

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JÚLIA MARTINS DE MORAES MATTOS

**TENTATIVA DE ENCAPSULAMENTO DO ANESTÉSICO “XILAZINA”
EM LIPOSSOMAS: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2

LONDRINA

2022

JÚLIA MARTINS DE MORAES MATTOS

**TENTATIVA DE ENCAPSULAMENTO DO ANESTÉSICO “XYLAZINA”
EM LIPOSSOMAS: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO.**

**ATTEMPTED ENCAPSULATION OF THE ANESTHETIC “XYLAZINE”
IN LIPOSOMES: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION.**

Trabalho de Conclusão de Curso 2
apresentado como requisito parcial à obtenção
do título de Licenciada em Química, da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

LONDRINA

2022



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TERMO DE APROVAÇÃO

Júlia Martins de Moraes Mattos

Tentativa de encapsulamento do anestésico “Xilazina” em lipossomas: desenvolvimento e caracterização

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado no dia 27 de junho de 2022 como requisito para obtenção do título de Licenciado(a) em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana - Membro Titular
(UTFPR)

Prof. Dr. Fábio Vandresen - Membro Titular
(UTFPR)

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça - Orientador
(UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concebido a vida, ter me sustentado, capacitado e conduzido por essa grande jornada até hoje.

Agradeço a minha mãe, Marta M. Moraes por ter me ensinado todos os valores, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos, de sempre ver o meu melhor e que posso superá-lo, de acreditar em mim, mesmo eu não acreditando. Ter me instruído para me tornar uma guerreira como ela. Tenho orgulho de você. Obrigada, Mãe!

Ao meu Marido, Max Lui S. Mattos que percorreu toda a graduação ao meu lado, me incentivando, não deixando abaixar a cabeça frente aos problemas e provações e sempre enxergar o meu melhor. Obrigada, Amor!

Agradeço ao Luís Fernando Cabeça, meu orientador por ter acreditado no meu potencial e aceito o desafio de me auxiliar, pela paciência de me ensinar passo a passo para alcançarmos nosso objetivo, por ser um modelo profissional e ser um grande amigo. Obrigada, Professor!

Aos meus colegas da faculdade e aos meus amigos da igreja que sempre me ajudaram e me deram força.

E por fim, agradeço a todos os professores e colaboradores que tiveram um papel fundamental na minha caminhada até aqui, por passar seus conhecimentos com amor, paciência e muita de dedicação. Admiro todos vocês!

RESUMO

A técnica de liberação de fármacos apresenta uma série de vantagens com relação ao ativo livre: maior tempo de permanência na corrente sanguínea, melhoria da eficácia, melhor biodisponibilidade, maior proteção do ativo, aumento da analgesia menor toxicidade entre outras. O fármaco a ser utilizado será a Xilazina, um analgésico já presente no mercado farmacêutico com função sedativa, entretanto com baixo tempo de anestesia e com metabolitos que podem ser tóxicos para o ser humano, o que inviabiliza o uso do fármaco em animais que os seres humanos consomem como: bovinos, suínos, etc. O carreador utilizado serão os lipossomas, vesículas constituídas por lipídeos ligados por ligações não covalentes e que pode encapsular tanto fármacos hidrofílicos ou anfifílicos. Este trabalho tem como principal objetivo o encapsulamento do anestésico Xilazina em lipossomas e sua caracterização. A caracterização do complexo fármaco-lipossoma leva em consideração o tamanho médio da vesícula lipossomal, eficiência de encapsulação e liberação controlada. A literatura apresenta uma série de estudos com relação a encapsulação de fármacos entre eles anestésicos. É possível verificar melhorias significativas quanto a sua função e modo de operação, bem como aumento do tempo de anestesia. Para tentarmos encapsular a Xilazina em lipossomas utilizamos três métodos: extrusão, banho de ultrassom seguido extrusão e sonicação. Para cada método foram usadas duas formulações (A e B): A - SPC, Colesterol e Xilazina e B- SPC, colesterol, Xilazina e PEG. A análise foi feita apenas para o método de extrusão e mesmo utilizando três métodos o encapsulamento foi inferior a 1%. A caracterização das vesículas foi realizada o tamanho do diâmetro médio, índice de polidispersividade, eficiência de encapsulação e potencial zeta, exibindo o tamanho médio e potencial zeta A: 188,7 e $-11,1 \pm -0,86$ e B: 192,8 e $-7,9 \pm -0,41$, apenas para o método de extrusão. Sendo assim, não foi possível fazer o teste de liberação controlada, pois não obtivemos uma boa eficiência de encapsulação, mesmo com os valores da caracterização estarem dentro do parâmetro.

