, ocorrendo em quase todos os seres vivos, onde exercem múltiplas funções (Whistler & Corbett, 1957; Bobbio & Bobbio, 1989; Glazer & Nikaido, 1995; Berg *et al.*, 2004). A viabilidade econômica e a ausência de toxicidade fazem com que os polissacarídeos sejam largamente utilizados em diversos campos da indústria (BeMiller, 1990).

A levana é um polímero de frutose produzido por vários organismos incluindo *Zymomonas mobilis* (Allen & Bowen, 1990; Oseguera *et al.*, 1996). Esse exopolissacarídeo possui propriedades espessante, emulsificante e estabilizante (Han, 1990; Van Geel-Schutten *et al.*, 1999) podendo ser aplicado na indústria de alimentos. Apresenta, também, atividades biológicas como imunoestimulação, atividade antitumoral *in vivo* contra tumores de camundongos, tais como o sarcoma 180 (S-180) e carcinoma de Erlich, e *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas (HepG2 e SNU-1) sem a toxicidade apresentada pelos agentes antineoplásicos tradicionalmente utilizados (Calazans *et al.*, 1997b, 2000; Yoo *et al.*, 2004), e atividade antiinflamatória (Yamada, 1996).

Nos últimos anos, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco ou produto bioativo no organismo pode ser modificada pelo uso de vetores coloidais. Estes carreadores protegem o princípio ativo da degradação e/ou inativação; melhoram a biodisponibilidade por aumento da penetração celular e proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado, eliminando ou minimizando os efeitos colaterais da terapêutica convencional (Ansel *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de formas lipossomais de liberação controlada contendo levana poderá permitir um melhor controle da cinética de liberação da mesma, resultando em níveis plasmáticos terapêuticos com diminuição da dose administrada. O aumento da atividade do produto bioativo também será um passo importante no desenvolvimento de uma nova terapêutica contra o câncer.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Geral

Propor o desenvolvimento de formas lipossomais contendo levana (Lev-LIPO) com potencial ação antitumoral e imunomoduladora.

Específicos

- Obter levana de baixo peso molecular com atividade antitumoral, através da hidrólise ácida de levanas nativas, produzidas por processo fermentativo descontínuo.
- Recuperar frações mássicas para construção de histogramas de distribuição pelo método de precipitação fracionada
- Produzir lipossomas convencionais contendo a levana como produto bioativo.
- Avaliar a estabilidade físico-química dos Lev-lipo
- Estabelecer a cinética de liberação *in vitro* da levana contida em lipossomas convencionais

CAPÍTULO 1



CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são carboidratos contendo muitas unidades monoméricas unidas por ligações covalentes, denominadas ligações glicosídicas (Madigan *et al.*, 2004). Quando dois açúcares (monossacarídeos) estão unidos por uma ligação glicosídica, a molécula resultante é denominada dissacarídeo. São considerados como polissacarídeos moléculas com mais de 10 unidades monoméricas. Abaixo desse valor a molécula é considerada como sendo um oligossacarídeo (Bobbio & Bobbio, 1989; Madigan *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos diferem pela natureza de suas ligações monossacarídicas repetitivas, pelo comprimento de suas cadeias e pelo grau de ramificação. São divididos em homopolissacarídeos, quando formados por um único tipo de unidade monomérica, e em heteropolissacarídeos, quando contêm mais de um tipo de unidade monomérica (Berg *et al.*, 2004). Dependendo do arranjo estrutural das unidades monoméricas, os polissacarídeos podem ser ramificados ou lineares (Berg *et al.*, 2004).

A ligação glicosídica pode ocorrer em duas orientações geométricas distintas, denominadas alfa (α) e beta (β) (Madigan *et al.*, 2004). Polissacarídeos que apresentam uma estrutura repetitiva, composta por unidades de glicose unidas pelos carbonos 1 e 4 na orientação alfa (α) (por exemplo, glicogênio e amido), atuam como importantes reservatórios de carbono e energia em bactérias, plantas e animais (Madigan *et al.*, 2004). Em contrapartida, unidades de glicose conectadas por ligações β -1,4 são encontradas na celulose, um composto da parede celular de algas e de plantas rígidas. Assim, embora o amido e a celulose sejam formados exclusivamente por unidades de glicose, suas propriedades funcionais são totalmente distintas em decorrência das diferentes configurações, α e β , de suas ligações glicosídicas (Madigan *et al.*, 2004).

Quanto à função, podem ser classificados como: polissacarídeos estruturais (localizados nas paredes e envoltórios celulares, espaços intercelulares e tecido

conjuntivo vegetal e animal onde dão forma, elasticidade ou rigidez), polissacarídeos de reserva metabólica (plantas e animais) e como polissacarídeos de proteção (capacidade de reter grandes quantidades de água, fazendo com que os processos enzimáticos não sejam interrompidos, mesmo em condições de desidratação) (Bobbio & Bobbio, 1989; Sutherland, 1990; Berg *et al.*, 2004).

De acordo com Margaritis & Pace (1985), uma outra distinção importante dos polissacarídeos está relacionada com suas cargas, podendo ser classificados naturalmente em aniônicos, neutros e catiônicos. Alguns polissacarídeos aniônicos incluem a goma xantana, fosfomanana e alginatos. Exemplos de polissacarídeos neutros são as levanas, escleroglucana, pululana, dextrana e curdulana. Algumas dessas macromoléculas, que possuem propriedades aniônicas, contêm grupos ácidos como carboxil, sulfatos ou fosfatos. Outras, em seu estado natural, podem ter algum grupo amino livre, o que confere, a estes polímeros, propriedades catiônicas.

A solubilidade destes compostos está relacionada com o peso molecular, onde polissacarídeos de menor peso molecular são, na sua grande maioria, solúveis em água, e a solubilidade diminui não só com o aumento do peso molecular, mas também com a maior ou menor facilidade com que as moléculas desses compostos se associam umas as outras (Bobbio & Bobbio, 1989). Os polissacarídeos ditos insolúveis são aqueles encontrados nas paredes celulares (Bobbio & Bobbio, 1989).

Muitos microrganismos produzem exopolissacarídeos (polissacarídeos produzidos extracelularmente). A presença de exopolissacarídeos, associados com o crescimento de células microbianas em superfície sólida, é freqüentemente reconhecida a partir de colônias mucosas. Em meio líquido, as culturas produtoras de exopolissacarídeos podem tornar o meio viscoso ou solidificá-lo. Estes polímeros podem formar uma cápsula firme ligadas à superfície da célula e, alternativamente, podem ser observados como um limo secretado pelo microrganismo diretamente no meio, sem estar ligado a célula. Em superfícies sólidas expostas a meios aquosos, tanto no corpo humano ou animal, nas águas frescas ou em oceanos, o crescimento bacteriano parece um biofilme, em que as células microbianas são associadas a grande quantidade de polissacarídeos (Sutherland, 1992; Sutherland, 1998).

No meio natural onde os microrganismos são encontrados, os polímeros podem estar associados à virulência (como no caso dos patógenos de plantas e

animais), através da interação planta-microrganismo, ou protegendo a célula microbiana contra dessecação ou ataque de bacteriófagos e protozoários (Sutherland, 1998). Polissacarídeos com propriedades imunológicas interessantes ocorrem na cápsula de alguns microrganismos e outros apresentam propriedades antigênicas (Whistler & Corbett, 1957).

Como cita Sutherland (1990), tanto os polissacarídeos microbianos e os não microbianos encontram uma grande aplicação em indústrias não alimentícias. Em cada uma, os polissacarídeos devem competir com os polímeros sintéticos orgânicos, mas, em algumas aplicações, apenas produtos naturais são aceitáveis devido à sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade. O uso de polissacarídeos em outros setores reflete diretamente suas características físico-químicas. Antes de seu uso ser contemplado, eles devem ser comparados a outros possíveis produtos naturais e sintéticos.

BeMiller (1990) enumera como fatores responsáveis pela retomada das pesquisas com polissacarídeos com aplicações comerciais potenciais, o fato de serem obtidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo, constituírem uma família de polímeros com grande diversidade de propriedades e grande versatilidade. Além disso, deve-se levar em consideração o fato de que os polímeros industriais serem, especialmente, produtos de alto valor comercial.

Muitos oligossacarídeos e polissacarídeos têm apresentado atividade biológica, tais como imunoestimulação, atividade antitumor e atividade antiinflamatória (Otterlei *et al.*, 1993; Yamada, 1996; Calazans, 1997b).

O efeito terapêutico, assim como a ação imunoestimulante, tem sido registrado para uma grande variedade de polissacarídeos (Belkin *et al.*, 1959; Whistler *et al.*, 1976; Sutherland, 1990). A descoberta de que é possível modificar a função celular, pelo uso de agentes imunoterapêuticos, provocando a chamada ativação dos macrófagos, foi comprovada experimentalmente por Hibbs (1974).

1.2 Levana

A levana é um biopolímero de frutose pertencente aos polifrutosídeos que são constituídos, além das levanas, pelas inulinas. A diferença entre estes polissacarídeos está no tipo de cadeia. Inulinas formam cadeias lineares do tipo β -(2,1), enquanto levanas bacterianas apresentam ligações do tipo β -(2,6) e β -(2,1), predominando as ligações do tipo β -(2,6) (Kennedy *et al.*, 1989; Yoo *et al.*, 2004).

As levanas são produzidas por bactérias Gram positivas e Gram negativas, a exemplo dos gêneros: *Actinomyces*, *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Gluconobacter* e *Zymomonas*. Alguns autores citam ainda o gênero *Leuconostoc* como produtor de levana, além da dextrana (Allen & Bowen, 1990; Oseguera *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 2004).

As biossínteses de dextrana e levana são completamente diferentes de outras vias biossintéticas de polissacarídeos. Elas não envolvem sistemas multienzimáticos, açúcares ativados ou carreadores lipídeos-intermediados. A produção é inteiramente extracelular e compreende a polimerização, catalisada por enzima, de um oligossacarídeo, que provê diretamente a energia e o carbono necessários (Kennedy *et al.*, 1989).

Zymomonas mobilis se destaca das demais bactérias, pois mesmo sendo uma bactéria anaeróbia aerotolerante, utiliza uma via metabólica para degradação de hexoses característica de bactérias aeróbicas (via de Entner-Doudoroff) seguida pela descarboxilação do piruvato (Gibbs & De Moss, 1951). Este microrganismo também tem como característica a fermentação quantitativa da glicose a quantidades equimolares de etanol e dióxido de carbono. Tal bactéria também é capaz de tolerar concentrações de sacarose mais altas que de glicose, mesmo em termos molares. As membranas celulares são afetadas por teores de glicose acima de 10 - 16 % (100 a 160 g/L), enquanto uma alta eficiência de hidrólise da sacarose é mantida acima de 46% (Park *et al.*, 1983).

A levana é produzida através da hidrólise da sacarose ou rafinose à glicose e frutose por uma enzima denominada levanassacarase, que atua transferindo frutose da sacarose para moléculas aceptoras pré-existentes (Han, 1990). A formação deste polissacarídeo é uma característica típica de *Zymomonas mobilis* crescida em meio

à base de sacarose. Em contraste aos heteropolissacarídeos, a síntese de levana ocorre fora da célula (exopolissacarídeo) (Sutherland, 1992; Doelle *et al.*, 1993).

A levana é sintetizada principalmente durante a fase exponencial da fermentação na presença de sacarose (Park *et al.*, 1983; Viikari, 1988), tendo a sua produção influenciada, além da presença da enzima e do substrato ideal (sacarose), pela concentração de nutrientes no meio de cultura e pelas condições de fermentação (pH, temperatura, dentre outras) (Marx *et al.*, 2000).

Apesar de alguns trabalhos afirmarem que um percentual de aproximadamente 2% é desviado para a produção de levana em *Zymomonas mobilis* em cultivo descontínuo (Viikari, 1988), observa-se uma grande variabilidade no rendimento, de linhagem para linhagem (Calazans *et al.*, 1989).

A levana pode vir a ter importantes aplicações biotecnológicas, podendo ser usada como emulsificante, estabilizante, espessante, agente encapsulante e carreador de sabor e fragrância (Fuchs, 1991). As levanas produzidas pela *Aerobacter levanicum* foram as primeiras levanas a serem relatadas como tendo atividade antitumoral e imunoestimulante (Leibovici *et al.*, 1986; Stark & Leibovici, 1986).

Levana produzida por *Zymomonas mobilis*, como um potencial agente antitumoral, foi estudada utilizando-se os tumores experimentais sarcoma 180 e carcinoma de Erlich (Calazans *et al.*, 1997), observando-se que a atividade do referido polissacarídeo estaria relacionada ao seu peso molecular (Calazans *et al.*, 2000).

Lima (2001) estudou a atividade antitumoral de levanas de diferentes faixas de peso molecular, e comparou com a ação de outros polissacarídeos.

De Paula (2004), demonstrou a ocorrência de variação na resposta antitumoral em função dos diferentes pesos moleculares obtidos após hidrólise ácida da levana em forno microondas.

Levanas produzidas por *Gluconoacetobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformans* e *Rahnella aquatilis* também tiveram a sua atividade antitumoral relacionadas ao seu peso molecular através de testes *in vivo* e *in vitro* (Yoo *et al.*, 2004).

1.3 Fracionamento da Levana Nativa

O fracionamento é um processo para a separação de espécies poliméricas quimicamente homogêneas, em uma mistura de polímeros com diferentes pesos moleculares denominados de frações. Tais frações diferem no peso molecular médio e possuem uma distribuição de pesos molecular mais estreita do que o material de origem. A monodispersão em peso molecular das frações seria a condição ideal, sendo que, na prática, as várias frações coletadas se sobrepõem em alguma extensão (Rudin, 1982).

O fracionamento pode ser classificado de duas formas: analítico ou preparativo. Pequenas quantidades do polímero são requeridas para um fracionamento analítico, assim como para a determinação de distribuição de peso molecular. A quantidade de polímero necessária na determinação varia, de acordo com o método a ser utilizado. No fracionamento preparativo, são obtidas grandes quantidades do polímero disperso em faixas estreitas de peso molecular. Os fracionamentos preparativos são desenvolvidos por um processo em batelada, cujas técnicas mais conhecidas são a cromatografia preparativa de permeação em gel e a precipitação por solventes orgânicos (McCaffery, 1970).

Vários métodos de fracionamento de polímeros estão em uso, como a precipitação fracionada, fracionamento em coluna gel, ultracentrifugação, ultrafiltração e outros. A precipitação fracionada consiste na precipitação isotérmica de uma pequena quantidade de polímero de alto peso molecular presente na solução, a qual é iniciada com a adição de uma determinada quantidade de uma substância não solvente ao polímero (McCaffery, 1970).

O fracionamento por precipitação com solvente, constitui-se por uma mistura líquido-líquido usando um antisolvente (etanol, por exemplo) (Lee *et al.*;1992). O equilíbrio de fases, neste sistema ternário, depende da massa molecular do polímero. Em ambas as fases, há uma coesão entre as fases líquidas das moléculas que estão distribuídas diferentemente na solução. Quanto menor a massa molecular maior a solubilidade das moléculas dos polímeros no sistema, permanecendo as mesmas na fase superior. Já as moléculas com massas moleculares maiores têm forte tendência a passar para a fase inferior. A princípio, é possível conduzir um

ótimo fracionamento de polímeros com qualquer distribuição de massa molecular (Neuchl & Mersmann, 1995).

