

Métodos de preparação de lipossomas

ELAISE GONÇALVES PIERRI¹, MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO²

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

2. Professor Assistente Doutor do Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 - 14801-902 – Araraquara, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Lipossomas são estruturas em forma de vesículas microscópicas, formadas basicamente por fosfolípídeos organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos (Figura 1). Foram usados inicialmente como modelos de membrana biológica. A partir da década de 70, a utilização de sistemas como lipossomas tem sido amplamente estudada como veiculadores de fármacos, com o objetivo de aumentar a eficiência destes.

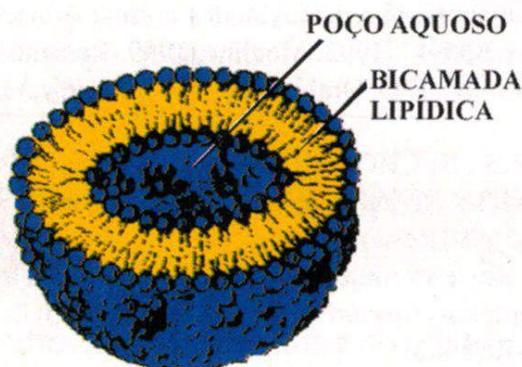
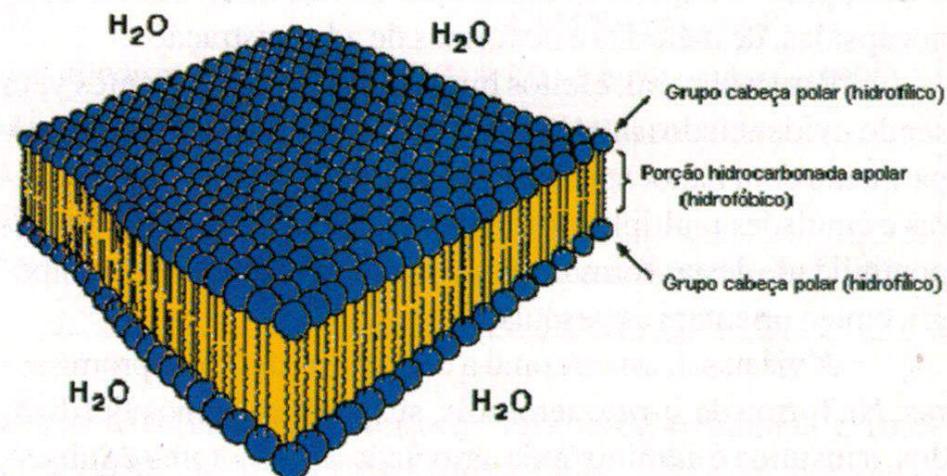
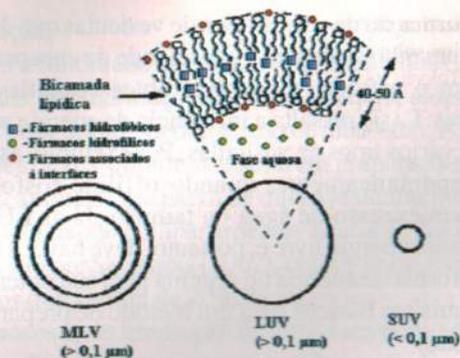


Figura 1 - Estrutura de lipossoma unilamelar

As bicamadas lipídicas dos lipossomas têm estrutura similar àquelas encontradas nas membranas de células vivas, sugerindo a analogia entre as bicamadas lipídicas dos lipossomas (Figura 2).



Devido às propriedades anfifílicas, os lipossomas podem incorporar substâncias ao compartimento aquoso, na bicamada ou ainda particionar entre esses dois compartimentos (Figura 3).



O propósito da utilização dos lipossomas é aumentar o aporte de fármacos às células ou tecidos específicos, consequentemente, aumentando a potência e/ou reduzindo a toxicidade do agente encapsulado.

Os lipossomas são formados espontaneamente, quando lipídeos anfifílicos são dispersos em água. Os fosfolipídeos, quando em contato com excesso de água, se agregam para formar bicamadas, que se fecham sobre si mesmas, formando estruturas esféricas onde uma ou várias bicamadas fosfolipídicas englobam parte do solvente no seu interior. As moléculas lipídicas se organizam, expondo sua cabeça polar em direção à fase aquosa, enquanto que as porções hidrocarbonadas apolares dispõem-se juntas na bicamada, formando uma película lipídica, concêntrica, separada pelos compartimentos aquosos.

Todos os fosfolipídeos têm uma T_G (Temperatura de transição de fase) característica, a qual depende da natureza do grupo polar, além do comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbonadas. Acima da T_G , os fosfolipídeos estão na fase líquida-cristalina, caracterizada por uma maior mobilidade das cadeias. Abaixo da T_G ocorre a transição para um estado mais rígido (gel), resultando numa restrição da mobilidade. A formação de lipossomas estáveis, a partir de fosfolipídeos, só é possível a temperaturas acima da temperatura de transição de fase (gel-líquido cristalino) (T_G).