Palavras-Chaves: Lipossoma Furtivo. Liberação Controlada. Xilazina.

ABSTRACT

The drug delivery technique has a number of advantages in relation to the free active: longer permanence in the bloodstream, improved efficacy, better bioavailability, greater protection of the active, increased analgesia, lower toxicity, among others. The drug to be used will be Xylazine, an analgesic already present in the pharmaceutical market with a sedative function, however with low anesthesia time and with metabolites that can be toxic to humans, which makes the use of the drug in animals that humans consume such as: cattle, swine, etc. The carrier used will be liposomes, vesicles made up of lipids linked by non-covalent bonds and which can encapsulate many hydrophilic or amphiphilic drugs. The main objective of this work is the encapsulation of the anesthetic Xylazine in liposomes and its characterization. The characterization of the drug-liposome complex takes into account the average size of the liposomal vesicle, encapsulation efficiency and controlled release. The literature presents a series of studies regarding drug encapsulation, including anesthetics. It is possible to verify significant improvements regarding its function and mode of operation, as well as an increase in anesthesia time. To try to encapsulate Xylazine in liposomes we used three methods: extrusion, ultrasound bath followed by extrusion and sonication. Two formulations (A and B) were used for each method: A - SPC, Cholesterol and Xylazine and B- SPC, Cholesterol, Xylazine and PEG. The analysis was performed only for the extrusion method and even using three methods the encapsulation was less than 1%. The characterization of the vesicles was performed according to the mean diameter size, polydispersity index, encapsulation efficiency and zeta potential, showing the mean size and zeta potential A: 188.7 and -11.1 ± -0.86 and B: 192, 8 and -7.9 ± -0.41 , for the extrusion method only. Therefore, it was not possible to carry out the controlled release test, as we did not obtain a good encapsulation efficiency, even with the characterization values being within the parameter.

Keywords: Stealth Liposome. Controlled Release. Xylazine.

SUMÁRIO

1	INTRUDUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA	9
3	REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1	ANESTÉSICO XILAZINA E LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	9
3.2	LIPOSSOMAS	11
3.2.1	LIPOSSOMAS FURTIVOS	15
3.2.2	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	16
4	OBJETIVO	17
4.1	OBJETIVO GERAL	17
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
5	MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1	MATERIAIS	18
5.1.1	PREPARO DOS LIPOSSOMAS.....	18
5.1.2	EFICIENCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	20
5.1.3	MEDIDAS DE TAMANHO DA PARTICULA, POTENCIAL ZETA E ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.....	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
8	REFERENCIAIS	25

1 INTRODUÇÃO

A Xilazina é um anestésico que apresenta efeito citotóxico para seres humanos e por isso não é recomendada a aplicação em animais de grande porte como bovinos, suínos e animais que são consumidos por humanos. Essa problemática influencia muito no mercado veterinário, pois a utilização deste fármaco é reduzida pelo baixo consumo dos fornecedores, então optam para um anestésico com efeito seguro para a saúde animal e humana (SOUSA, 2015).

Para tentar solucionar esses problemas o fármaco pode ser encapsulado em carreadores com o propósito de melhorar sua biodisponibilidade, bem como diminuir sua toxicidade. O sistema de liberação controlada pode ser usado em diversos ativos para obtenção de entrega do ativo mais direcionado, aumento do tempo de anestesia, diminuição das doses do fármaco e diminuição da toxicidade. Um sistema carreador muito empregado atualmente, são os lipossomas (BATISTA, 2007).