A precipitação é um método direto de purificação de solutos biológicos. A maioria das precipitações forma um produto amorfo. Tais precipitados amorfos freqüentemente apresentam cristalização lenta. Eles podem agregar várias espécies ou quantidades significantes de sais adsorvidos ou solventes (Calazans, 1997).

A grande quantidade de variáveis envolvidas no processo de extração dificulta a obtenção de uma forma rentável, produtiva e economicamente viável. Isto é aplicável a polissacarídeos microbianos (Galindo, 1985). No entanto, há registros de grande quantidade de patentes nessa área devido às modificações químicas do polímero nos chamados processos pós-fermentativos (Galindo, 1985).

Devido à formação aleatória de macromoléculas com diferentes pesos moleculares, a obtenção de polímeros monodispersos é dependente de um iniciante pré-formado que se propague por um mecanismo simples, não susceptível a transferências de cadeias, sem nenhum mecanismo de terminação, sendo as mesmas alongadas simultaneamente (McCaffery, 1970).

A realização de fracionamentos torna-se imprescindível, uma vez que os polímeros são formados de forma randômica, a fim de se obter frações contendo pesos moleculares similares (Lima, 2001).

O fracionamento consiste no ajuste das condições da solução para que as duas fases líquidas estejam em equilíbrio promovendo a remoção da fase dispersa. Um novo ajuste da solução leva a obtenção de uma segunda fase separada e assim sucessivamente (Calazans, 1997).

A solubilidade variada das macromoléculas de diferentes tamanhos determina a distribuição dos pesos moleculares no fracionamento. Considerando-se uma espécie polimérica com certo grau de polimerização em solução, a separação em duas fases é possível pela adição de um anti-solvente e/ou diminuição da temperatura, gerando uma diminuição da afinidade do solvente pelo polímero, fazendo com que as moléculas com massas moleculares maiores tenham uma forte tendência a passar para a fase inferior (Rudin, 1982; Neuchl & Mersmann, 1995).

Um fracionamento realizado de forma crescente caracteriza-se pela adição progressiva de certa quantidade do anti-solvente na solução. De acordo com o

percentual do anti-solvente, a tendência é a precipitação das frações de maior massa molecular, com as de menor massa molecular permanecendo no sobrenadante. Calazans (1997) fracionou a levana nativa, produzida por *Zymomonas mobilis*, em intervalos de 10% de etanol (anti-solvente), classificando as frações como F-10 (fração obtida quando o percentual de etanol é de 10%), F-20, F-30 e assim sucessivamente, sendo o numeral correlacionado a concentração final do anti-solvente. Também observou que quanto maior for o percentual do anti-solvente na solução, menor será a massa molecular do polímero precipitável.

1.4 Uso de Microondas na Otimização do Tempo de Hidrólise

A hidrólise ácida tradicional de açúcares, que utiliza banho-maria como fonte de calor, envolve diferentes concentrações de ácido sulfúrico ou clorídrico, com tempo de reação de 2 a 3 horas (Li, 1998). Substituindo-se a fonte aquecedora por um aparelho de microondas, o tempo de hidrólise é reduzido, chegando a realizar o mesmo processo em apenas 6 minutos (De Paula, 2001).

De acordo com Li (1998), o uso de microondas apresenta a vantagem de não provocar alterações nos açúcares após a hidrólise. Segundo testes do autor, os açúcares apresentavam-se quimicamente semelhantes aos hidrolisados em banho-maria. Conclui-se, então, que as microondas podem ser utilizadas, pois aumentam o rendimento e diminuem o tempo de hidrólise (Li, 1998).

De Paula (2001) realizou um estudo comparativo entre o forno microondas e o banho-maria como fontes aquecedoras na hidrólise ácida do polissacarídeo levana e do dissacarídeo sacarose. O autor teve por objetivo avaliar a possibilidade de substituição do banho-maria pelo forno microondas como fonte de calor. O uso do forno microondas na hidrólise do dissacarídeo reduziu de 16 minutos para 1,5 minuto o tempo de reação. Tal dado foi confirmada através da dosagem dos açúcares redutores totais (ART) pelo método do Ácido Dinitro-Salicílico (DNSA).

Nos testes de hidrólise do polissacarídeo, foram utilizadas levanas produzidas pelas linhagens CP4 a 30°C e ZAG-12 a 35°C, que apresentaram pesos moleculares médios de 7.900 e 1.570.000, respectivamente. Usando banho-maria na temperatura de ebulição da água ($\cong 100^\circ\text{C}$) eram necessários 30 minutos para hidrolisar completamente a levana em monômeros de frutose. A hidrólise no forno

microondas, com potência de 650W permite que, em apenas 5 minutos, obtenha-se resultado semelhante ao método por hidrólise em banho-maria tradicional (De Paula, 2001).

Além da levana, foram realizados teste com amido, o qual apresenta ligações mais fortes que as frutanas. Tal açúcar foi escolhido devido à abundância na natureza e pela grande importância industrial apresentada pelo mesmo. O resultado obtido com a solução de amido, submetida às mesmas condições do di e do polissacarídeo, confirmou a possibilidade da utilização do forno microondas como substituinte do banho-maria tradicional para a hidrólise ácida de diversos polímeros. Comprovou-se também que é possível a redução total da molécula de amido à glicose em forno microondas, num tempo de 10 minutos. Em banho-maria, não foram alcançados os mesmos valores de concentração de glicose livre, mesmo utilizando-se 30 e 60 minutos de hidrólise (De Paula, 2001).

De Paula (2004), utilizou a hidrólise ácida como método para a obtenção de polissacarídeos de baixos pesos moleculares, oligossacarídeos e monossacarídeos a partir de polímeros de alto peso molecular produzidos por fermentação. Isto promoveu o aumento na quantidade das frações mais leves (F-60 e F-70) e o surgimento de novas frações (F-80 e F-90) não existentes no histograma de distribuição do polissacarídeo original.

Joergensen & Thestrup (1995) utilizou o forno de microondas $630 \pm 50W$ como método rápido para a hidrólise de proteínas em recipiente fechado. As amostras foram aquecidas a $150^{\circ}C$, com pressão variando entre 45 a 65 p.s.i., com tempo entre 10 a 30 minutos, enquanto que, nos métodos tradicionais, utiliza-se $110^{\circ}C$ durante 24 horas. Ambos os métodos foram testados com amostras puras de proteínas, carboidratos, gorduras e ácidos nucléicos. O método utilizando microondas apresentou resultados similares ou melhores em comparação ao método convencional.

A química orgânica também tem utilizado o forno microondas para acelerar o processo de hidrólise dos benzodiazepínicos na formação dos benzofenois (650 W de potência durante 10 minutos), com rendimento semelhante ao método tradicional e sem comprometimento químico da molécula (De La Guardia *et al.*, 1989).

As potências do forno microondas em diferentes tempos de hidrólise do ácido colomínico foram investigadas por Cheng *et al.* (1999). A obtenção de produtos com baixo grau de polimerização, menor quantidade de produtos secundários e maior rendimento na hidrólise de proteínas e peptídeos foram vantagens obtidas na utilização das microondas como fonte de aquecimento.

Metilação de polissacarídeos vegetais após purificação e isolamento da goma Guar de *Cyamopsis tetragonolobus* (Guar) foi feita por Singh *et al.* (2003) utilizando forno microondas.

A esterificação em cristais de celulose para a fabricação de plásticos biodegradáveis foi desenvolvida por Gourson *et al.* (1999) usando forno de microondas com uma potência de 750W, sob diferentes tempos e condições.

1.5 Nanomedicina e Sistemas de Liberação Controlada

A nanotecnologia farmacêutica utiliza os conceitos da nanotecnologia aplicando-os na biomedicina e biotecnologia, tendo como foco principal o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos sob a forma de nanossistemas como lipossomas e nanopartículas, e microssistemas como micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões (Brannon-Peppas, 1997; Silva, 2004).

A modulação apropriada do fármaco no organismo está relacionada diretamente com a forma de administração do medicamento. Atualmente, o objeto principal de investigação na farmácia galênica é o desenvolvimento de novas formas de administração de medicamentos que possam melhorar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade de fármacos (Peracchia *et al.*, 1997).

Entre as potenciais vantagens que os nanossistemas podem oferecer, destacam-se: o aumento da eficácia terapêutica, a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura), a manutenção de níveis plasmáticos do fármaco em concentração constante, diminuição expressiva da toxicidade, diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis, possibilidade de direcionamento a alvos específicos, possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos, menor

necessidade de administrações, uso otimizado do fármaco e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (Brannon-Peppas, 1997; Lo *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2003).

1.6 Lipossomas

Lipossomas (Figura 1) são pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios que se organizam espontaneamente em meio aquoso (Santos e Castanho, 2002). Tais partículas são consideradas uma excelente forma de sistema de liberação controlada de medicamentos ou substâncias biologicamente ativas devido a sua flexibilidade estrutural seja no tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de incorporar uma variedade de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Figura 2) (Iwamoto & Sunamoto, 1982; Brandl & Gregoriadis, 1994).

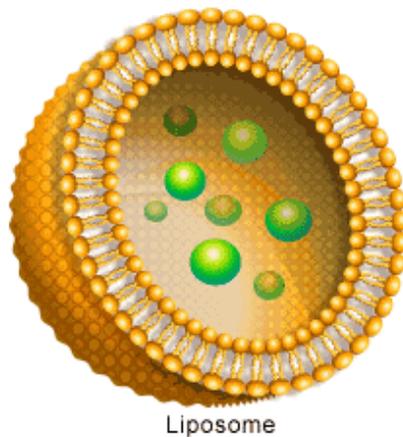


Figura 1. Representação de uma vesícula lipossomal unilamelar.
[http:// www.bioteach.ubc.ca](http://www.bioteach.ubc.ca)

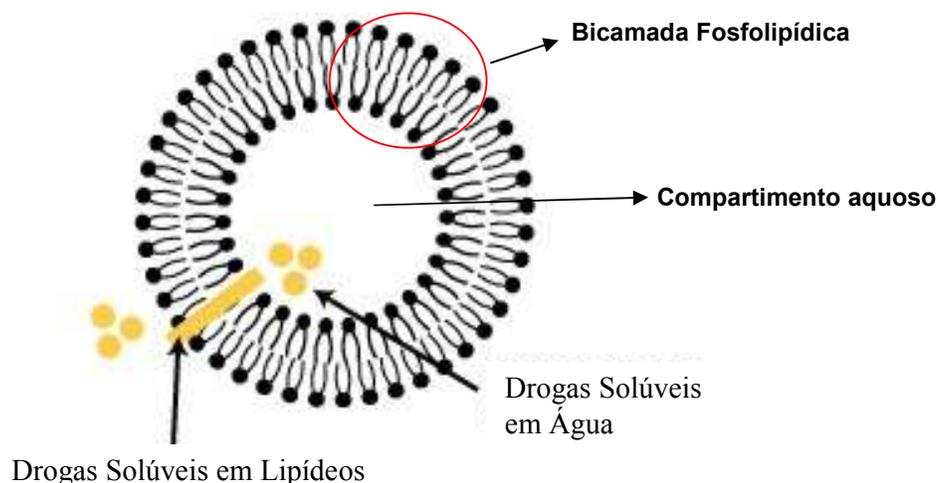


Figura 2. Localização de drogas, de acordo com a sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, nos lipossomas. Adaptado de blog.case.edu/.../2005/09/05/liposome1

Os lipossomas foram descobertos no início da década de 60, através de estudos da hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de um frasco de vidro (Lasic, 1989). Tal experimento foi realizado pelo Dr. Alec Bangham, mas quem primeiro utilizou o termo lipossoma (corpo gorduroso), para designar as estruturas vesiculares formadas por bicamadas fosfolipídicas com um compartimento aquoso em seu interior, foi Weissman em 1965 (Prista *et al.*, 1995).

Os lipossomas são classificados de acordo com os diâmetros médios em três categorias, como descrito abaixo:

- Vesículas Multilamelares (MLV – Multilamellar Vesicles): formas lipossomais formadas por bicamadas fosfolipídicas concêntricas intercaladas por compartimentos aquosos, cujo diâmetro varia de 400 a 3500 nm.
- Vesículas unilamelares grandes (LUV – Large Unilamellar vesicles): formas lipossomais constituídas por apenas uma bicamada fosfolipídica, mas com uma grande cavidade aquosa. Diâmetro varia de 200 a 1000 nm.
- Vesículas unilamelares pequenas (SUV – Small Unilamellar Vesicles): formas lipossomais constituídas por apenas uma bicamada fosfolipídica e um pequeno compartimento aquoso. Diâmetro varia de 20 a 50 nm (Scarpa *et al.*, 1998).

O uso de formas lipossomais, como sistemas de liberação lenta, é viável clinicamente por serem tipicamente feitos de moléculas lipídicas de origem natural, biodegradável e não tóxica (Meyenburg *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2004).

Os lipossomas podem proteger o fármaco de degradação enzimática, possibilitam o aumento da concentração da droga no sítio alvo (Bergstrand *et al.*, 2003), podem ser utilizados como excipientes não tóxicos para a solubilização de fármacos hidrofóbicos (Sapra e Allen, 2003), além de prolongar o tempo da vesícula na circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (Bergstrand *et al.*, 2003).

Alguns problemas relacionados aos lipossomas têm sido a rápida liberação no sangue, devido a adsorção de proteínas do plasma (opsoninas) com a membrana fosfolipídica, como também reconhecimento e captação dos lipossomas pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) (Safra e Allen, 2003).

A habilidade dos lipossomas para penetrar nos tecidos doentes está diretamente correlacionada com o seu tamanho. Lipossomas grandes são rapidamente removidos da circulação por macrófagos (SFM) e não se obtêm significantes níveis nos outros tecidos do corpo, enquanto lipossomas pequenos (≤ 100 nm) demoram um pouco mais para serem reconhecidos e fagocitados, aumentando a probabilidade dos mesmos de penetrarem os tecidos (Allen & Moase, 1996).

Alguns lipossomas que encapsulam fármacos e vacinas exibem superior propriedades farmacológicas sobre os medicamentos tradicionais. Isso pode ser evidenciado em áreas como quimioterapia do câncer, terapia antimicrobiana, vacinas, diagnóstico por imagem e tratamento de distúrbios oftálmicos (Srinath & Diwan, 1994).

Embora lipossomas sítio específicos, contendo moléculas direcionadoras como anticorpos por exemplo, estejam sendo muito especulados, estes ainda não estão suficientemente desenvolvidos para serem aplicados à clínica. Lipossomas convencionais têm demonstrado resultados em tecidos tumorais e já foram aprovados para o tratamento do sarcoma de Kaposi e está em testes clínicos para o tratamento de outras neoplasias (Düzgünes & Shlomo, 1999).

Mayer *et al.* (1990) em estudos de atividade antitumoral com vincristina encapsulada em lipossomas observou uma redução da toxicidade e aumento da atividade antitumoral quando comparado à vincristina livre, sugerindo vantagens terapêuticas em aplicações clínicas.

Sharma & Mayhev (1993) utilizaram lipossomas para encapsular o paclitaxel, fármaco que apresenta baixa solubilidade em água, e uma vez contido em lipossomas, apresentou atividade inibitória do crescimento celular *in vitro* das linhagens celulares: adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e melanoma (MeWo). O resultado demonstrou a mesma citotoxicidade do paclitaxel livre (Crosasso *et al.*, 2000).