CLASSIFICAÇÃO

I) Quanto ao tamanho e número de bicamadas:

- **Lipossomas Multilamelares (MLV):** formados pela hidratação de fosfolipídeos secos em excesso de água, originam várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Seu diâmetro varia, de acordo com o número de lamelas, podendo ir de 400 a 3.500 nm (capacidade de encapsulação de até 4,1 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipídeo).

- **Lipossomas Unilamelares Pequenos (SUV):** Entre outros métodos, podem ser formados pela ultra-sonicação de dispersões de fosfolipídeos em água constituídos por apenas uma bicamada e um pequeno compartimento aquoso. Seu diâmetro varia de 20 a 50 nm (capacidade de encapsulação de apenas 0,5 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipídeo).

- **Lipossomas Unilamelares Grandes (LUV):** Podem ser produzidos por evaporação de fase reversa, constituídos por apenas uma bicamada, mas com grande cavidade aquosa. Seu diâmetro varia de 200 a 1.000 nm (capacidade de encapsulação chega a 13,7 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipídeo).

Os fármacos podem alterar significativamente as propriedades dos lipossomas, de maneira que sua composição necessita ser otimizada para cada fármaco e indicação.

II) Com relação as características de interação com sistemas biológicos:

- Lipossomas Convencionais (reatividade inespecífica)
- Lipossomas "Stealth" (inertes ou estabilizados estericamente)
- Lipossomas Direcionados ou "Target Liposome" (com reatividade específica devido a presença de compostos que vão direcionar os lipossomas para um sítio específico)
- Lipossomas Polimórficos (reativos devido a mudança na sua estrutura) Ex: lipossomas sensíveis ao pH, lipossomas catiônicos.

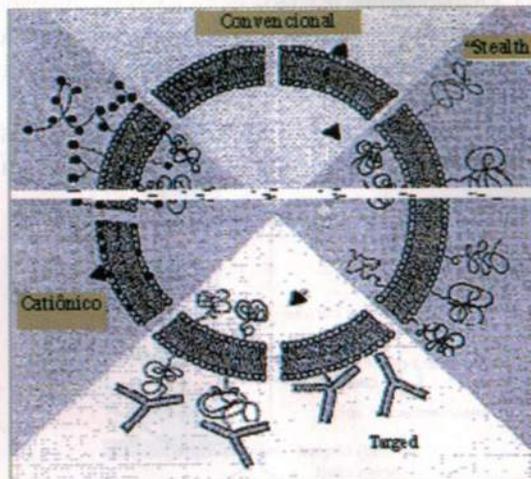


Figura 4 – Representação esquemática dos tipos de lipossomas.

CONSTITUINTES ESTRUTURAIS

Os lipossomas podem ser formados, a partir de vários fosfolipídeos: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, etc. O mais usado é a fosfatidilcolina, pura ou em combinação com colesterol.

FOSFOLIPÍDIOS: consiste de uma cadeia principal de glicerol, os glicerofosfolipídeos, com suas funções álcool esterificadas pelos ácidos graxos que formam a porção hidrofóbica da molécula. A outra extremidade comporta um grupo polar, que constitui a "cabeça polar" do lipídeo (geralmente um fosfato, no caso de fosfolipídeo). Os ácidos graxos são principalmente aqueles com 16 ou 18 carbonos, e podem possuir uma ou mais insaturações, não conjugadas. A fosfatidilcolina (Figura 5) é a mais comumente utilizada conhecida também como lecitina de soja ou de ovo.

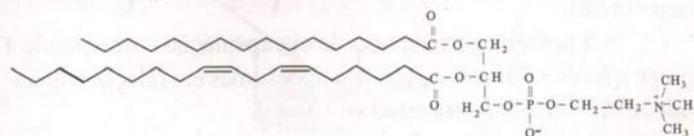


Figura 5 – Estrutura química da fosfatidilcolina

ESTERÓIDES: são lipídeos estruturais presentes nas membranas da maioria das células. Abundante nos tecidos animais, localizando-se primariamente nas membranas celulares. Lipossomas sem colesterol interagem rapidamente com as proteínas plasmáticas (albumina, transferrina), que tendem a extrair os fosfolipídeos estruturais dos lipossomas, depletando a monocamada externa das vesículas, levando a uma instabilidade física

da preparação. Sua inclusão na parede dos lipossomas exercem 3 efeitos:

- diminui a fluidez e aumenta a microviscosidade da bicamada
- diminui a permeabilidade da membrana a moléculas hidrossolúveis
- estabiliza a membrana na presença de fluidos biológicos, como o plasma

Todos os métodos empregados na preparação dos lipossomas envolvem algumas etapas comuns (Figura 6):

1. Dissolução dos lipídeos em um solvente orgânico;
2. Evaporação do solvente orgânico;
3. Dispersão dos lipídeos secos em uma solução aquosa;
4. Dissolução da substância a encapsular na solução orgânica ou na solução aquosa, em função do seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo;
5. Eliminação das substâncias não encapsuladas através de técnicas de separação (filtração em gel, diálise, centrifugação);
6. Análise do produto final.