Lipossomas são os carreadores mais utilizados e seguros em sistemas de liberação controlada. Estes são constituídos por vesículas formadas por bicamada concêntrica de lipídios e uma cavidade interna aquosa, podendo ser utilizados como um transporte de fármacos a serem encapsulados na bicamada lipídica ou na cavidade aquosa. As vesículas lipídicas consistem em fosfolipídios e esteróis, como o colesterol, para influenciar a fluidez e deformação da bicamada lipídica (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES. 2007). Entretanto, algumas desvantagens são encontradas nos lipossomas convencionais, como rápida depuração pelo sistema imune. Para contornar esse tipo de problemática uma nova geração de lipossomas foi desenvolvida, os lipossomas de longo tempo de duração ou furtivos (SILVA, 2018).

Os lipossomas furtivos (LF) são vesículas lipossomais com superfície da membrana modificada com um polímero hidrofílico o polietilenoglicol (PEG). O PEG é ligado covalentemente ao fosfolípido. O PEG é inserido na superfície da membrana lipídica para o prolongamento de sua duração na circulação sanguínea por reduzir a opsonina do plasma das vesículas. Entretanto, os fármacos incorporados nos lipossomas podem ser ainda liberados (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES. 2007).

Para tentar diminuir a toxicidade do anestésico diminuindo sua dose do anestésico, será realizado o encapsulamento da Xilazina em vesículas lipossomais para o controle de liberação (drug delivery) tendo como cerne o desenvolvimento e caracterização do sistema lipossomas/Xilazina.

2 JUSTIFICATIVA

A Xilazina é um anestésico já existente no mercado de produtos veterinários. Porém sua saída no mercado não é tão alta como outros anestésicos. O motivo disso é porque não é recomendado a aplicações em animais que são consumidos pelos humanos por causa de seu efeito citotóxico, que inibem a proliferação das células, causando danos e até mesmo a morte celular, afetando principalmente no sistema nervosa central.

Por isso, os benefícios do encapsulamento do anestésico Xilazina em lipossomas são: o aumento na duração de analgesia, diminuição da rápida absorção no organismo, tentativa de redução dos efeitos colaterais, bem como o aumento da sua eficiência e a estabilidade visando a melhoria do fármaco na sua ação terapêutica.

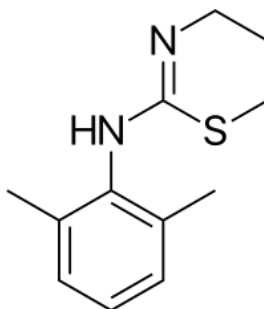
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ANESTÉSICO XILAZINA E LIBERAÇÃO CONTROLADA

A Xilazina ($C_{12}H_{16}N_2S$) (Figura 1), é um derivado da 1,3-tiazínico, e está intimamente ligado ao uso na medicina veterinária como um sedativo com ação rápida e segura que provoca relaxamento muscular e sonolência. Suas funções incluem além de atuar como um relaxante muscular, apresenta também efeito analgésico e sedativo bem como também um agonista alfa-adrenérgico. A Xilazina foi desenvolvida e vendida pela primeira vez pela Bayer Ltd. (Leverkusen, Alemanha) em 1962, e registrado como medicamento veterinário (Rompun®) apenas para uso em animais

de fazenda, como gado e cavalo. Entretanto, com o passar o tempo Xilazina foi recomendado para pré-medicação anestésica para animais que não são consumidos por humanos.

Figura 1: Estrutura da Xilazina



Fonte: (WIKIPÉDIA, 2021).

A Xilazina é excretada rapidamente por vias urinárias em todos os animais, com tempo de meia-vida inferior a 3 h, sendo o principal metabólico o 2,6-xilidina (C₈H₁₁N). Seu metabólito 2,6-xilidina é genotóxico e carcinogênico (ZHENG, et al., 2013). Países como a China regulamentaram que resíduos de Xilazina não podem ser detectados no leite.