Andrade *et al.* (2004) investigaram a atividade antitumoral *in vivo* de lipossomas contendo lectina de *Cratylia mollis* (Cra). Os resultados demonstraram que lipossomas contendo Cra promoveram uma diminuição da toxicidade tecidual e promoveram um aumento da inibição do tumor.

Preparações lipossomais de antineoplásicos como doxorubicina (Doxil[®]/Caelix[®] e Myocet[®]) e daunorrubicina (Daunosome[®]) já são amplamente utilizados clinicamente. (Woodle & Storm, 1998; Allen, 2000).

CAPÍTULO 2



CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BIOSSEPARAÇÃO

2.1.1 Precipitação Fracionada da Levana Nativa

A levana a ser fracionada foi obtida por via fermentativa em sistema descontínuo utilizando *Zymomonas mobilis* linhagem ZAG-12 (UFPEDA 241), num meio contendo 200 g/L de sacarose sem agitação, a 25°C por 72 horas (Calazans, 1997).

O mosto fermentado foi centrifugado a 2660 x g por 20 minutos para a retirada de células e, posteriormente, ao sobrenadante foi adicionado etanol P.A. até obter-se uma concentração final de 70 % de etanol na mistura. A levana nativa precipitada foi então submetida a fracionamento pelo etanol com o intuito de se obter uma fração isolada, com ação antitumoral, para ser encapsulada em lipossomas (Calazans, 1997).

A mistura hidroalcoólica contendo levana foi centrifugada a 13.128 x g durante 15 minutos (Ultracentrifuga Sorvall Super T21) a 4°C até precipitação da levana. A re-precipitação foi realizada nas mesmas condições após ressolubilização da levana em água e nova adição de etanol. A levana precipitada foi liofilizada (liofilizador Savant ModulyO) e armazenada a $\pm 4^\circ\text{C}$ (Calazans, 1997; De Paula, 2004).

A levana liofilizada foi solubilizada em água numa concentração de 100g/L e fracionada por precipitações sucessivas, pela adição crescente de etanol P.A em intervalos de 10% (p/p). Foi adotado o seguinte roteiro para a precipitação fracionada da levana:

- A Solução aquosa de levana foi preparada, sendo em seguida, calculada a massa de etanol a ser adicionada à solução inicial (levana+água) para obtenção de uma concentração de 10% (p/p) de etanol na mistura (levana+água+etanol).
- A Mistura foi centrifugada a 13.128 x g durante 15 minutos a 4°C.

- Ocorrida a precipitação, o sobrenadante foi retirado e a ele adicionado um volume de álcool suficiente para elevar a concentração para 20% (p/p).
- O Precipitado foi separado do sobrenadante, ressuspenso em água, transferido para frascos previamente pesados, e liofilizado (Savant Moduly0).
- Após liofilização, os frascos foram novamente pesados sendo o aumento de peso, em relação ao frasco vazio, correspondente ao peso da fração da levana.
- O mesmo procedimento foi adotado para obtenção de frações subseqüentes, em intervalos de 10% até 90% de etanol.

O precipitado obtido em cada uma dessas precipitações recebeu o nome correspondente à concentração de etanol da mistura de origem, ou seja. F-10 equivale ao precipitado obtido a partir da mistura contendo 10% (p/p) de etanol, e assim sucessivamente.

Chamou-se de levana nativa, a levana não submetida ao fracionamento, composta por uma mistura de todas as frações.

2.1.2 Hidrólise Ácida

Tal técnica teve como objetivo a obtenção de uma maior quantidade de levanas de menor peso molecular, resultante da hidrólise das frações maiores, já que as mesmas são produzidas em baixa concentração, por via fermentativa, em relação à levana total.

A solução de levana destinada à hidrólise foi preparada da mesma forma que a solução destinada ao fracionamento (100g/L). A essa solução adicionou-se ácido clorídrico a 0,1M suficiente para atingir um valor de pH de 2,5. Em seguida foi levada ao forno de microondas, Panasonic Píccolo 20L modelo NS42BH (800 W), para que ocorresse a hidrólise ácida. Foram testados os tempos de 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 minutos a fim de determinar qual o melhor tempo para obtenção das frações de menor peso molecular. Após a hidrólise, as amostras foram neutralizadas com NaOH 40% (Calazans, 1997).

Posteriormente, foi adicionada uma quantidade adequada de etanol absoluto, agitando-se sempre, para obtenção de uma concentração de 10% (p/p) em etanol seguindo a mesma metodologia descrita na precipitação fracionada.

Os histogramas de distribuição das frações mássicas foram construídos e analisados estatisticamente com o auxílio dos softwares Excel[®] Office 2000 da Microsoft Co e Origin[®] 6.1.

2.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS LIPOSSOMAIS

2.2.1 Obtenção de lipossomas pelo método da formação de filme lipídico

O processo de fabricação de Lev-LIPO foi baseado na formação do filme lipídico seguido de sonicação descrito por Anselem *et al.* (1993) (Figura 3). Todos os parâmetros da metodologia acima foram mantidos, tendo como única variável a concentração da levana no tampão fosfato pH 7,4 (Tabela 1).

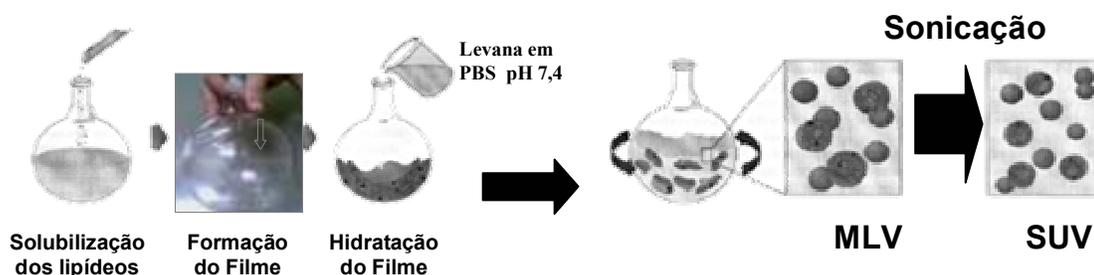


Figura 3. Esquema do processo de fabricação de lipossomas unilamelares pelo método de formação do filme lipídico seguido de sonicação (Anselem *et al.*, 1993). MLV = Multilamelar Vesicles (vesículas multilamelares). SUV = Small Unilamellar Vesicles (Vesículas unilamelares pequenas).

Tabela 1. Tipos de formulações testadas e suas respectivas concentrações de levana

Formulação	Concentração de Levana (mg/ mL)
LL0	0
LL1	1
LL2	1,8
LL3	5
LL4	10
LL5	20

LL = Lipossoma Levana

A fosfatidilcolina de soja (PC) (Epikuron 200) foi obtida da Lucas Meyer (Hamburgo – Alemanha). O colesterol (CH) e estearilamina (SA) foram obtidos da Sigma (USA). Clorofórmio, metanol, fosfato de potássio e hidróxido de sódio foram obtidos da Merck (Alemanha) e a levana utilizada nesse trabalho foi obtida a partir da hidrólise ácida de levana nativa produzida por via fermentativa em sistema descontínuo utilizando *Zymomonas mobilis* linhagem ZAG-12(UFPEDA 241) (Calazans, 1997).

Os constituintes lipídicos fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina (7:2:1, 42 μmol de lipídeos/10 μL de solução tampão fosfato) foram dissolvidos em uma mistura de clorofórmio/metanol (3:1) sob agitação magnética moderada por 16 minutos. Após solubilização, a solução orgânica foi submetida a evaporação (Rotaevaporador Buchi) sob pressão reduzida a 37°C, com agitação de 120 rpm, por tempo suficiente para a evaporação do solvente e formação do filme lipídico.

O filme lipídico seco formado foi, então, hidratado pela a adição de solução tampão fosfato 0,2M pH 7,4 contendo a levana sob leve agitação até solubilização completa e formação das vesículas multilamelares (Multilamellar Vesicles – MLV). Na tentativa de otimizar a formulação, foram testadas 5 formulações com diferentes concentrações de levana e 1 placebo (formulação sem a levana), sendo a levana inserida da seguinte forma:

- LL0 \Rightarrow Apenas 10 mL do tampão fosfato pH 7,4.
- LL1 \Rightarrow 10 mg de levana em 10 mL tampão (1 mg/ mL)
- LL2 \Rightarrow 18mg de levana em 10 mL tampão (1,8 mg/mL)
- LL3 \Rightarrow 50 mg de levana em 10 mL tampão (5 mg/mL)
- LL4 \Rightarrow 100 mg de levana em 10 mL tampão (10 mg/mL).
- LL5 \Rightarrow 200 mg de levana em 10 mL tampão (20 mg/mL).

Vesículas unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicles - SUV) foram obtidas a partir da sonicação de vesículas multilamelares durante 300 segundos, no modo pulsátil, em sonda de ultra-som (Vibra Cell Model CV17 Bioblock Scientific).

As formulações lipossomais foram conservadas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ em frascos tipo penicilina com tampas de borracha para vedação.

2.2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade dos lipossomas

Processos acelerados e a longo prazo

As análises físico-químicas foram efetuadas imediatamente após a preparação das formas lipossomais e durante os testes de estabilidade acelerada e em longo prazo. Características físico-químicas das diferentes formulações lipossomais, tais como pH, viscosidade, coloração, deposição de material, formação de agregado, floculação ou eventual separação de fases foram avaliados por observação visual ou com aparelhagem adequada.

Os Lev-LIPO foram submetidos a testes de estabilidade acelerada e a longo prazo com o objetivo de simular situações de estresse tais como transporte e estocagem.

Os testes de estabilidade acelerada tiveram por objetivo submeter as formulações a condições de estresse, tais como variação de temperatura, centrifugação e agitação, as quais conduzem ao envelhecimento acelerado. Alíquotas de 2 mL das diferentes formulações lipossomais contendo levana foram submetidas a centrifugação (820 x g durante 1 h), estresse mecânico (160 vibrações/min durante 48 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclos de gelo e degelo (16h a -4°C e 8 h a 25°C) (Santos-Magalhães *et al.*, 2000).

A avaliação de estabilidade em longo prazo teve por objetivo testar a durabilidade das formulações. Nesta etapa, características físico-químicas dos lipossomas foram avaliadas nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 após o processo de fabricação. Parâmetros como aspectos macroscópicos, microscópicos e variação de pH foram analisados.

Análise do tamanho de partícula

Os tamanhos de partícula foram determinados utilizando contador de partículas Nanozetasizer[®] (Nano ZS90, Malvern). Tal equipamento tem como princípio a medida do movimento Browniano das partículas através da espectroscopia de autocorrelação de fótons utilizando difração de raio laser monocromático (vermelho). A plotagem do gráfico de distribuição da população de nanossistemas é feita a partir do espalhamento da luz (light scattering). O coeficiente

de difusão da luz é utilizado na determinação do diâmetro das partículas através da equação de Stokes-Einstein (v/v).

Análise do Potencial Zeta

O potencial zeta representa a carga de superfície das partículas e é determinado utilizando a combinação de duas técnicas: eletroforese e “Laser Doppler Velocimetry”. A mobilidade eletroforética das partículas foi medida utilizando o Nanozetasizer[®] (Nano ZS90, Malvern) e o potencial zeta foi calculado a partir da equação de Henry: $U_E = 2\varepsilon z f(K_a) / 3\eta$, onde Z = potencial zeta, U_E = mobilidade eletroforética, ε = constante dielétrica, η = viscosidade, $f(K_a)$ = função de Henry.

2.2.3 Estudos de liberação *in vitro*

A cinética de liberação *in vitro* de levana contida em lipossomas foi realizada pelo método da dialise, onde 2 mL das formas lipossomais contendo levana foram colocadas em um saco de diálise (Sigma 33 mm x 21 mm; M.W.12.400) sendo o mesmo imerso em 100 mL de tampão fosfato pH 7,4 sob agitação. Alíquotas de 1 mL do meio experimental foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados (1, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas) e submetidas a doseamento da frutose constituinte da levana (Roe & Papadopoulos, 1954). O volume retirado do meio receptor foi repostado com tampão fosfato depois de cada coleta. Os experimentos foram efetuados em triplicata.

2.3 DOSEAMENTO DA LEVANA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS FORMAS LIPOSSOMAIS

2.3.1 Considerações

A maioria dos métodos usados no acompanhamento da produção de levana não dosa diretamente a mesma e nem suas frações. Os métodos utilizados hidrolisam o polissacarídeo e dosam o monômero constituinte. São exemplos de tais métodos, o método espectrofotométrico, para dosagem de frutose, descrito por Roe & Papadopoulos (1954) e a determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método do Ácido Dinitro-Salicílico (DNSA).

Tais metodologias dosam mono e dissacarídeos e necessitam que haja a hidrólise do polissacarídeo até o seu monômero constituinte. Isto resulta em um maior número de manipulações, maior tempo de processamento e, conseqüentemente, maiores possibilidades de erros. Já a metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) requer um número menor de manipulações, menor tempo de processamento e apresenta uma menor margem de erro.

De Paula (2004) dosou oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização através de CLAE, usando uma coluna REZEX-RS0 OLIGOSACCHARIDE (12 μ m x 10 mm x 200 mm) tendo como fase móvel água deionizada e temperatura do forno de 80°C. A detecção foi realizada por índice de refração com a unidade óptica mantida a 35°C. Utilizou-se um padrão qualitativo de oligossacarídeos (Light Corn Syrup – Phenomenex).

A análise de monossacarídeo realizada por De Paula (2004) em CLAE utilizou uma coluna BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 μ m x 6,5 mm x 300 mm), tendo como fase móvel água deionizada, temperatura do forno 80°C. A detecção foi realizada por índice de refração com a unidade óptica mantida a 35°C. Utilizou-se uma solução padrão de frutose (D- Frutose).

Como o padrão de levana comercial Sigma é produzido pela *Erwinia herbicola* e possui peso molecular diferente da levana utilizada nesse trabalho, foi construída uma curva de calibração com um padrão secundário (própria matéria prima) e a metodologia por CLAE necessitou ser comparada a um método químico colorimétrico conhecido para confirmação dos resultados. A metodologia escolhida foi o doseamento da frutose descrita por Roe & Papadopoulos (1954) utilizando frutose padrão (D- Frutose) na preparação da curva padrão.

A extração da levana (outra exigência num processo de doseamento) do meio lipídico (formas lipossomais) não foi possível pelo método de extração líquido-líquido porque os fosfolípidios possuíam afinidade por ambas as fases, funcionando como tensoativos lipofílicos e impedindo a separação das mesmas e o isolamento da levana. Foram adotadas as seguintes estratégias:

- Uso de método químico específico para a frutose (Roe & Papadopoulos, 1954).

- Ultrafiltração-centrifugação utilizando unidades filtrantes hidrofílicas (Ultrafree[®] Milipore[®]) de pequeno diâmetro (10Kda) para separar a parte hidrofílica (levana) da parte hidrofóbica (lipídeos) da formulação.
- Uso de coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 µm x 6,5 mm x 300 mm) para separação e doseamento do polissacarídeo. Os componentes isolados da formulação foram analisados separadamente para determinação de seus tempos de retenção.

2.3.2 Doseamento da levana na preparação lipossomal

A quantificação da levana contida nas formas lipossomais foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e confirmada por método colorimétrico.

Para ocorrer o doseamento é necessário extrair a levana encapsulada das formas lipossomais. Tal extração foi feita submetendo uma mistura de formas lipossomais contendo levana e metanol P.A (1:1) a um banho de ultra-som por 30 minutos a fim de quebrar os lipossomas e liberar a levana encapsulada. A solução resultante foi analisada por método cromatográfico e colorimétrico.