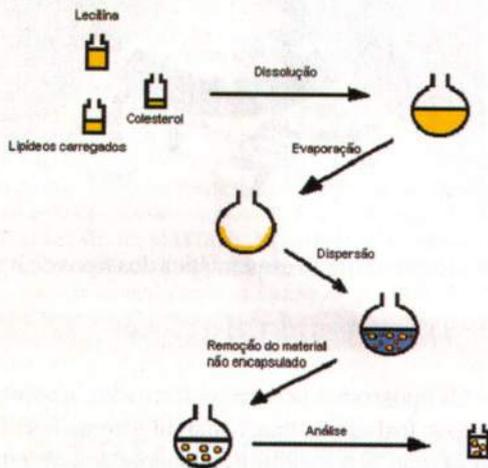


Figura 6 - Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas.

Os vários métodos de preparação de lipossomas diferem entre si geralmente pelo modo de dispersão dos fosfolipídeos na fase aquosa. Para uma melhor comparação entre os métodos de preparação, é importante descrever algumas das características principais na preparação de vesículas. As características que mais refletem as variações decorrentes dos diferentes métodos são aquelas envolvendo a encapsulação das substâncias pelas vesículas. A eficácia de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras:

- A porcentagem ou taxa de encapsulação corresponde a proporção de soluto associada aos lipossomas em relação à quantidade inicialmente encontrada no meio;
- A massa de substância encapsulada pela unidade de massa de lipídeo corresponde à quantidade de soluto encapsulado ($\mu\text{g/mol}$ ou $\mu\text{g/mg}$);
- O volume aquoso encapsulado corresponde ao volume ou a massa de fase aquosa encapsulada por unidade de massa de lipídeo ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$).

MÉTODOS DE OBTENÇÃO

Os métodos de preparação de lipossomas são numerosos

e levam à formação de vários tipos de vesículas que diferem entre si pelo tamanho, estrutura e capacidade de encapsulação. De acordo com o método, é possível obter vesículas multi ou unilamelares. LASIC ressalta a influência da energia sobre a formação dos vários tipos de vesículas. Por exemplo, as MLV formam-se espontaneamente, quando o filme fosfolipídico é hidratado em excesso de água ou tampão. Já as LUV e SUV, possuem maior energia livre e, portanto, deve haver a dissipação de alguma forma de energia no sistema para sua obtenção.

Requisitos básicos para um método de preparação ideal de lipossomas:

- simples
- padronizado
- reprodutível
- com boa relação custo/eficácia
- o produto obtido deve ser estável e homogêneo por um período de tempo suficiente
- capaz de produzir lipossomas homogêneos em pequena e larga escala
- o tamanho dos lipossomas deve ser controlável

1) DISPERSÃO MECÂNICA

1.1) Hidratação de filme lipídico

Uma solução aquosa é adicionada a um filme de fosfolipídeos obtidos pela evaporação de um solvente orgânico onde os fosfolipídeos estavam solubilizados. A dispersão é facilitada pela utilização de um vórtex e/ou pela introdução de pérolas de vidro no balão. O filme fosfolipídico, em contato com a solução aquosa, engolfa parte dela, até que se desloca das paredes do balão para formar espontaneamente as vesículas.

O diâmetro das vesículas obtidas é bastante elevado, da ordem de alguns micrômetros, e a distribuição de tamanho é muito heterogênea. Dependendo da energia empregada (agitação leve, vórtex, natureza do fosfolipídeo, força iônica, natureza dos íons, concentração, pureza), formam-se MLV de diferentes distribuições de tamanhos.

No caso de uma leve agitação, o diâmetro, a lamellaridade, e distribuição de tamanho dos lipossomas variam dentro de uma ampla faixa (0,1 a várias dezenas de μm). Uma distribuição de tamanho relativamente bem definida (1 - 4 μm) pode ser obtida se a energia adicionada ao sistema (vórtex por 10 min) assim como, a composição e a concentração forem rigorosamente controladas.

O volume aquoso encapsulado varia entre 0,5 e 4,1 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de fosfolipídeo. As taxas de encapsulação obtidas por este método variam de 2 a 15%. Segundo MAIERHOFER, 1988, o índice de encapsulação das vesículas obtidas por este método é mais elevado quanto mais lentamente for realizada a hidratação. A adição de fosfolipídeos carregados origina um aumento na distância entre as bicamadas lipídicas, reduzindo a tendência à agregação das MLV após sua formação.