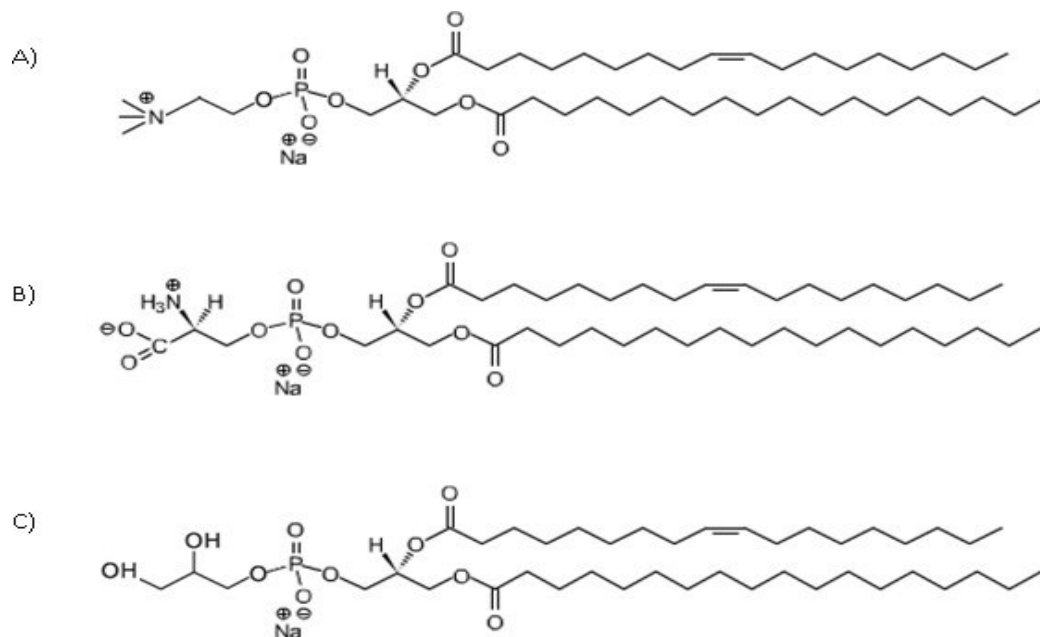
Uma estratégia para amenizar o seu curto tempo de ação de anestesia (inferior a 3h) e uso restrito em animais que não são destinados ao consumo humano em função da sua toxicidade em seres humanos (principalmente no sistema nervosa central), seria o processo de encapsulação da Xilazina para liberação controlada de fármacos. Sistemas de liberação de fármacos podem controlar tanto a taxa de liberação do fármaco quanto o local do corpo a ser liberada. O sistema de liberação de fármacos apresenta inúmeras vantagens quando comparamos com outros sistemas convencionais (fármaco livre), por exemplo: maior eficiência terapêutica com liberação progressiva e controlada do fármaco, maior tempo de analgesia, diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação, estabilização do ativo, administração segura (sem reações inflamatórias locais), menor número de doses, direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas, tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas

(HUA et al., 2013). Assim, para o bom funcionamento do sistema de liberação de ativos precisamos de bons veículos de liberação. Sem dúvida encontrar o suporte adequado para transporte e liberação de ativos ajuda a garantir que eles cheguem ao seu destino intacto. No trabalho serão utilizadas vesículas lipossomais como carreadores.