O método cromatográfico utilizou um cromatógrafo líquido da marca Hewlett Packard (HP), modelo 1100 usando o software Chemstation, equipado com forno, deionizador e um detector de índice de refração (RID). Para que a análise fosse realizada, utilizou-se uma coluna BECKMAN U-SPHEROGEL CARBOHYDRATE (10 µm x 6,5 mm x 300 mm) made in USA, água deionizada (Milliq[®]) Millipore como fase móvel, (ultra pura) numa vazão de 0,400 mL/min com temperatura controlada em 40°C e um Detector de Índice de Refração (RID) com temperatura na unidade óptica de 35°C.

Foi construída uma curva de calibração com a levana produzida por *Zymomonas mobilis* linhagem ZAG-12 (UFPEA 241), partindo de uma solução com concentração de 40 mg/mL. A partir dessa solução foram feitas diluições para obtenção de pontos com concentrações de levana entre 0,05 e 40mg/mL.

Os valores de área, dados em nRIU.s (Nano Unidades de Índice de Refração vezes Segundo) serão convertidos em concentração (mg/mL) pelo uso da equação da reta obtida com a curva padrão.

Frações 70, obtidas de diferentes lotes de levana nativa, liofilizados e armazenados a 4°C em frascos lacrados, produzida por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 a 25°C, foram analisadas por CLAE a fim de comparar os tempo de retenção. Levana padrão Sigma produzida por *Erwinia herbicola* também foi analisada.

Constituintes da formulação (PC, CH, ST e tampão PBS) foram analisados separadamente a fim de determinar o tempo de retenção dos mesmos e uma possível interferência na análise da levana.

O método colorimétrico teve por objetivo confirmar os resultados obtidos com o método de CLAE. A metodologia utilizada foi o doseamento da frutose descrita por Roe & Papadopoulos (1954). A especificidade do método está no fato do resorcinol em meio ácido reagir somente com cetoses, gerando uma cor avermelhada, e não reagir com grupos aldeídos. Para isso, foi necessário hidrolisar a levana para obtenção de seus constituintes (frutose) e expor a cetose ao resorcinol.

Uma curva padrão foi feita utilizando uma solução a 0,018% (1µmol/mL) de frutose (D- Frutose – VETEC). A partir dessa solução foram feitas diluições para obtenção dos pontos da curva com concentrações entre 20 e 500 nmol/mL.

Foram testados 5 diferentes tempos de hidrólise tradicional em banho-maria a $\cong 100^{\circ}\text{C}$ (10 , 20, 30, 40 e 50 minutos) com o intuito de definir o melhor tempo de hidrólise total para a fração 70.

A solução resultante da quebra das formas lipossomais em banho de ultra-som foi diluída a uma concentração de levana de 0,018% (equivalente a aproximadamente 1µmol de frutose/mL). Adicionou-se HCl 0,1M nas amostras até atingir pH 2,5. Amostras diluídas e acidificadas foram submetidas a hidrólise ácida em banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Após hidrólise, as amostras foram neutralizadas com NaOH 40% sendo o volume final medido para correção da concentração.

A metodologia de dosagem de frutose descrita por Roe & Papadopoulos (1954) inicia quando uma alíquota da amostra hidrolisada e neutralizada (300 µL) tem o volume completado para 1 mL. Adiciona-se 1 mL de solução alcoólica de

resorcinol 0,1% e 3 mL de HCl a 30%. Mistura-se bem e aquece-se a 80°C durante 8 minutos. Esfria-se e determina-se a absorvância a 530nm em espectrofotômetro Spectro Digital UV-VIS RS Labomed. O valor da absorvância foi convertido em concentração (nmol/mL) pelo uso da equação da reta obtida com a curva padrão.

Frações 70, obtidas de diferentes lotes de levana nativa produzida por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 a 25°C e levana padrão Sigma produzida por *Erwinia herbicola*, foram hidrolisadas e analisadas a título comparativo.

2.3.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Levana

A eficiência de encapsulação de levana em formas lipossomais foi determinada após a separação da levana não encapsulada das formas lipossomais por ultrafiltração-centrifugação em unidades filtrantes (ultrafree® Millipore) a 13128 x g durante 60 minutos a 4°C.

O filtrado resultante foi analisado pelas metodologias colorimétrica e cromatográfica (CLAE) descritas no item 1.2 deste mesmo capítulo.

A Eficiência de encapsulação foi determinada pela seguinte fórmula: $TE = [(T - L)/T] \times 100\%$, onde T é a concentração da levana total e L é a concentração da levana não encapsulada (obtida por ultrafiltração-centrifugação).

CAPÍTULO 3



CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 BIOSSEPARAÇÃO

3.1.1 Histogramas de distribuição das frações mássicas de levana

A precipitação fracionada obteve frações isoladas de levana, precipitadas por centrifugação em uma mistura hidroalcoólica crescente (10% até 90%). Frações de levana que precipitam em misturas hidroalcoólica acima de 90%, oligossacarídeos e monossacarídeos não foram recuperados e dosados no presente trabalho.

As Figuras 4 a 9 apresentam os histogramas de distribuição das frações mássicas de levana. A Figura 4 correspondente às frações presentes na levana nativa, naturalmente produzidas durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis* ZAG-12, e as Figuras 5 a 9 correspondem às frações obtidas a partir de levana submetida a diferentes tempo de hidrólise ácida.

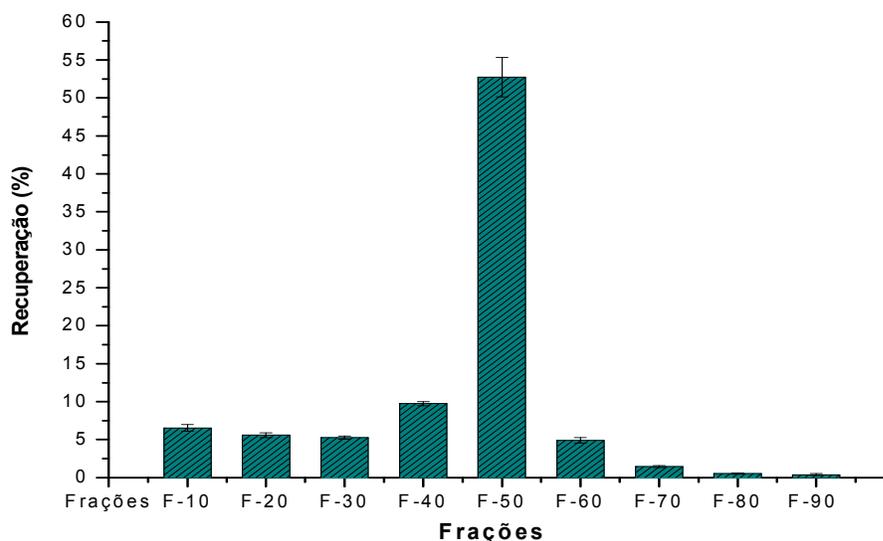


Figura 4. Histograma de distribuição das frações mássicas, presentes na levana nativa, isoladas por precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $12,86 \pm 2,8\%$.

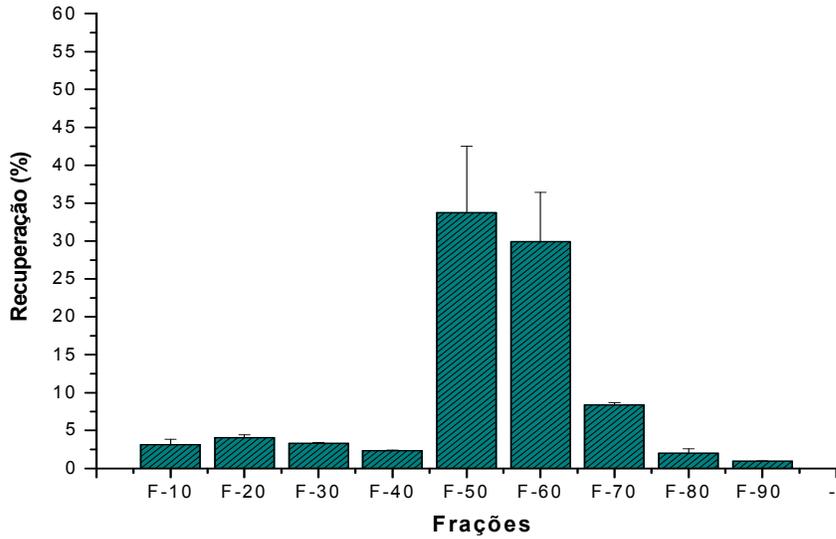


Figura 5. Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida à hidrólise ácida em forno microondas (1 minuto), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $12,17 \pm 3,74\%$.

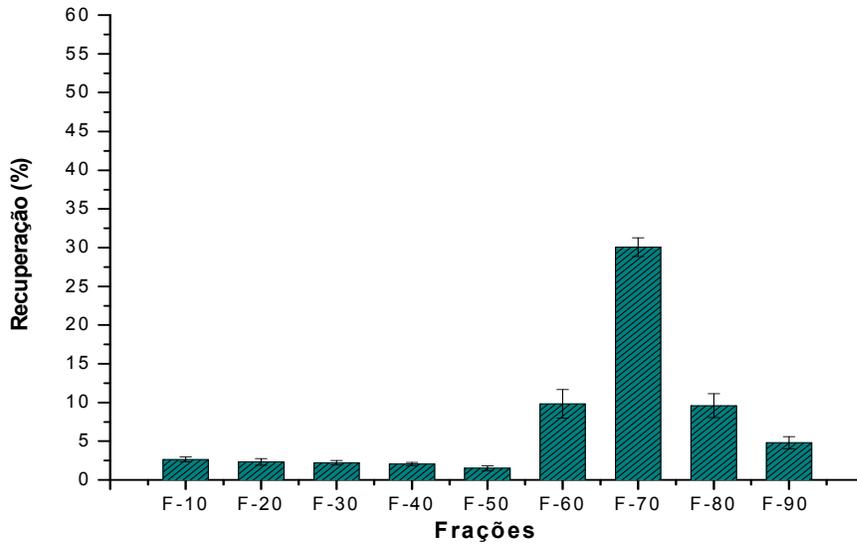


Figura 6. Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida à hidrólise ácida em forno microondas (1,5 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $34,81 \pm 4,13\%$.

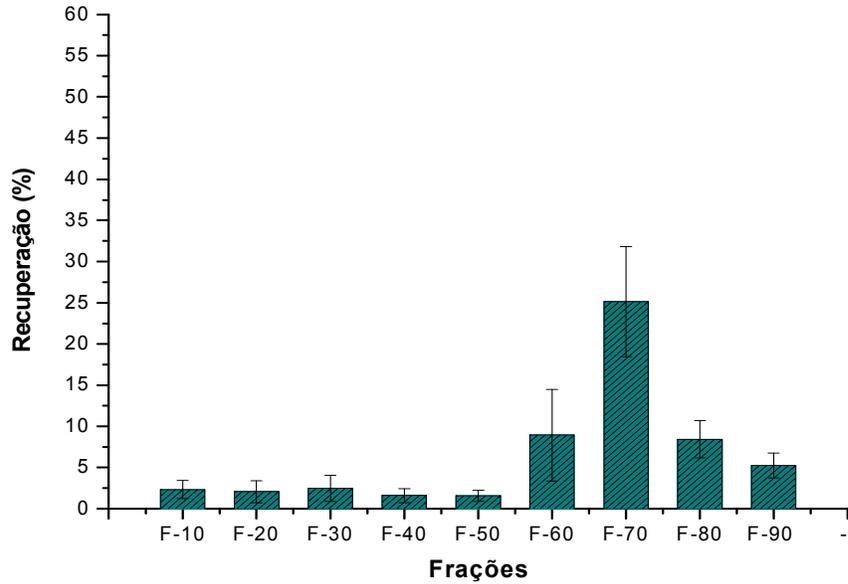


Figura 7. Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida à hidrólise ácida em forno microondas (2 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $42,21 \pm 14,43\%$.

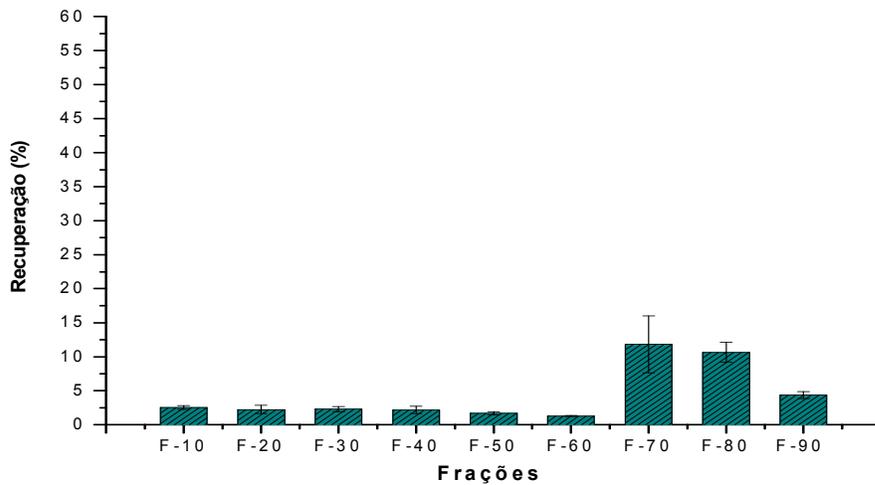


Figura 8. Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida à hidrólise ácida em forno microondas (2,5 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $60,93 \pm 5,79\%$.

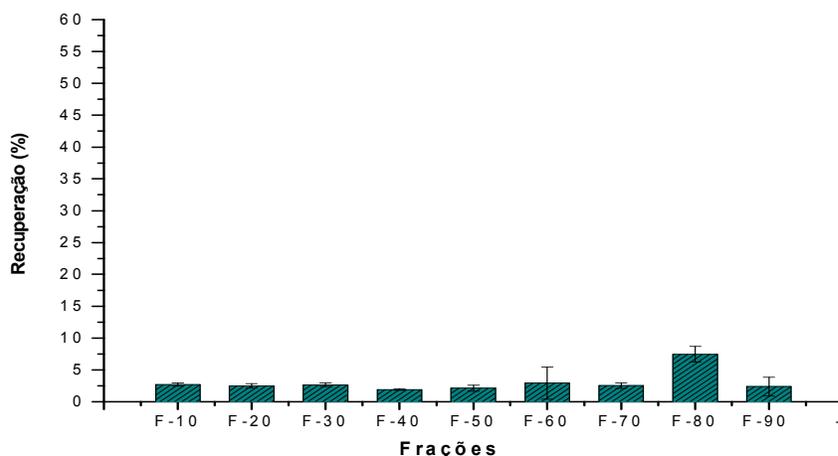


Figura 9. Histograma de distribuição das frações mássicas presentes na levana nativa, submetida à hidrólise ácida em forno microondas (3 minutos), e separadas pelo método de precipitação fracionada. A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total (2,5g) submetida ao fracionamento. Perdas de $72,83 \pm 5,07\%$.