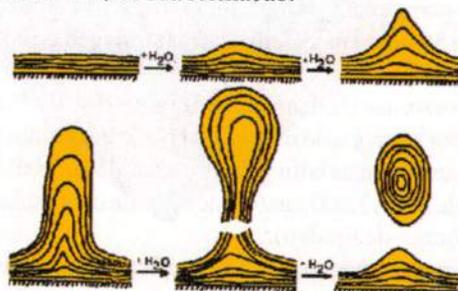


Figura 7 - Hidratação do filme lipídico seco

1.2) Sonicação

Com a finalidade de reduzir o diâmetro dos lipossomas MLV obtidos por hidratação do filme lipídico, a dispersão de lipossomas pode ser submetida à ação de ultra-som. A sonicação de dispersões de fosfolípidos resulta em preparações com baixa turbidez, as quais consistem de microvesículas de bicamada lipídica circundando compartimentos aquosos. Por este método, introduzido por SAUNDERS (1962), obtêm-se lipossomas SUV de diâmetros que variam de 20 a 50 nm.

O processo de irradiação de ultra-som pode ser feito por sonicadores de banho ou por sonda (Figura 8). Este último é mais eficiente que o de banho para reduzir o tamanho dos lipossomas. Entretanto, os aparelhos do tipo TIP, que possuem sondas metálicas de titânio de onde partem as ondas de ultra-som, podem liberar resíduos do metal, promovendo a degradação do lipídeo estrutural da vesícula.

Os sonicadores de banho evitam este problema, mas os detalhes experimentais requerem maior atenção, como o tempo de sonicação, a forma do recipiente usado para conter os lipídeos, volume da solução e a posição do recipiente no banho para obter vesículas com menor diâmetro possíveis e reprodutíveis.

Na preparação de SUV por esta técnica, é essencial que a sonicação seja efetuada numa temperatura superior à T_G do lipídeo de mais alto ponto de fusão na mistura e que as vesículas permaneçam acima da T_G por pelo menos 30 min. para formar uma preparação estável. Abaixo da T_G , formam-se estruturas semelhantes a agregados de SUV com defeitos na bicamada.

O alto raio de curvatura destas vesículas proporciona uma maior percentagem de fosfolípidos na monocamada externa (60-70%) comparado a monocamada interna, levando a uma distribuição assimétrica dos componentes lipídicos nas bicamadas quando são utilizadas misturas.

Em relação ao volume de encapsulação no espaço aquoso, as SUV são limitadas com valores na faixa de 0,2 a 1,5 μl / μmol de lipídeo, variando com a composição lipídica da vesícula e o tempo de sonicação. Apresenta taxa de encapsulação baixa entre 0,1 e 1%. A inclusão de colesterol aumenta o volume de captura. O pequeno espaço aquoso limita o tamanho das macromoléculas que podem ser encapsuladas (até 40.000 daltons).

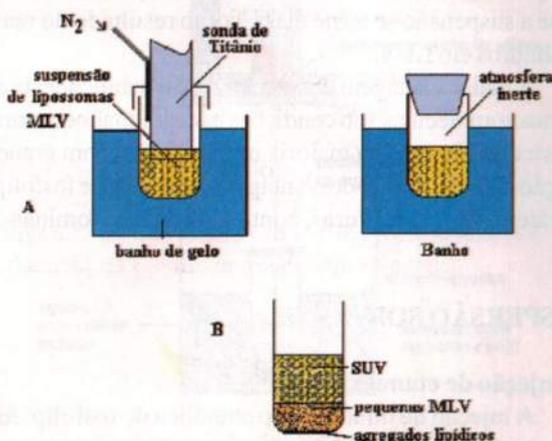


Figura 8 – Método de obtenção de lipossomas por sonicação.

1.3) Extrusão

Estas técnicas baseiam-se na utilização de uma prensa ou de membranas de policarbonato.

a) “French pressure cell”

Neste processo uma pressão da ordem de 20.000 psi (libras/pol²) é exercida sobre um pistão que penetra em um reservatório cilíndrico através de um orifício (Figura 9). A fragmentação dos lipossomas ocorre devido as forças de cisalhamento que atuam sobre as membranas das MLV. Após 4 a 5 passagens, 95% das vesículas são SUV, com diâmetro variando de 30 a 50 nm. Os volumes encapsulados são pequenos, mas a possibilidade de utilizar altas concentrações de lipídeos permite obter uma taxa de encapsulação da ordem de 5 a 25%. É um método simples e reprodutível, não havendo limitações quanto ao volume a utilizar permitindo o emprego para escala industrial.

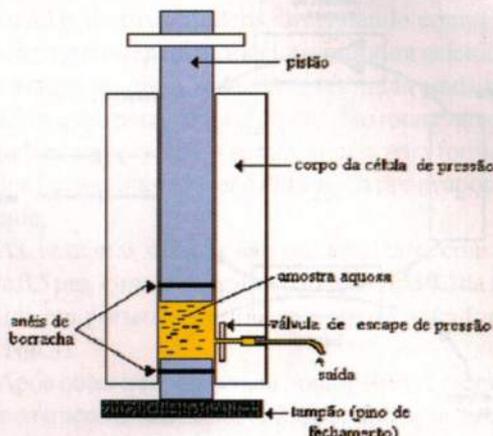


Figura 9 - “French Pressure Cell”

b) Extrusão de membrana

Esse método consiste em calibrar o tamanho dos lipossomas forçando-os a passar através de uma membrana de policarbonato, cujo diâmetro dos poros é bem definido (Figura 10).