3.2 LIPOSSOMAS

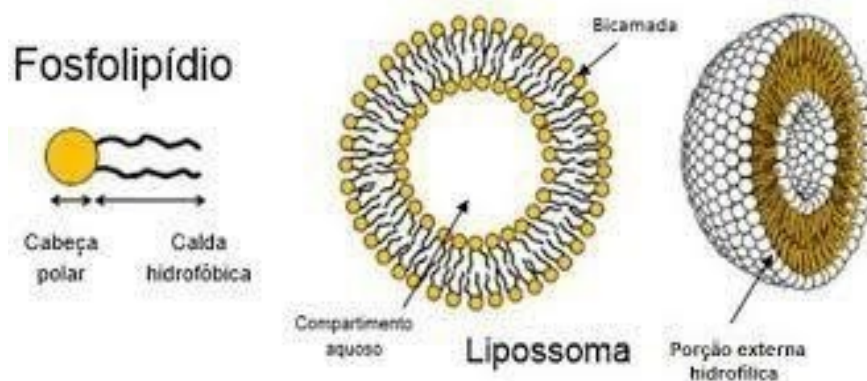
Quando dispersos em água, os fosfolípidios formam espontaneamente lipossomas que consistem em uma bicamada lipídica que separa um núcleo aquoso interno da massa aquosa circundante. Diferentes estruturas de fosfolípidios podem ser encontradas (Figura 2), como no formato cilíndrico, por exemplo: fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas e fosfatidilgliceróis, que tem a tendência de formar em solução aquosa uma bicamada estável. As fosfatidilcolinas são os mais utilizados quando se trata de formulação de lipossomas, pois possuem na variação de pH ou na concentração de sal no meio, uma estabilidade considerável (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES. 2007).

Figura 2 - Moléculas de lipídios A) fosfatidilcolina, B) fosfatidilserinas e C) fosfatidilgliceróis.



O diâmetro das partículas de lipossomas pode variar de aproximadamente 25 nm a 2,5 μm , porém formulações lipossomais injetáveis desenvolvidas até agora para uso clínico são inferiores a 200 nm (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2011; EGUSQUIAGUIRRE et al., 2012). Os lipossomas são vesículas amplamente utilizadas em sistema de liberação de fármacos e são capazes de encapsular tanto fármacos hidrofóbicos quanto fármacos hidrofílicos (Figura 3). Fármacos hidrofóbicos são incorporados à membrana lipídica do lipossoma, estabilizado por interações não covalentes entre o ácido graxo não polar dos fosfolipídios. Quando os fármacos hidrofílicos são encapsulados nos lipossomas, eles são transportados dentro do núcleo aquoso.

Figura 3: Estrutura do lipossoma.

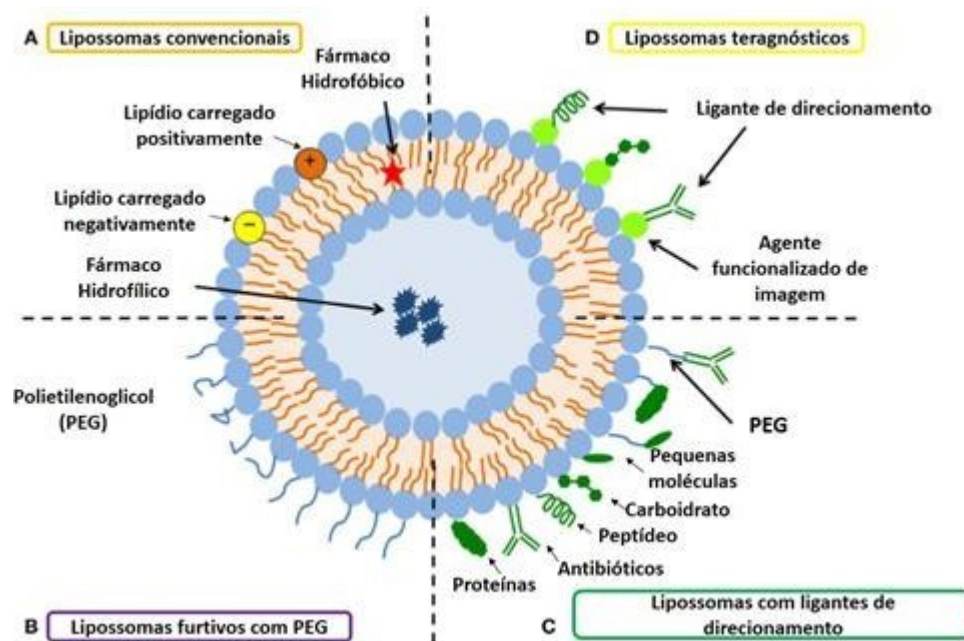


Fonte: (SANTOS, 2017).