A Figura 4 mostra uma predominância da fração 50 ($52,74 \pm 2,6\%$) em relação às demais frações obtidas a partir de levana nativa não submetida a hidrólise ácida. A segunda fração predominante é a F-40 ($9,73 \pm 0,25\%$), seguida pelas frações 10 ($6,55 \pm 0,45\%$), 20 ($5,6 \pm 0,32\%$), 30 ($5,25 \pm 0,22\%$) e 60 ($4,92 \pm 0,35\%$). As frações de menor peso molecular (70, 80 e 90) juntas não ultrapassam 3%.

As perdas referem-se não somente à quantidade de levana não recuperada pela precipitação, mas também à frações maiores que 90%, oligossacarídeos e monossacarídeos que não foram isolados por serem muito leves e não precipitarem com 90% de etanol.

Os resultados obtidos na Figura 4 são similares aos resultados de precipitações fracionadas de levana nativa obtidas por De Paula (2004), por decantação durante 3 a 5 dias sob refrigeração e por centrifugação a $3284 \times g$ durante 35 minutos a 4°C .

Após 1 minuto de hidrólise ácida (Figura 5), a recuperação das frações 40 e 50 caem para $2,33 \pm 0,1\%$ e $33,72 \pm 8,75\%$, respectivamente, e as frações 60 e 70 aumentam para $29,9 \pm 6,52\%$ e $8,40 \pm 0,25\%$, respectivamente. Há também um pequeno aumento nas frações 80 ($1,97 \pm 0,59\%$) e 90 ($0,93 \pm 0,07\%$). As frações maiores (10,20,30) sofreram pequenas modificações em sua recuperação.

A predominância da F-70 ($30,1 \pm 1,2\%$), em relação às demais frações, ocorre com 1,5 minutos de hidrólise (Figura 6). Tal predominância também é observada nos tempos de 2 e 2,5 minutos (Figura 7 e 8), sendo que a recuperação da fração, em relação a levana nativa, cai para $25,14 \pm 6,68\%$ e $11,82 \pm 4,2\%$ respectivamente. No tempo de 3 minutos (Figura 9), a predominância é da F-80 ($7,45 \pm 1,22\%$), sendo o rendimento da F-70 de $2,53 \pm 0,44\%$.

O melhor tempo de hidrólise para obtenção das frações 70, 80 e 90 é 1,5 minutos (Tabela 2). As duas últimas frações não apresentaram variação significativa ($p < 0,05$) na recuperação utilizando tempos de hidrólise entre 1,5 e 3 minutos (Figuras 6, 7, 8 e 9). Observando-se que quanto maior o tempo de hidrólise maiores as perdas no sistema, optou-se pelo tempo de 1,5 minutos.

Tabela 2. Tempos de hidrólise para obtenção das frações com baixo pesos moleculares.

Frações	Tempo de Hidrólise (min)	Recuperação (%)
F-60	1	29,9
F-70	1,5	30,1
F-80	1,5	9,61
F-90	1,5	4,83

A recuperação é dada em função da quantidade de levana nativa total submetida ao fracionamento

Levando-se em consideração que as condições experimentais são as mesmas, modificando-se apenas o tempo de hidrólise, sugere-se que o aumento da perda está diretamente relacionado ao aumento da formação de oligo e monossacarídeos a medida que se aumenta o tempo de hidrólise. Esses permanecem solúveis no sobrenadante, não sendo precipitados na concentração de etanol máxima utilizada.

De Paula (2004) apresenta gráficos que demonstram o aumento da concentração de oligossacarídeos e frutose a partir de 1,5 minutos. Os oligossacarídeos apresentam sua concentração máxima com 3 minutos de hidrólise ácida em forno microondas, caindo para próximo de zero com 5 minutos. Já o monossacarídeo frutose tem sua concentração máxima em 5 minutos utilizando o mesmo tipo de hidrólise.

As perdas apresentadas, particularmente pelo processo de fracionamento da levana nativa, são advindas do processo de recuperação do produto (Belter *et al.*, 1988), que envolve extração, centrifugação, ressuspensão e liofilização do material precipitado.

A realização de fracionamentos é de extrema importância para a separação de frações contendo pesos moleculares distintos, já que os polímeros são formados de forma randômica (Lima, 2001).

O uso de centrifugação, a 13128 x g por 15 min à 4°C, agilizou a construção do histograma de distribuição das frações quando comparado ao método de decantação, confirmando resultados obtidos por De Paula (2004), mas também reduziu o tempo de processamento de 7 horas para 2,25 horas em relação a esse mesmo autor.

Como descrito por Li (1998), o uso de microondas apresenta a vantagem de não provocar alterações nos açúcares, bem como diminui o tempo de processamento da hidrólise. Foi possível, através dessa técnica, obter frações de menor peso molecular, as quais são de grande importância, principalmente como agentes antitumorais (Calazans *et al.*, 1997; Lima, 2001; De Paula, 2001; De Paula, 2004).

A hidrólise ácida da levana nativa ocorre principalmente sobre a F-50 (predominante), que dá origem as frações mais leves durante o primeiro minuto de hidrólise. A partir daí, as frações mais leves passam a sofrer também os efeitos da hidrólise e dão origem aos oligo e monossacarídeos.

Partindo-se de tal observação, o presente trabalho propõe a hidrólise ácida das frações mais pesadas isoladamente, a fim de ter um maior controle da formação do produto, diminuindo as perdas e aumentando a formação e recuperação de frações mais leves.

Para a avaliação da atividade antitumoral de levana contida em lipossomas, foi escolhida a F-70, pois, em relação as frações mais leves, apresentou uma melhor recuperação, obtendo quantidades suficientes para as etapas subsequentes dessa dissertação.

3.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS LIPOSSOMAS

3.2.1 Obtenção de lipossomas pelo método da formação de filme lipídico

Foram Obtidos Lev-LIPO variando a concentração de levana (1 – 20 mg/mL) com o intuito de se obter a melhor preparação.

Logo após o processo de fabricação, todas as formulações apresentaram-se homogêneas, leitosas opalescentes com reflexo azulado.

Houve formação de MLV após hidratação do filme lipídico (Observação de lipossomas utilizando objetiva de 40 do microscópio óptico Olympus CH-2).

Houve formação de SUV após sonicação (Não observação microscópica de lipossomas com objetiva de 40 do microscópio óptico Olympus CH-2).

3.2.2 Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade dos lipossomas

Processos acelerados e em longo prazo

Como todas as formulações avaliadas apresentaram características inerentes a formas lipossomais, imediatamente após o processo de fabricação, as mesmas foram submetidas aos processos de estabilidade acelerada e em longo prazo.

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação da estabilidade acelerada de formulações lipossomais contendo diferentes concentrações de levana. Os Lev-LIPO com concentração maior de levana (LL4 e LL5) precipitaram quando submetidas aos testes de centrifugação, estresse mecânico e ciclos de gelo e degelo.

Tabela 3. Avaliação da estabilidade acelerada das formulações lipossomais contendo diferentes concentrações de levana. Experimentos realizado em triplicata.

Formulação	Concentração de Levana (mg/mL)	Centrifugação (820 x g 1 h)	Estresse Mecânico	Ciclos de Gelo e Degelo
LL0	0	Estável	Estável	3 Ciclos
LL1	1	Estável	Estável	3 Ciclos
LL2	1,8	Estável	Estável	3 Ciclos
LL3	5	Estável	Estável	3 Ciclos
LL4	10	Precipitou	Precipitou	Precipitou
LL5	20	Precipitou	Precipitou	Precipitou

Foram realizados apenas 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

Sugere-se que a precipitação da levana seja ocasionada pela elevada quantidade da mesma, que satura as formas lipossomais.

A Figura 10 apresenta a variação de pH nos Lev-LIPO ao longo de 180 dias (estabilidade a longo prazo). Os lipossomas sem levana (lipossomas controle) permaneceram estáveis durante 180 dias, apresentando um pH médio de $7,18 \pm 0,25$. As formulações LL1 e LL2 também se mantiveram estáveis durante os 180 dias do teste e apresentaram um pH médio de $7,25 \pm 0,38$ e $7,26 \pm 0,18$ respectivamente, sendo a LL2 a que obteve menor variação no pH em relação as demais formulações. As formulações LL3 (pH $7,12 \pm 0,48$), LL4 (pH $7,01 \pm 0,62$) e LL5 (pH $7,03 \pm 0,59$) precipitaram nos dias 90, 60 e 45 respectivamente.

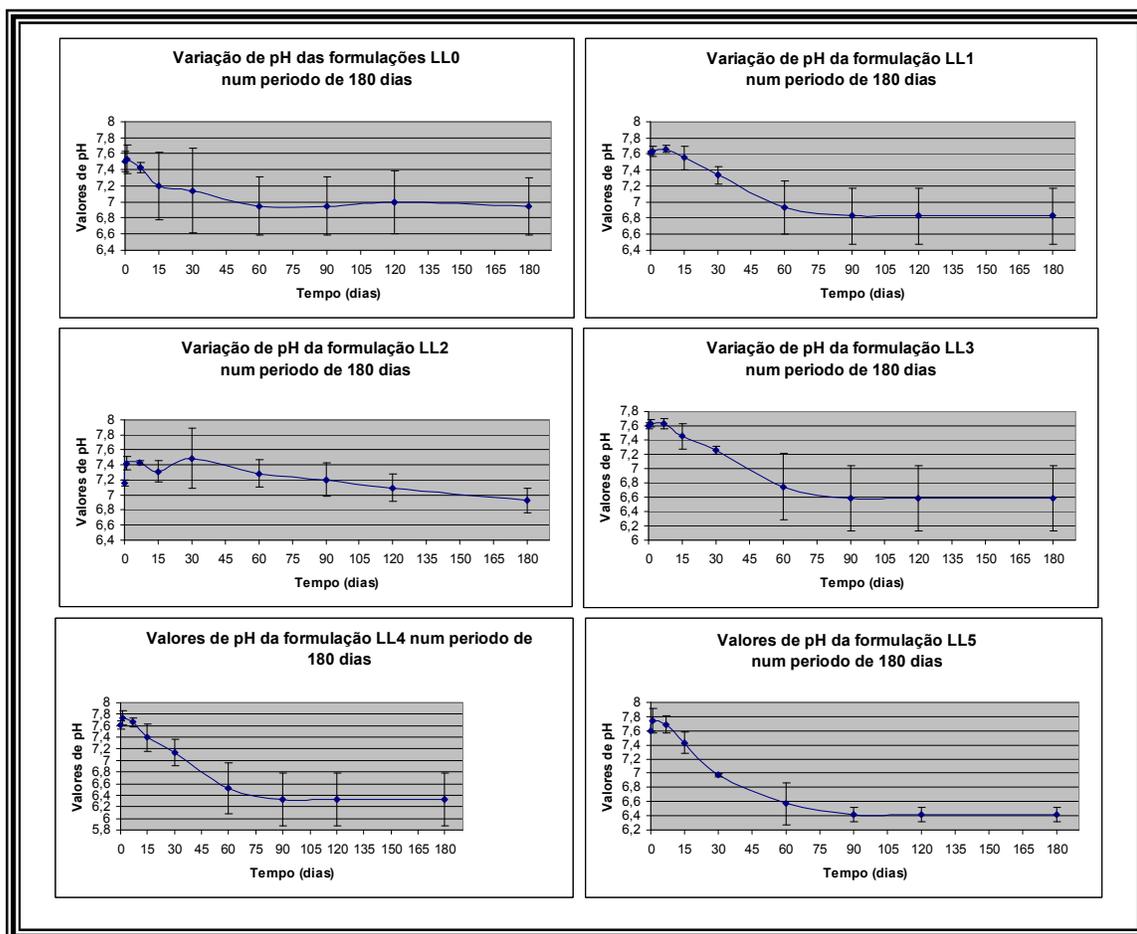


Figura 10. Variação de pH das formas lipossomais durante 180 dias. Experimentos realizados em triplicata.

As formulações que não decantaram (LL0, LL1, LL2), não apresentaram modificações do ponto de vista físico-químico, permanecendo homogêneas, leitosas opalescentes com reflexo azulado. Já as de menor durabilidade (LL3, LL4, LL5), apresentaram decantação da levana e perda da homogeneidade. Não foi observada separação de fase em nenhuma das formulações.

As formulações com maior quantidade de levana apresentaram comportamentos similares nas duas formas de estabilidade (acelerada e a longo prazo), o que fortifica a sugestão de que tal precipitação possa ser ocasionada pela elevada quantidade de levana, que satura as formas lipossomais.

A levana não encapsulada juntamente com o tampão fosfato também podem contribuir para instabilidade tornando a formulação susceptível a contaminação. A preparação das formas lipossomais contendo levana deve ser feita em condições estritamente estéreis e o produto deve ser armazenado na forma liofilizada para uma maior durabilidade.

Análise do tamanho de partícula

A distribuição bi-modal de tamanho de partículas nas preparações de lipossomas foi observada (Figuras 11 e 12). Em todas as formas lipossomais (contendo ou não levana) foi constatada a presença de duas subpopulações com tamanhos heterogêneos (Tabela 4). O uso de ultra-som (300 segundos no modo pulsátil) pode vir a ser uma das causas do surgimento de uma segunda população.

Não se pode atribuir à levana a formação de um dos picos, pois a formulação LL0 (sem levana) apresentou o mesmo comportamento (Figura 11).

A formulação LL3 possui o menor tamanho de partícula do segundo pico ($143,17 \pm 11,67$ nm), menor tamanho de partícula médio e menor desvio padrão ($98,96 \pm 0,64$ nm).

Apesar dos picos não serem unimodais, os tamanhos de partículas obtidos (Tabela 4) podem ser considerados muito bons em se tratando de formas lipossomais para administração parenteral. O crescimento tumoral, bem como regiões de infecção e inflamação, contém capilares com permeabilidade alterada, apresentando poros capilares entre 100 e 800 nm. Lipossomas SUV contendo fármaco encapsulado têm diâmetros de aproximadamente 60 a 150 nm e podem

passar da corrente sanguínea para o espaço intersticial tumoral através destes poros (Sapra e Allen, 2003).

Tecidos normais contém capilares com junções compactas que são impermeáveis aos lipossomas e outras partículas do mesmo diâmetro, havendo um maior acúmulo de fármaco lipossomal no tecido tumoral em relação ao normal. Esta é a base para a especificidade tumoral aumentada para lipossomas carregados em relação ao fármaco livre (não-lipossomal). Tumores carentes de drenagem linfática têm baixa captação de lipossomas extravasados dos tumores, como descrito em Sapra e Allen (2003).

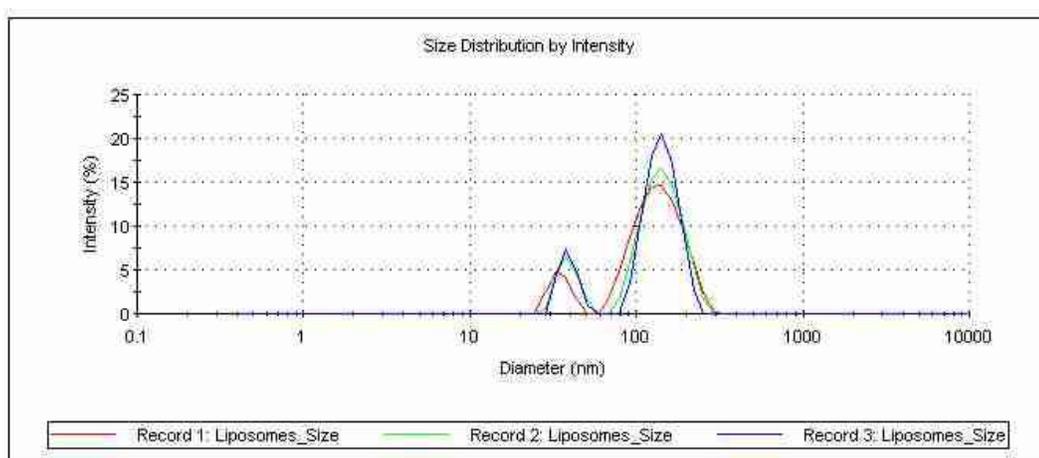


Figura 11. Determinação do tamanho de partícula da formulação LL0 (sem a levana). O gráfico é bimodal indicando a presença de duas populações de lipossomas, com tamanho de partícula de $37,46 \pm 8,92$ nm e $143,37 \pm 52,01$ nm. A primeira e a segunda população representam 15,94% e 84,06%, respectivamente. Experimento realizado em triplicata.