Os lipossomas são filtrados em membranas com poros decrescentes (1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 μm), e são do tipo MLV com diâmetro médio de 0,27 μm . O volume aquoso encapsulado está entre 1 e 3 μl / μmol de lipídeos e taxa de encapsulação de 5 a 30%.

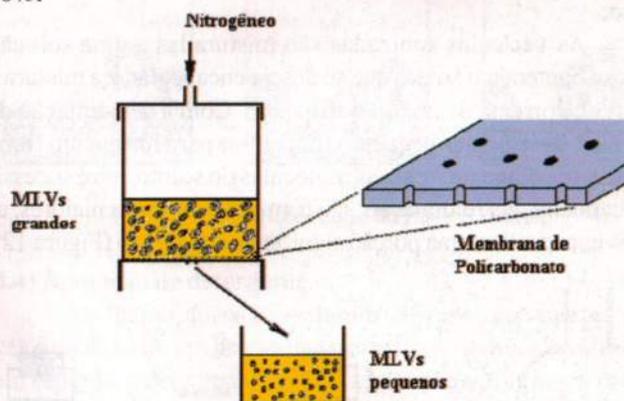


Figura 10 - Extrusão por membrana de policarbonato.

1.4) Microfluidização

Essa técnica usa a força de duas correntes de dispersões de lipossomas que colidem entre si sob alta pressão, reduzindo o tamanho das vesículas, permitindo homogeneizar dispersões de lipossomas MLV (Figura 11).

No microfluidizador, a dispersão de vesículas passa, por intermédio de uma bomba, sob forte pressão (10.000 psi), através de

um filtro com poros de 5 µm de diâmetro, chegando a uma câmara de interação. O fluido é separado em dois canais que se reencontram no alto da câmara, a uma velocidade superior a 500 m/s.

A colisão de vesículas que se produz é acompanhada por uma transferência de energia elevada. O choque das partículas entre si provoca a ruptura das vesículas grandes que se reorganizam em vesículas pequenas e de tamanho homogêneo. Desta maneira, após cerca de duas passagens, os lipossomas obtidos são SUV, com diâmetro inferior a 0,1 µm. Esse método permite produzir grandes quantidades de lipossomas na presença de concentrações elevadas de fosfolipídeos (20%). A taxa de encapsulação chega a 70%.

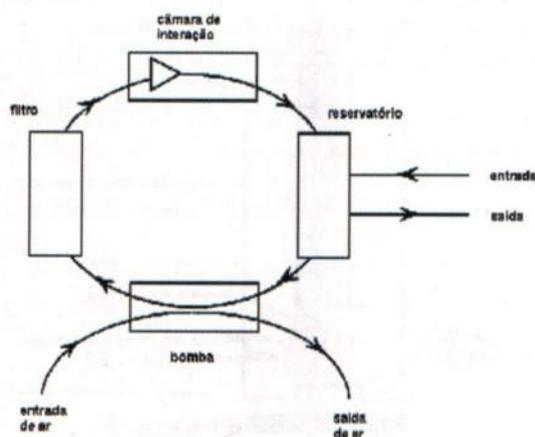


Figura 11 – Microfluidização

1.5) Desidratação-reidratação

Consiste em dispersar, numa solução aquosa, os lipossomas previamente liofilizados. Compreende várias etapas:

- prepara-se lipossomas por uma das técnicas descritas anteriormente;
- a solução aquosa contendo o soluto a encapsular é adicionada aos lipossomas e liofilizada;
- após reconstituição em solução aquosa, são obtidos lipossomas com diâmetro inferior a 1 µm e com 40% de encapsulação;

As vesículas sonicadas são misturadas a uma solução aquosa contendo o soluto que se deseja encapsular, e a mistura é seca sob corrente de N₂ (ou liofilizada). Com a desidratação da amostra, as vesículas pequenas fundem-se para formar um filme multilamelar que intercala as moléculas do soluto entre sucessivas camadas. Na reidratação, são formadas vesículas maiores, as quais encapsulam uma porção significativa do soluto (Figura 12).

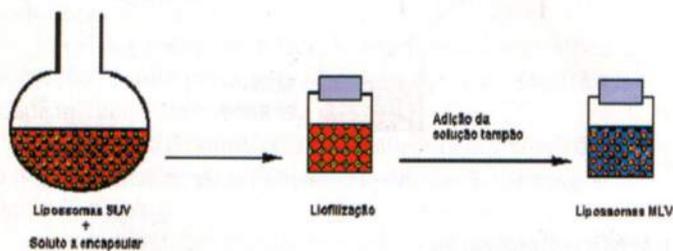


Figura 12 - Deidratação-Reidratação

1.6) Congelamento-descongelamento

Nesta preparação, os lipossomas SUV e o soluto a encapsular são congelados em nitrogênio líquido e depois deixa-

dos à temperatura ambiente, por 15 min. E, então, sonicados. Formam-se LUV, com um volume de encapsulação de 10 µl/µmol de lipídeos, e taxa de encapsulação de 30%. Por esta técnica, é praticamente impossível preparar lipossomas com fosfatidilcolina pura, pois a presença de uma carga é fundamental. Crioprotectores como sacarose ou cátions divalentes ou soluções de elevada força iônica inibe o processo de fusão das vesículas que pode ocorrer.