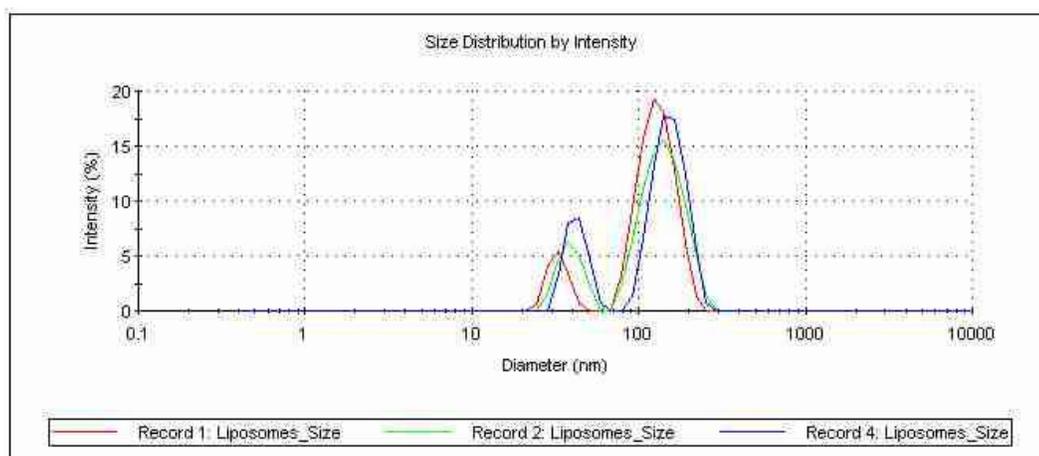


Figura 12. Determinação do tamanho de partícula da formulação LL3 (5 mg/mL). O gráfico é bimodal indicando a presença de duas populações de lipossomas, com tamanho de partícula de $38,23 \pm 12,4$ nm e $143,17 \pm 60,24$ nm. A primeira e a segunda população representam 19,72% e 80,28%, respectivamente. Experimento realizado em triplicata.

Tabela 4. Distribuição bi-modal de tamanho de partícula das formulações lipossomais. Experimento realizado em triplicata.

Formulação	População 1 (nm)	População 2 (nm)
LL0	37,46 ± 8,92 (15,94 %)	143,37 ± 52,01 (84,06%)
LL1	38,56 ± 12,40 (18,56%)	167,57 ± 64,78 (81,44%)
LL2	36,83 ± 12,42 (16,37%)	145 ± 75,01 (83,63%)
LL3	38,23 ± 12,45 (19,72%)	143,17 ± 60,24 (80,28%)
LL4	43,7 ± 13,31 (23,5%)	161,2 ± 69,76 (76,5%)
LL5	92,57 ± 36,89 (38,3%)	313,03 ± 151,28 (61,7%)

Análise do Potencial Zeta

As formulações de lipossomas (42 μmol de lipídeos/10μL de tampão PBS) contendo levana (1 a 5 mg/mL) possuem uma carga de superfície próxima dos lipossomas vazios (Figura 13), enquanto que as formulações com maior quantidade de levana (10 e 20 mg/mL) apresentaram cargas menores (Tabela 5).

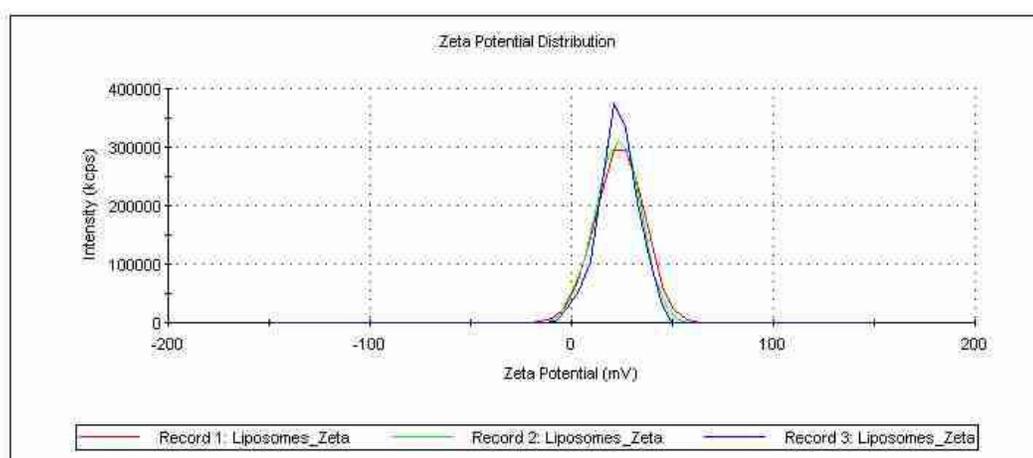


Figura 13. Determinação do Potencial Zeta da formulação lipossomal LL0 (sem levana). A carga efetiva da formulação é de $+23,03 \pm 0,69$ mV.

Tabela 5. Determinação do Potencial Zeta das formulações lipossomais.

Formulação	Potencial Zeta (mV) ¹	CV (%)
LL0	+ 23,03 ± 0,69	3,00
LL1	+ 21,33 ± 0,43	2,02
LL2	+ 21,57 ± 0,71	3,29
LL3	+ 21,81 ± 0,54	2,48
LL4	+ 17,75 ± 0,51	2,87
LL5	+ 2,51 ± 0,10	3,98

1 – Média ± desvio padrão.

A incorporação de lipídeos com cargas, tais como a esterilamina, a membranas lipossomais tem por objetivo prevenir agregação de vesículas e aumentar o volume aquoso interno entre as lamelas. O colesterol é também utilizado para compor a bicamada lipídica com o intuito de reduzir a permeabilidade entre os fosfolipídeos de membrana, resultando em aumento da rigidez da mesma (Oku, 1991).

A influência de constituintes lipídicos de membrana (lipídeos carregados positivamente ou negativamente) na estabilidade dos lipossomas contendo Penicilina G benzatina resultou em formulações carregadas de mais longa durabilidade quando comparada com lipossomas neutros. Os resultados reforçam o conceito que a presença de lipídeos carregados promove um aumento na repulsão eletrostática entre as bicamadas, aumentando a estabilidade das partículas dispersas (Pontes *et al.*, 1999).

3.2.3 Estudos de Liberação *in vitro*

Apesar de se ter utilizado 2 mL de formulação em 100 mL de tampão, o meio ainda é bastante diluído levando-se em consideração a alta solubilidade da levana F-70 em água. O doseamento da frutose constituinte da levana foi a técnica mais indicada para a avaliação da cinética de liberação da levana, pois utiliza soluções mais diluídas e não sofre interferência do tampão fosfato.

O estudo cinético da liberação da levana *in vitro* foi realizado utilizando a formulação LL5 por ser a única que alcançava a dose terapêutica de 200 mg/Kg de

peso animal, proposta por Calazans (1997), injetando volumes inferiores a 0,5 mL/dia no cobaio. O doseamento da formulação foi de 84,61% ($M_{\infty} = 33,844$ mg).

O comportamento da liberação de levana contida nas formas lipossomais está apresentado na Figura 14. Uma liberação aumentada da levana (efeito de rajada) de $10,59 \pm 3,49\%$ foi observado na primeira hora do processo cinético. Tal efeito ocorreu provavelmente devido a presença de levana não encapsulada ($\cong 11,7\%$). A cinética apresentou uma liberação lenta e constante durante 64 horas (8 – 72 horas).

A velocidade nominal de liberação da levana no trecho entre 0 e 8 horas foi de 1,83 mg/h e de 0,27 mg/h no trecho entre 8 e 72 horas. O gráfico de velocidade de liberação está descrito na Figura 15 e demonstram duas fases, onde a primeira é caracterizada pela acentuada diminuição da velocidade específica de liberação (0 – 8 horas) e a segunda pela formação de um platô, mantendo essa velocidade próxima de uma constante (8 – 72 horas).

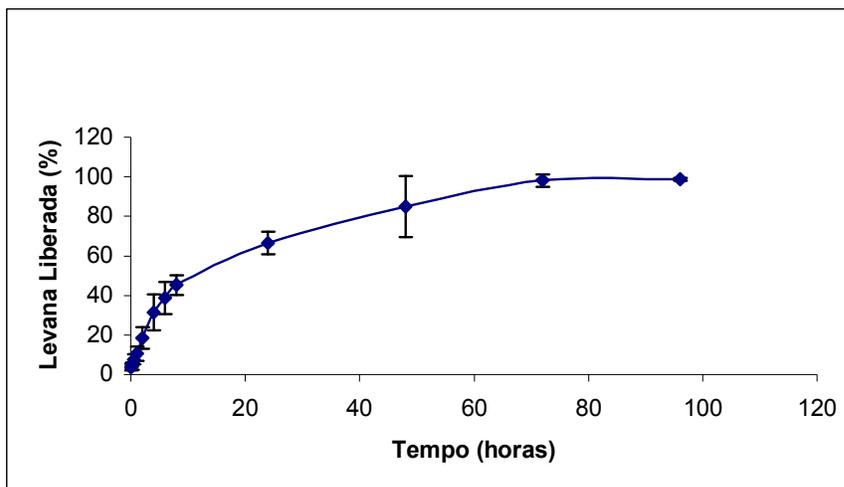


Figura 14. Cinética de Liberação in vitro da levana contida em formas lipossomais numa concentração de 20mg/mL.

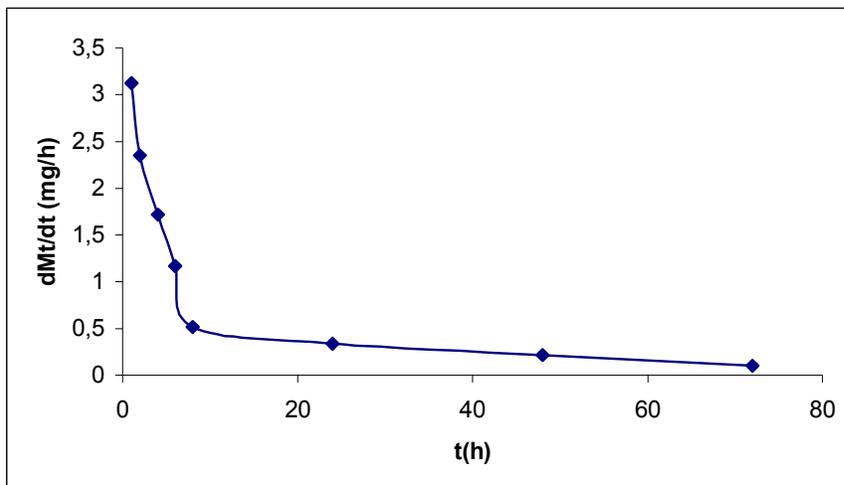


Figura 15. Gráfico da velocidade de liberação da levana contida em formas lipossomais.

3.3 DOSEAMENTO DA LEVANA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO NAS FORMAS LIPOSSOMAIS

3.3.1 Doseamento da levana na preparação lipossomal

A levana Sigma apresentou dois picos (Figura 16) com diferentes tempos de retenção (TR), o que provavelmente corresponde à presença de uma levana com dois pesos moleculares ($TR_1 = 4,65 \pm 0,16$ e $TR_2 = 6,50 \pm 0,24$), enquanto que a levana produzida pela *Zymomonas mobilis* apresentou um único pico ($TR = 6,90 \pm 0,02$) (Figura 17).

Baseando-se nos resultados, optou-se por utilizar a curva de calibração (Figura 18) no doseamento e na determinação da taxa de encapsulação, pois, além de apresentar reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, se enquadrou nas condições experimentais em comparação ao padrão Sigma.

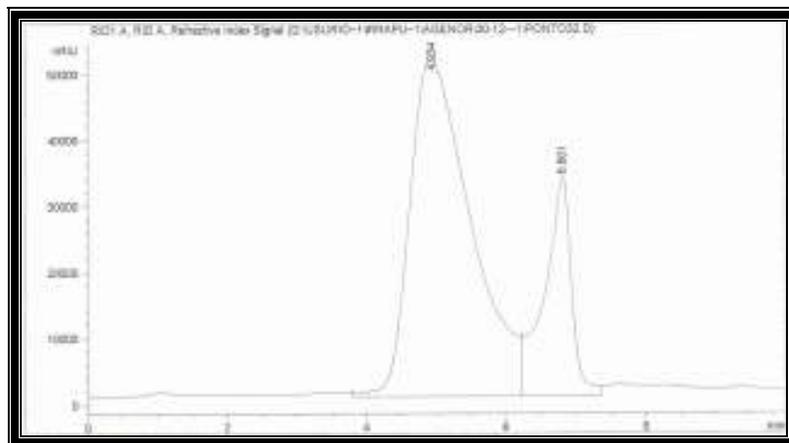


Figura 16. Cromatograma da Levana Padrão (Sigma) produzida pela *Erwinia herbicola*, utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Presença de 2 picos.

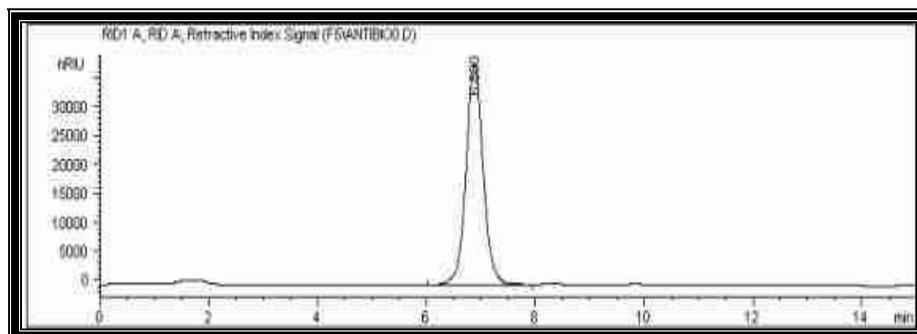


Figura 17. Cromatograma de levana produzida pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C, utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Presença de um único pico.

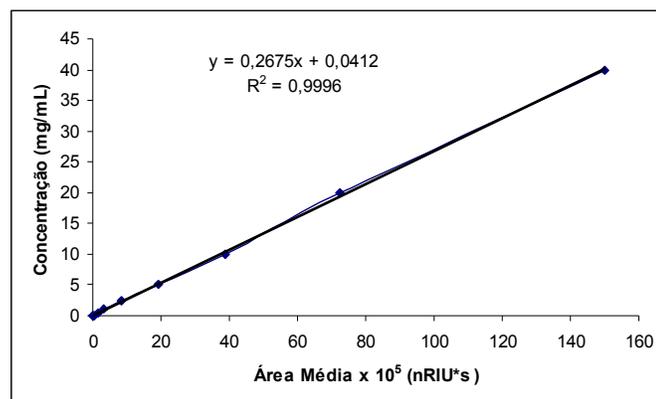


Figura 18. Curva de calibração da levana produzida pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C.