Este método leva à obtenção de uma preparação heterogênea de vesículas, a maioria unilamelares, com tamanho que varia de 50 a 500 nm. A formação de lipossomas maiores resulta da fusão das pequenas vesículas, durante o congelamento e/ou descongelamento da dispersão de SUV.

1.7) Vesiculação induzida por ajuste de pH

Pode-se induzir a reorganização de MLV em vesículas unilamelares, sem a necessidade de sonicação ou alta pressão, simplesmente alterando o pH. Este processo denominado vesiculação induzida por pH é um fenômeno eletrostático. A alteração de pH provoca um aumento nas cargas superficiais da bicamada lipídica, causando uma vesiculação espontânea.

1.8) Fusão induzida por cálcio

Procedimento baseado na observação de que a adição do cálcio a SUVs apropriadas induz a fusão e resulta na formação de grandes estruturas cilíndricas, multilamelares em uma configuração espiral (cilindros de coquelatos). A adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a estas preparações produz grandes vesículas esféricas unilamelares. Uma variedade de fosfolipídeos ácidos pode ser usada nesta preparação, incluindo o ácido fosfatídico, o fosfatidilglicerol e a fosfatidilserina, com ou sem colesterol.

A preparação de LUVs começa com SUVs pré-formadas, que são então misturadas por diálise com uma solução contendo cálcio, ou recebem diretamente a adição de cloreto de cálcio. Nos dois casos, as SUVs se fundem em estruturas coqueladas, formando um precipitado branco floculante, a qual pode ser removido e coletado por centrifugação. Este precipitado é ressuspenso em um volume mínimo de solução contendo o material a encapsular, e então adiciona-se uma solução 0,1M de EDTA até que a suspensão se torne clara, como resultado do rearranjo dos cilindros em LUV.

A maior vantagem desse método é a habilidade de encapsular macromoléculas sob condições excepcionalmente brandas. As vesículas são em sua maioria unilamelares, com grande distribuição de tamanho. A desvantagem é que requer fosfolipídeos de caráter ácido ou misturas, contendo uma predominância deles.

2) DISPERSÃO SOLVENTE

2.1) Injeção de etanol

A injeção de uma solução etanólica de fosfolipídeos em uma solução aquosa leva à formação espontânea de lipossomas unilamelares de tamanho reduzido (Figura 13). Os lipídeos secos são dissolvidos em etanol e injetados, por meio de uma seringa de vidro ou bomba peristáltica, em uma solução aquosa sob agitação. O diâmetro dos lipossomas depende da volume de injeção, da velocidade de agitação e da concentração de fosfolipídeos no etanol. Uma injeção rápida permite obter vesículas

com diâmetro médio de 27 nm, enquanto que uma injeção lenta leva a formação de vesículas com diâmetro superior a 120 nm.

A concentração final de etanol não pode exceder de 10% em volume, neste caso as SUV não se formam. O etanol residual é de difícil remoção, pois forma uma mistura azeotrópica com a água.

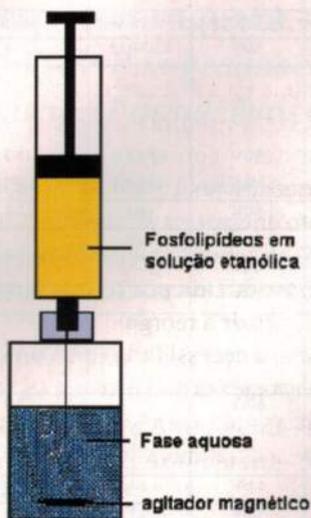


Figura 13 - Injeção de Etanol

2.2) Infusão de éter

Neste método os fosfolídeos são dissolvidos em éter ou uma mistura éter/metanol (Figura 14). A solução é então injetada por meio de uma seringa, a uma velocidade de 0,2 ml/min, numa solução aquosa aquecida a 55-65°C (acima do ponto de ebulição do éter) ou a 30°C sob pressão reduzida. A concentração de lipídeo empregada é de 2 mg/ml, e 2 ml desta solução são injetados a 4 ml de solução aquosa. A eliminação do éter por evaporação leva a obtenção de lipossomas unilamelares cujo diâmetro varia entre 150 e 200 nm.