Colesterol (CH) e esterilamina (SA) não apresentaram pico quando submetidos às mesmas condições cromatográficas da levana. Já a fosfatidilcolina de soja apresentou um pico com tempo de retenção de $4,89 \pm 0,05$ minutos (Figura 19), não sendo considerado como interferente por ser retido pelas membranas ultrafree[®] (Millipore) durante a centrifugação das amostras lipossomais. Uma substância que pode ser considerada como interferente nessa técnica é o tampão fosfato (PBS) pH 7,4 utilizado para hidratar o filme lipídico e diluir a levana. O mesmo apresenta tempo de retenção de $7,10 \pm 0,11$ minutos (Figura 20). A determinação cromatográfica da quantidade de tampão presente na amostra é de extrema importância.

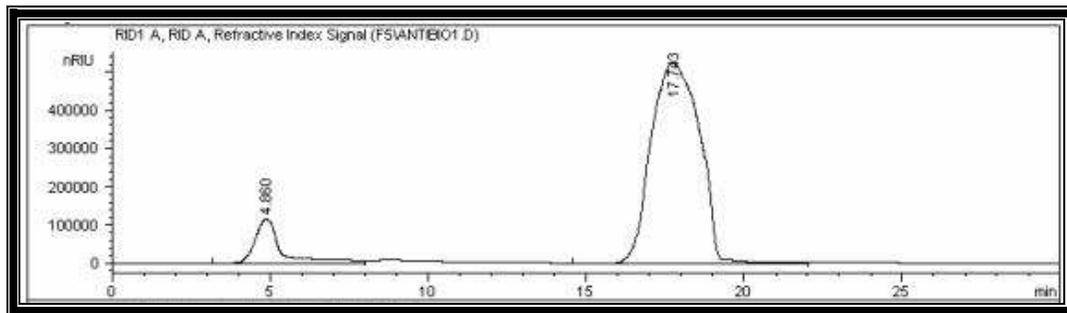


Figura 19. Cromatograma da fosfatidilcolina de soja (TR = 4,86 minutos) utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos. Segundo pico (TR = 17,743) é do metanol utilizado como diluente da fosfatidilcolina de soja.

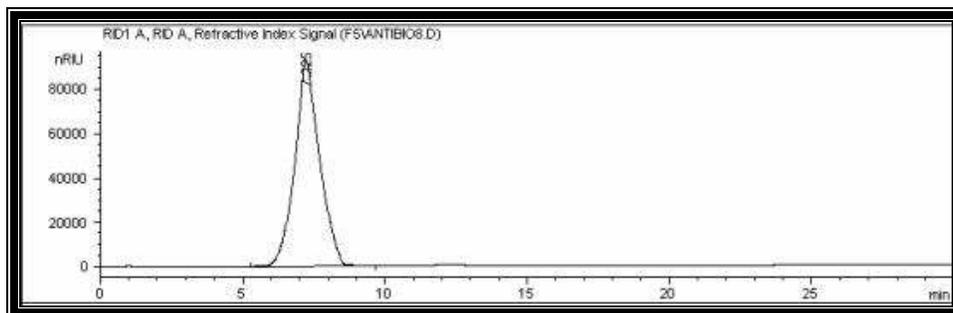


Figura 20. Cromatograma do tampão PBS (TR = 7,23 minutos) utilizando coluna cromatográfica BECKMAN U-SPHEROGEL para separação de carboidratos.

Diferentes lotes de fração 70 de levana (Tabela 6) apresentaram tempos de retenção bem próximos indicando, do ponto de vista cromatográfico, que se trata da mesma substância.

Tabela 6. Comparação de tempos de retenção (TR) de diferentes lotes de fração 70 de levana produzida por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C. Experimento em triplicata

Lote	TR1	TR2	TR3	Média ¹	CV ² (%)
L2001(NH) ³	6,60	6,62	6,63	6,62 ± 0,02	0,30
L2005(NH)	6,69	6,63	6,67	6,66 ± 0,03	0,45
L2004	6,72	6,67	6,67	6,69 ± 0,03	0,45
L2005	6,73	6,73	6,74	6,73 ± 0,01	0,15

1- Média ± Desvio padrão;

2- Coeficiente de Variância.

3- NH = Não Hidrolisado e a numeração equivale ao ano de fabricação do lote.

A quantidade dosada e a taxa de recuperação da levana presente nas formas lipossomais pode ser vista na Tabela 7.

Tabela 7. Doseamento da levana encapsulada em formas lipossomais. Experimento em triplicata.

Amostras	Quantidade Inicial de Levana (teórico) (mg/mL)	Quantidade Dosada (mg/mL) ¹	Quantidade Dosada (%)	CV ² (%)
LL1	1,0	0,91 ± 0,04	91,00	4,40
LL2	1,8	1,50 ± 0,16	83,33	10,67
LL3	5,0	4,12 ± 0,80	82,40	19,42
LL4	10,0	8,73 ± 0,60	87,30	6,87
LL5	20,0	17,19 ± 0,82	85,95	4,77

1- Média ± Desvio padrão;

2- Coeficiente de Variância.

As amostras de levana foram submetidas também à doseamento pelo método colorimétrico descrito por Roe & Papadopoulos (1954) a fim de confirmar os resultados obtidos, já que o método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizado nesse trabalho, ainda estava em teste. Foi feita uma curva padrão de frutose (D- Frutose) (Figura 21) para obter a equação da reta.

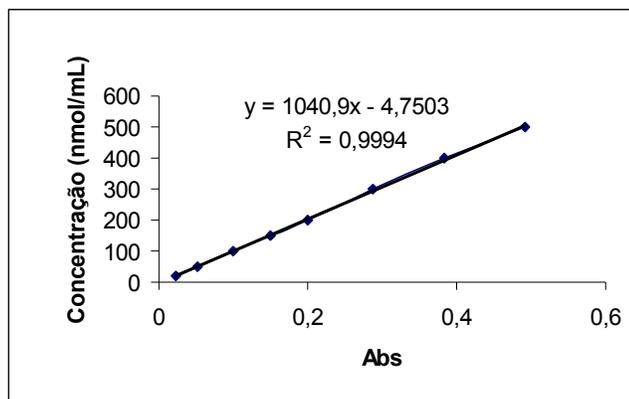


Figura 21. Curva Padrão da D-frutose analisada por método colorimétrico.

Foram testados os tempos de hidrólise, em banho-maria a uma temperatura próxima dos 100°C, da fração 70 de 10, 20, 30, 40 e 50 minutos (Tabela 8). O melhor tempo foi de 30 minutos, onde se observou a obtenção de maior quantidade de frutose. Nos tempos de 40 e 50 minutos (Tabela 8), a quantidade do monossacarídeo permaneceu semelhante ao tempo de 30 minutos. A concentração teórica da solução era de 300 nmol/mL.

Tabela 8. Determinação do melhor tempo para hidrólise total, em banho maria, da fração 70 de levana produzida por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 25°C. Experimento em triplicata.

Tempo de Hidrólise (min)	Média (nmol/mL)	CV (%)
10	176,00 ± 1	0,57
20	178,33 ± 3,21	1,8
30	216,33 ± 0,58	0,27
40	214,67 ± 1,15	0,54
50	211,67 ± 0,58	0,27

1- Média ± Desvio padrão;

2- Coeficiente de Variância.

A quantidade da frutose dosada no tempo de 30 minutos de hidrólise é de 72,11%. Essa baixa quantidade também é observada no doseamento da frutose constituinte de levana contida nas formas lipossomais (Tabela 9). Isso pode ser devido a maior quantidade de manipulações da técnica.

Tabela 9. Doseamento da frutose constituinte de levana encapsulada em formas lipossomais. Concentração inicial de frutose foi de 300 nmol/mL. Experimento em triplicata.

Amostras	Quantidade Dosada (nmol/mL) ¹	Quantidade Dosada (%)	CV ² (%)
LL1	173,85 ± 21,90	57,95	12,60
LL2	185,40 ± 5,76	61,80	3,11
LL3	156,24 ± 53,67	52,08	34,35
LL4	145,5 ± 12,60	48,50	8,66
LL5	137,16 ± 24,57	45,72	17,91

1- Média ± Desvio padrão;

2- Coeficiente de Variância.

Comparando-se o doseamento feito pelo método colorimétrico e o doseamento feito por CLAE, observa-se que CLAE, por possuir um menor número de manipulações, apresentou uma maior taxa de recuperação, além de menor tempo de processamento.

3.3.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Levana

As dosagens de levana não encapsulada realizadas espectrofotometricamente e por CLAE são mostradas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. As tabelas 13 e 14 demonstram as eficiências de encapsulação obtidas a partir dos dados destas tabelas. A Tabela 15 faz uma análise comparativa entre as TE obtida pelas duas técnicas.

Tabela 10. Doseamento por CLAE da levana não encapsulada. Experimento em triplicata.

Amostras	Quantidade Inicial de Levana (teórico) (mg/mL)	Quantidade Dosada (mg/mL)	Quantidade Dosada (%)	DP (mg/mL)	CV (%)
LL1	1,0	0,21	21,00	0,04	19,05
LL2	1,8	0,17	9,44	0,03	17,65
LL3	5,0	1,03	20,60	0,20	19,42
LL4	10,0	2,29	22,90	0,43	18,78
LL5	20,0	2,27	11,35	0,65	28,63

DP = Desvio Padrão. CV=Coeficiente de Variância

Tabela 11. Doseamento pelo método colorimétrico da frutose constituinte da levana não encapsulada. Concentração inicial de frutose foi de 300 nmol/mL. Experimento em triplicata.

Amostras	Quantidade Dosada (nmol/mL)	Quantidade Dosada (%)	DP (nmol/mL)	CV (%)
LL1	34,11	11,37	9,09	26,65
LL2	23,01	7,67	1,59	6,91
LL3	33,06	11,02	7,38	22,32
LL4	31,35	10,45	13,08	41,72
LL5	15,36	5,12	6,93	45,08

DP = Desvio Padrão. CV=Coefficiente de Variância

Tabela 12. Determinação da Eficiência de Encapsulação utilizando CLAE para dosagem de levana. Experimento em triplicata.

Amostras	T (mg/mL)	L (mg/mL)	TE (%)	DP (%)	CV (%)
LL1	0,91	0,21	76,92	3,47	4,51
LL2	1,50	0,17	88,67	1,69	1,90
LL3	4,12	1,03	75	2,79	3,72
LL4	8,73	2,29	73,76	6,37	8,64
LL5	17,19	2,27	86,79	3,29	3,79

DP = Desvio Padrão. CV=Coefficiente de Variância. T= Concentração média de levana total. L= Concentração média da levana não encapsulada

Tabela 13. Determinação da Eficiência de Encapsulação utilizando método colorimétrico para dosagem de frutose constituinte da levana. Experimento em triplicata.

Amostras	T (nmol/mL)	L (nmol/mL)	TE (%)	DP (%)	CV (%)
LL1	173,85	34,11	80,37	4,49	5,59
LL2	185,40	23,01	87,59	1,21	1,38
LL3	156,24	33,06	78,84	2,43	3,08
LL4	145,5	31,35	78,45	10,24	13,05
LL5	137,16	15,36	88,80	4,52	5,09

DP=Desvio Padrão.CV=Coefficiente de Variância. T= Concentração média de frutose constituinte de levana total. L= Concentração média de frutose constituinte da levana não encapsulada

Tabela 14. Análise Comparativa entre as Eficiências de Encapsulação calculadas a partir dos métodos cromatográfico (CLAE) e colorimétrico. Experimento em triplicata.

Amostras	CLAE (%) ¹	Colorimétrico (%) ¹
LL1	76,92 ± 3,47	80,37 ± 4,49
LL2	88,67 ± 1,69	87,59 ± 1,21
LL3	75 ± 2,79	78,84 ± 2,43
LL4	73,76 ± 6,37	78,45 ± 10,24
LL5	86,79 ± 3,29	88,80 ± 4,52

1- Média ± Desvio padrão

Aplicando os testes estatísticos ANOVA ($p < 0,005$) e Teste T ($p < 0,005$), observou-se que as médias das eficiências de encapsulação utilizando CLAE e colorimétrico para doseamento da levana e da frutose constituinte da levana, respectivamente, não são significativamente diferentes.

Com base nos resultados, pode-se afirmar que a metodologia utilizando CLAE descrita nesse trabalho, pode dosar diretamente levana em substituição a dosagem da frutose constituinte da levana, apresentando menor número de manipulações e, além disso, especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e menor tempo de processamento.

CONCLUSÕES



CONCLUSÕES

Ao final do trabalho concluiu-se que:

- É possível produzir lipossomas convencionais contendo levana como produto bioativo com potencial ação antitumoral e imunomoduladora a serem aplicados na terapia do câncer.
- O método de hidrólise ácida desenvolvido por De Paula (2001) para a obtenção de polissacarídeos de baixo peso molecular é reprodutível.
- A recuperação das frações mássicas utilizando centrifugação agiliza a construção do histograma de distribuição das frações quando comparado ao método de decantação.
- A redução do tempo de processamento estimula o emprego de forno microondas e centrifugação na hidrólise de outros polissacarídeos.
- Existe compatibilidade entre lipossomas como meio carreador e levana como carreado. Fato este evidenciado pela estabilidade apresentada pelas formulações e eficiências de encapsulação acima de 70%, mesmo utilizando uma quantidade de levana de 20 mg/mL.
- A instabilidade das formas lipossomais contendo levana está diretamente ligada à quantidade da mesma, visto que as formulações mais instáveis são aquelas com maior concentração de levana.
- A cinética de liberação *in vitro* da levana caracterizou o Lev-LIPO como um sistema de liberação lenta e controlada.
- A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) avaliada neste trabalho pode ser utilizada no doseamento da levana, apresentando vantagens como um menor número de manipulações, maior recuperação do produto e menor
- A LL2 foi a formulação de maior concentração de levana que se manteve estável em todos os testes de estabilidade.
- Apesar de decantar com 90 dias, a formulação LL3 suportou bem aos testes de estabilidade acelerada, apresentou o menor tamanho de partícula e carga de superfície próxima ao lipossoma controle (LL0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, P.Z.; BOWEN, W.H. **Immunochemical studies on levans from several strains of *Actinomyces viscosus***. *Archives of Oral Biology*, v. 35, n.1, p. 55-62, 1990.

ALLEN, T.M.; MOASE, E.H. **Therapeutic opportunities for target liposomal drug delivery**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 21, p.117-133, 1996.

ALLEN, T.M. In: Cooper E, editor. *Pharma Tech*. London: World Markets Research Center, p. 154-160, 2000.

ANSELEM S, GABIZON A, BARENMOZ Y. **Optimization and upscaling of Duxorubicin containing liposomes of clinical use**. *Journal of Pharmacology Science*, v.79, n.12:, p.1045–1052, 1993.

ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.S. **Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-445, 2004.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica : formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. Ed. Premier, 2000.

BELKIN, M.; HARDY, W.G.; PERRAULT, A. & SATO, H. **Swelling and vacuolization induced in ascites tumor cells by polysaccharides from higher plants**. *Cancer Research*, v. 19, p. 1050-1062, 1959.

BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. Wiley- Interscience Publication, 1988, 3: 47 – 75p.