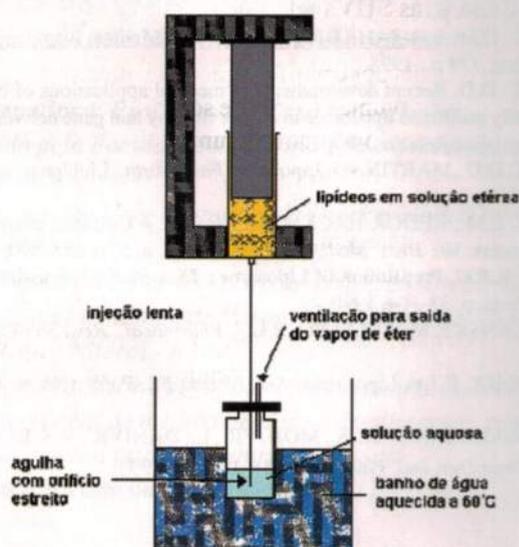


Figura 14 - Infusão de Éter.

2.3) Evaporação de fase reversa

Este método desenvolvido por SZOKA E PAPAHDJOPoulos, permite preparar lipossomas LUV com um grande compartimento aquoso. Os fosfolídeos são dissolvidos em solvente orgânico, como éter etílico, propílico ou uma mistura de solven-

tes (éter propílico/clorofórmio 1:1, V/V), ou ainda em fluorcarbonetos abaixo do ponto de fusão. A fase aquosa (tampão) é adicionada a fase orgânica a uma razão de 1/3 (fase aquosa/fase orgânica) se o solvente for o éter etílico, ou de 1/6 no caso da mistura éter propílico/clorofórmio.

Neste momento, os fosfolídeos se dirigem para a interface das duas fases imiscíveis. Após 5 min de sonicação, forma-se uma emulsão A/O, na qual os fosfolídeos se organizam na forma de micelas inversas, circundando os compartimentos aquosos. A eliminação do solvente por evaporação sob pressão reduzida (200-400 mmHg) leva à aproximação dessas micelas inversas, seguida da formação de um gel.

Ao longo dessa etapa, as micelas inversas, formadas por monocamadas de fosfolídeos circundando compartimentos aquosos, agregam-se para formar uma estrutura geleificada compacta. Na etapa seguinte, a pressão é reduzida ainda mais a fim de favorecer a evaporação total do éter. No momento da ruptura da fase gel, as monocamadas se aproximam para formar as bicamadas dos lipossomas. O éter é eliminado por evaporação total do solvente.

As vesículas obtidas são unilamelares, com diâmetro médio de 0,5 µm. Uma encapsulação máxima (65%) da fase aquosa é obtida em presença de uma solução de fraca força iônica (0,01M NaCl).

Após obter uma dispersão homogênea, é recomendável remover os traços finais do solvente, por diálise ou cromatografia, em coluna de exclusão. Isto eliminará a tendência das vesículas recentemente preparadas de se agregarem.

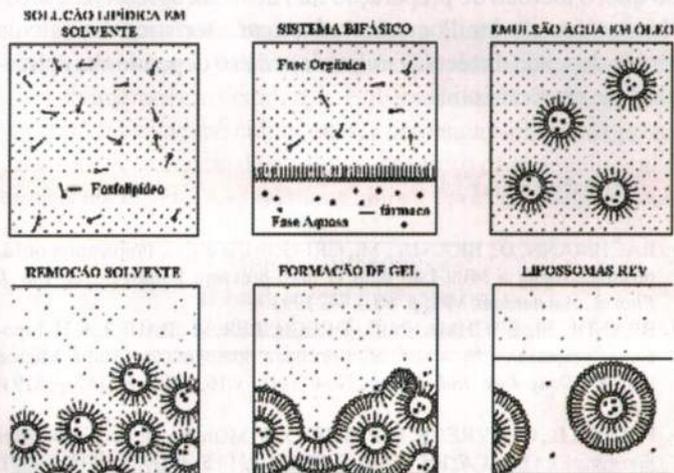


Figura 15 - Evaporação de Fase Reversa.

2.4) Remoção de detergente

Os fosfolídeos são solubilizados em meio aquoso, através da adição de um detergente, formam-se as micelas mistas e, em seguida, o detergente é eliminado, deixando as micelas ricas em fosfolídeos, as quais coalescem para formar vesículas unilamelares do tipo SUV ou LUV. As vesículas resultantes contêm menos que 1 molécula de detergente/1.000 moléculas de fosfolídeos.

3) OUTROS MÉTODOS

KANEKO E SAGITANI (1992) desenvolveram um método para a preparação de lipossomas fundamentado na "fase lamelar líquido-cristalina" que se forma numa mistura de lecitina de ovo, propilenoglicol, glicerol e água. A adição de água a esta fase

lamelar levou a obtenção de lipossomas de cerca de 116 nm e com uma eficiência de encapsulação de 19,5%.

BRANDL *et al* (1990) preparam lipossomas, empregando um aparelho homogeneizador de escala laboratorial. De forma semelhante à microfluidização, este aparelho produz uma hidratação forçada da lecitina e uma subsequente formação de lipossomas, através da expansão de dispersões lipídicas sob alta pressão.

BACHAMN *et al* (1993), segundo o mesmo princípio, descreveram a preparação de lipossomas através de outro homogeneizador constituído por uma bomba peristáltica que alimenta o material para dentro de uma bomba resfriada com água, a qual contém dois pistões a alta pressão. Um único ciclo mostrou-se capaz de transformar uma dispersão bruta de vesículas em uma dispersão homogênea, opalescente e levemente túrbida. Sucessivas recirculações levaram à redução de tamanho das vesículas até os limites desejados.

CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

As características dos principais métodos de preparação dos lipossomas estão resumidos na tabela I. De acordo com esta tabela, vários critérios devem ser considerados para a formulação de lipossomas. Sua composição, estrutura (uni ou multilamelares) e tamanho são determinados em função de critérios de estabilidade e de suas aplicações. O volume de encapsulação deve ser elevado caso se pretenda encapsular macromoléculas. Além do que, o método de preparação não deve ser agressivo à substância a encapsular. Por outro lado, a característica da vesícula obtida depende da técnica utilizada, e disso depende sua aplicabilidade em terapêutica

BIBLIOGRAFIA

- BACHMANN, D., BRANDL, M., GREGORIADIS, G. Preparation of Liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer. *Int. J. Pharm., Amsterdam*, v.91, p. 69 - 74, 1993.
- BRANDL, M., BACHMANN, D., DRECHSLER, M., BAUER, K.H. Liposomes preparation by a new high pressure homogenizer Gaulin Micron Lab 40. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.16, n.14, p.2167 - 2191, 1990.
- FATTAL, E., COUVREUR, P., PUISIEUX, F. Méthodes de préparation des liposomes. In: DELLATRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F. PHILIPPOT, J.R., SCHUBER, F. eds. *Les Liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: INSERM, 1993. P. 43-62.
- FENDLER, J. H. - *Membrane Mimetic Chemical*. Wiley; New York, 1982.
- FORNOVI, I.R., RAMÓN, M.T.G., RIVERA, A M. Métodos de preparación y caracterización de estructuras liposómicas. *Afinidad*, Barcelona, v. 46, n. 424, p. 460-466, 1989.
- GREMIÃO, M.P.D. - *Tese de Doutorado*. Instituto de química, USP, São Paulo, 1995.
- JULIANO, R.L. - *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 39-41, 1981.

TABELA I – Principais características dos métodos de preparação dos lipossomas.

MÉTODO DE PREPARAÇÃO	ESTRUTURA	DIÂMETRO (µm)	VOLUME ENCAPSULAÇÃO (µl/µmol lipídeo)	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%)
Hidratação de filme	MLV	1,0	1,4-1,8	9-27
Sonicação de MLV	SUV	0,02-0,05	0,2-1,5	0,1-1,0
"French Pressure Cell"	SUV	0,02-0,05	0,2-1,5	5-25
Extrusão de MLV por membrana de policarbonato				
0,1 µm	SUV	0,06-1,0	1-3	5-30
0,2 a 1 µm	MLV	0,05-2,0	1,8-3,7	15-60
Microfluidização	SUV	<0,1	0,7-1,0	5-78
Injeção de Etanol	SUV	0,03		0,5
VER	LUV	0,1-1,0	11-17	30-68
Infusão de Éter	LUV	0,05-0,25	13-25	2,0
Congelamento / Descongelamento (SUV)	LUV	0,09		25-30
Congelamento / Descongelamento (MLV)	MLV		2-5	31-89
Fusão induzida por Ca	LUV	0,2-1,0	1-7	10-15
Eliminação de Detergente	LUV	0,1	2,4	12
	SUV	0,037	0,47	12
Desidratação/ Reidratação	MLV	0,02-2,0		26-72

Ainda hoje, a obtenção industrial de lipossomas está sendo desenvolvida. Métodos ideais para produção de lipossomas em larga escala, que originem lotes consideráveis ou uma preparação contínua, assim como a uniformidade do produto e a reprodutibilidade do processo estão ainda em estudo e discussão.

- KANEKO, T., SAGITANI, H. Formation of homogeneous liposomes with high trapping efficiency by the chemical method. *Colloids Surf.* Amsterdam, v.69, p.125 - 133, 1992.
- LASIC, D.D. & PAPAHDJOPOULOS, D. - *Medical Applications of Liposomes*, 779 p., 1998.
- LASIC, D.D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J. Controlled Release*, 48, p. 203-222, 1997.
- LASIC, D.D., MARTIN, F.J. Liposome. *Farm Vestn.*, Ljubljana, v.40, p.197-208, 1989.
- LIMA, E.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. - Utilidade terapêutica dos lipossomas. *Ver. Bras. Med.*, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 585-590, 1994.
- NEW, R.R.C. Preparation of Liposomes. In: a practical approach. Oxford: IRL Press, p. 33-104. 1990.
- POZNANSKY, M.; JULIANO, R.L. - *Pharmacol. Rev.*, 36 (4): 277-279, 1984.
- PUISIEUX, F. Les Liposomes. *Ann.Pharm. Fr.*, Paris, v.41, n. 1, p. 3-13, 1983.
- SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DANIVIC, V. & BUGARSKI, B. - *Drug Dev. Ind. Pharma.* 23(5): 483-488, 1997.