BEMILLER, J.N. **Trends in Industrial Polysaccharides Research**, In: **Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides, proceeding of the 3rd international workshop on recent developments in industrial polysaccharides**. *Biomedical and Biotechnological Advances*, p. 517-534, 1990.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Ed. Guanabara Koogan, 2004, 11: 309 – 33p.

BERGSTRAND, N.; ARFVIDSSON, M.C.; KIM, J.M.; THOMPSON, D.H.; EDWARDS, K. **Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes**. *Biophysical Chemistry*, v. 104, p. 361-379, 2003.

BOBBIO, F.O & BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. Ed. Varela Ltda, 1989, cap I.

BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. **Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicles characterization and in vivo behavior**. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. v. 1196, p. 65-75, 1994.

BRANNON-PEPPAS, L. B. **Polymers in controlled drug delivery. Medical plastics and biomaterials magazine**. (1997). Disponível em: www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>. Acesso em: 17 jun 2004.

CALAZANS, G.M.T.; RIOS, E.M.; FALCÃO DE MORAIS, J.O.; SOUZA, M.F.V.Q.; MARÇAL, S.F & LOPES, C.E. **Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP, em meio sacarose**. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 32, n. 4, p. 631-636, 1989.

CALAZANS, G.M.T. **Produção de levana para uso clínico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997. 115f.

CALAZANS, G.M.T. LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C & FRANÇA, F.P. **Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains.** *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 1, p. 19-21, 1997.

CALAZANS, G.M.T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F.P.; LOPES, C.E. **Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans.** *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier, v. 27, p. 245-247, 2000.

CHENG, M.C.; WANG, K.T.; INOUE, S.; INOUE, Y.; KHOO, K.H & WU, S.H. **Controlled acid hydrolysis of colominic acid under microwave irradiation.** *Analytical Biochemistry*, v. 267, p. 287-29, 1999.

CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. **Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel – containing liposomes.** *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 19-30, 2000.

DE LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A.; GÓMEZ, M.J. & DE BENZO, Z.A. **Rapid hydrolysis of benzodiazepines to benzophenones in a microwave oven.** *Analytica chimica Acta*, Amsterdam – Printed in The Netherlands. v. 224, p. 123-126, 1989.

DE PAULA, V.C. **Obtenção de levanas de diferentes pesos moleculares, com ação antitumoral.** Relatório de iniciação científica, PIBIC, CNPq, UFPE, Recife, PE, 2001.

DE PAULA, V.C. **Hidrólise ácida da levana em forno de microondas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – 2004.

DOELLE, H.W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. & DOELLE, M.B. ***Zymomonas mobilis* – Science and industrial application.** *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 57-98, 1993.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. **Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles.** *Journal of Controlled Release*, v. 92, n. 19, p. 209-219, 2003.

DÜZGÜNES, N.; SHLOMO, N.I.R. **Mechanisms and kinetics of liposomes – all interactions.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.40, p. 3-18, 1999.

FUCHS, A. **Current and potencial food and non-food application of fructans.** In: **638th Meeting Reading of The Biochemical Society Transactions**, v. 19 n. 3, p. 555-560, 1991.

GALINDO, E. **Polisacáridos microbianos.** In: **Ramirez, R.Q. (ed), prospective de La biotecnologia en Mexico**, Fundación Javier Barros Sierra. 1985.

GIBBS, M. & DeMOSS, R.D. **Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*.** *Archives of Biochemistry and Biophysic.* v.34, p. 478-479. 1951.

GLAZER, N. & NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology**, *Fundamentals of Applied Microbiology*, 2 ed., New York; W. H. Freeman and Company, 1995.

GOURSON, C.; BENHADDOU, R.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; SAULNIER, L. & JEAN-FRANÇOIS THIBAUT, J.F. **Preparation of biodegradable plastic in microwave oven and solvent-free conditions.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry*, v. 2, n. 2, p. 75-78, 1999.

HAN, Y. W. **Microbial Levan**, *Advances in Applied Microbiology*, v. 35, p. 171-194, Academic Press, Inc. 1990.

HIBBS, J.B. **Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells *in vitro* by activated macrophages.** *Journal of The National Cancer Institute*, v. 53, n. 5, p. 1487-1492, 1974.

IWAMOTO, K. and SUNAMOTO, J. **Liposomal membranes. Adsorption of polysaccharides on liposomal membranes as monitored by fluorescence depolarization.** *Journal Biochemical*, v. 91, p. 975-979, 1982.

JOERGENSEN, L.; THESTRUP, H.N. **Determination of amino acids in biomass and protein samples by microwave hydrolysis ion-exchange chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v. 706, 421-428, 1995.

KENNEDY, J. F.; STEVENSON, D.L. & WHITE, C.A. **The chromatographic behaviour of a series of fructooligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*.** *Carbohydrate Polymers*, v. 10, p.103-113. 1989

LASIC, D.D. **Les liposomes.** *Recherche*, Paris, v. 20, n. 212, p. 904-913, 1989.

LEE, S.; CHOI, S.; KIM, E. & KOO, Y. **Continuous production of clinical dextran using two-stage reactor.** *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 5, p. 379-384, 1992.

LEIBOVICI J, & STARK, Y. **Direct antitumor effect of the polysaccharide levan in mice effects of drug concentration and time temperature of incubation.** *Journal of the National Cancer Institute*, v. 72, n. 6, p. 1417-1420, 1984.

LEIBOVICI J, KOPEL S, SIEGEL A, GAL-MOR O. **Effect of tumor inhibitory and stimulatory doses of levan, alone and in combination with cyclophosphamide, on spleen and lymph node.** *International Journal Immunopharmacology*. v. 8, p.391, 1986.

LI, B. W. Comparison of microwave oven and convection oven for acid hydrolysis of dietary fiber polysaccharide. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, v. 81, n. 6, p. 1277- 1288,1998.

LIMA, N.V.R. **Investigação sobre bioatividade de polissacarídeos**. 2001. 34f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Área de concentração: Microbiologia Aplicada). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

LO, E.H; SINGHAL, A. B.; TORCHILIN, V.P.; ABBOTT, N.J. **Drug delivery to damaged brain**. *Brain Research Reviews*, v. 38, p. 140-148, 2001.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. Ed. Prentice Hall. 2004, 3: 41 -43p.

MARGARITIS, A. & PACE, G.W. **Microbial polysaccharides**. In: *Comprehensive Biotechnology*, chapter 49 (3) 1005-1044, 1985.

MARX, S.P; WINKLER, S.; HARTMERIER, W. *FEMS Microbiology Letters*. 182:163, 2000.

MAYER, L.D.; MARCEL, B.B.; LOUGHREY, D; MASIN, D.; CULLIS, P.R. **Liposomal Vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors**. *Cancer Research*, v. 50, p. 575-579, 1990.

MEDINA, O.P.; ZHU, Y.; KAIREMO, K. **Target liposomal drug delivery in cancer**. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, n. 24, p. 2981-2989, 2004.

MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S. AND RUDOLPH, R. **Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system: Studies on the *in vitro* release behavior**. *Journal of Controlled Release*, v. 69, p. 159-168, 2000.

NEUHL, C.; MERSMANN, A. **Fractionation of polydisperse dextran using ethanol**, *Chemical Engineering Science*, v. 50, n. 6, p. 951-958, Elsevier Science Ltda, 1995.

OKU, N. Polymeric drug and drug delivery systems – Liposomas. In: 200th National Meeting of the American Chemical Society, 25-31, 1991.

OSEGUERA, M.A.; GUERECA, L. & LOPEZ-MUNGUIA, A. **Properties of levansucrase from *Bacillus circulans***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 4, p. 465-471, 1996.

OTTERLEI, M.; SUNDAN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; RYAN, L.; SMIDSROD, O.; ESPEVIK, T. *Infect Immun*, v. 61, p. 1917, 1993.

PARK, Y.K.; MORTATTI, M.P.L. and SATO, H.H. **Study on Levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on Sucrose**, *Biotechnology Letters*, v. 5, p. 516-518, 1983.

PERACCHIA, M. T., VAUTHIER, C., PUISIEUX, F. and COUVREUR, P. **Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanocrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)**. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 34, p. 317-326, 1997.

PONTES, A.O.; PISCIOTTANO CAETANO, M.N; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. **Physicochemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes**. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 419-427, 1999.

PRISTA, L.N., ALVES, A.C. and MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed, 1995, v. 3, 2064-2083p.

PRO-ONCO - Controle do câncer : uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 1993.

ROE, J.H & PAPADOPOULOS, N.M. **The determination of fructose – 6 – phosphate and fructose – 1,6 – diphosphate**. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 210, p. 703 -707, 1954.

RUDIN, A. **The Elements of Polymer Science and Engineering**. *Academic Press*, INC, Orlando, Florida, USA, cap. 12 p. 446-449, 1982.

SANTOS, C.N. e CASTANHO, M.A.R.B. **Lipossomas: A bala acertou?** *Química Nova*, v. 25, 6B, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A. ; PEREIRA, V. M. W. ; CAETANO, M. N. P. **Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAPRA, P. & ALLEN, T.M. **Ligant-target liposomal anticancer drugs**. *Progress in lipid Research*, v. 42, p. 439-462, 2003.

SCAFFIDI, C.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P. H. & PETER, E. M. **Apoptosis signaling in lymphocytes**. *Curr Opin Immunol* , v. 11, p. 277– 285. 1999.

SCARPA, M.V., OLIVEIRA, A.G. and CUCCOVIA, I.M. **Estrutura e propriedades físico-químicas de lipossomas**, *Infarma*, v. 7, n. 1/2, p. 4-7, 1998.

SHARMA, A.; MAYHEV, R.M. **Antitumor effect of taxol – containing liposomes in a taxol – resistant murine tumor model**. *Cancer Res.*, v. 53, p. 5877-5881, 1993.

SILVA, G. A. **Introduction to nanotechnology and its applications to medicine**. *Surgery Neurology*, v. 61, p. 216-220, 2004.

SINGH, V.; TIWARI, A.; TRIPATHI, D.N. & MALVIYA, T. **Microwave promoted methylation of plant polysaccharides**. *Tetrahedron Letters*, v. 44, p. 7295-7297, 2003.

SMEEKENS,S.; ANGENENT, G.; EBSKAMP, M. & WEISBEEK, P. **Molecular biology of fructan accumulation in plants**. *Biochemical Society Transaction*. In: 638th Meeting Reading, v.19, n. 3, p. 565-569. 1991.

SRINATH, P. & DIWAN, P.V. **Stealth liposomes – an overview**. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 26, p. 179-184, 1994.

STARK Y, LEIBOVICI J. **Different effects of the polysaccharide levan on the oncogenicity of cells of two variants of Lewis lung carcinoma**. *Br J Exp Pathol*. v. 67, p.141, 1986.

SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**. *Cambridge University Press*, 1990.

SUTHERLAND, I. W. **Biosynthesis of microbial exopolysaccharides**. *Advances in Microbial Physiology*, v. 23, p. 79-160, 1992.

SUTHERLAND, I. W. **Novel and established application of microbial polysaccharides**, *Trends in Biotechnology*, V. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H. *et al*. **Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains**. *Appli. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 3008-3014, 1999.

VERMA, R.K.; KRISHNA, D.M; GARG, S. **Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems**. *Journal of Controlled Release*, v. 79, n. 19, p. 7-27, 2002.

VIIKARI, L. **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas***. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 237-258, 1988.

WHISTLER, R.; CORBETT, W. M. **Polysaccharides, In: Carbohydrate**. Edited by Ward Pigman, *Academisc Press*, New York, p. 64-732, 1957.

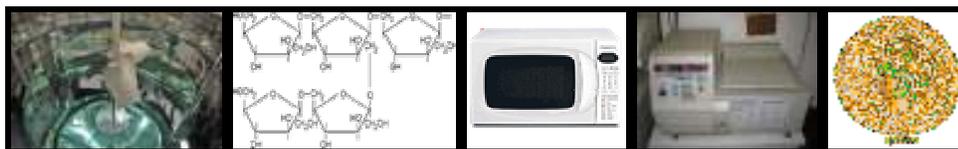
WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A. A.; SINGH, P.P.; NAKAHARA, W & TOKUZEN, R. **Noncytotoxic, Antitumor Polysaccharides**. In: Tipson, R.S.; Horton, D. (Eds), *Advances In Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. New York, Academic Press, v. 32, p. 235-275, 1976.

WOODLE, M.C.; STORM, G. **Long-circulating liposomes: old drugs new therapeutics**. *Landes Bioscience*, Georgetown, p.1-206, 1998.

YAMADA, H. In: **Pectin and Pectinoses**. Visser J, Voragen AGJ, editors. New York: *Elsevier Science*. p.173, 1996.

YOO, S.H.; YOON, E. J; CHAC, J.; LEE, H. G. **Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms**. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.34, p. 37–41, 2004.

ANEXOS



ANEXOS

RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS

TORRES, Clarisse Franco; SALVIANO, Taciana Lima; JÁCOME-JÚNIOR, Agenor Tavares; CALAZANS, Glícia Maria Torres; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. **Desenvolvimento Lipossomas Contendo Levana Como Imunomodulador**. In: XIII Congressos de Iniciação Científica (CONIC), 2005, Recife-PE. 2005. Categoria : Poster ; Participação : Autor.

TORRES, Clarisse Franco; SALVIANO, Taciana Lima; JÁCOME-JÚNIOR, Agenor Tavares; CALAZANS, Glícia Maria Torres; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. **Desenvolvimento Lipossomas Contendo Levana como Imunomodulador**. In: I Jornada Científica LIKA/UFPE, 2005, Recife-PE. 2005. Categoria : Poster ; Participação : Autor.

JÁCOME-JÚNIOR, Agenor Tavares; TORRES, Clarisse Franco; SALVIANO, Taciana Lima; CALAZANS, Glícia Maria Torres; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. **Uso de Formas Lipossomais na Avaliação da Atividade Antitumoral da Levana** . In: I Jornada Científica do LIKA/UFPE, 2005, Recife-PE. 2005. Categoria : Poster ; Participação : Apresentação. Trabalho foi **PREMIADO** por parte dos avaliadores da referida Jornada.

JÁCOME-JÚNIOR, Agenor Tavares; TORRES, Clarisse Franco; SALVIANO, Taciana Lima; ARAUJO, Paula Regina Luna ; CALAZANS, Glícia Maria Torres; SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela. **Development and Characterization of Levam-Loaded Liposomes**. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia –SP, 2006. Categoria: Pôster. Participação: Apresentação

JÁCOME-JUNIOR, Agenor Tavares.; SALVIANO, Taciana Lima; PINHEIRO, Irapuan Oliveira. SANTOS-MAGALHÃES, Nereide Stela; CALAZANS, Glícia Maria Torres. **Análise Comparativa entre Colorimetria e CLAE para Doseamento de Levana**. In: II Encontro Brasileiro sobre Tecnologia na Indústria Química, 2006, São Paulo –SP, 2006.

JÁCOME-JUNIOR, Agenor Tavares.; SALVIANO, Taciana Lima; PINHEIRO, Irapuan Oliveira; CALAZANS, Glícia Maria Torres. **Otimização da Obtenção e Recuperação de Polissacarídeos de Baixo Peso Molecular com Atividade Antitumoral**. In: II Encontro Brasileiro sobre Tecnologia na Indústria Química, 2006, São Paulo –SP, 2006.

PRÊMIO

I Jornada Científica do LIKA/UFPE, 2005, Recife-PE. 2005