Os tipos de lipossomas variam no que diz respeito ao seu número de membranas fosfolipídicas encontradas internamente em sua estrutura, sendo esses tipos ainda separados em dois subgrupos. Vesículas pequenas, por exemplo, apresentam uma única membrana lipídica sendo essa de até 100 nanômetros. As grandes vesículas são constituídas de uma membrana lipídica maior que cem nanômetros (100 - 1000 nm). Há casos em que a vesícula irá apresentar uma estrutura multilamelar (MLV), ou seja, membranas lipídicas em várias bicamadas lipídicas concêntricas.

De forma geral, lipossomas também podem ser classificados por quatro categorias distintas: lipossomas convencionais (Figura 4A), lipossomas estabilizados estericamente (Figura 4B), lipossomas com ligantes de direcionamento (Figura 4C) e lipossomas teranósticos (Figura 4D). (SERCOMBE et al., 2015).

Figura 4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de liberação controlada. (A) Lipossomas convencionais, (B) Lipossomas furtivos com PEG, (C) Lipossomas com ligantes de direcionamento e (D) Lipossomas teranósticos.



Fonte: (SERCOMBE et al., 2015) adaptado.

Lipossomas convencionais (A) são aqueles que apresentam fosfolipídios e colesteróis em suas estruturas. Lipossomas estabilizados estericamente (B) são aqueles que apresentam em sua superfície um polímero ou outras estruturas que permite que os lipossomas tenham maior tempo de circulação no corpo sem serem identificados pelo sistema imune do corpo. Lipossomas com ligantes de direcionamento (C) são aqueles que foram modificados com moléculas como anticorpos ou outro sítio específico para direcionar o sistema a uma região específica do corpo e por fim lipossomas teragnósticos (D) que carregam tanto um fármaco quanto um agente de imagem para rastreamento.

As vantagens de encapsulamento do anestésico Xilazina podem ser descritas como o aumento na duração de analgesia, diminuição da rápida absorção no organismo, redução dos efeitos colaterais, bem como o aumento da sua eficiência e a estabilidade (SOUZA, 2018).

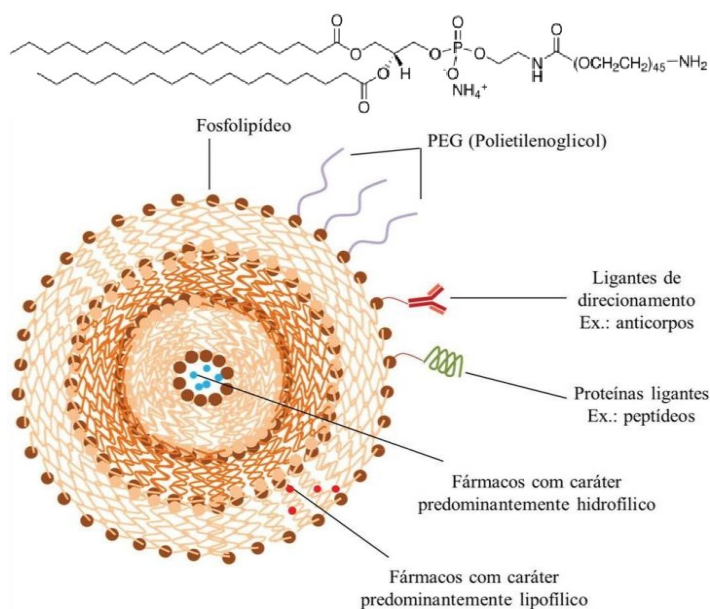
Entretanto, lipossomas convencionais podem ser facilmente detectados pelo sistema imune do organismo. Uma linha de lipossomas com o propósito de melhoria

de captura pelas opsoninas são os lipossomas furtivos ou de longo tempo de circulação. (BATISTA et al., 2007).

3.2.1 LIPOSSOMAS FURTIVOS

Os Lipossomas furtivos (LF) também conhecidos como lipossomas de longo tempo de circulação ou peguilados. São lipossomas com um polímero hidrofílico na superfície dos lipossomas. Um exemplo de polímero utilizado é o polietilenoglicol (PEG). O polímero PEG é ligado covalentemente à diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE) e inserido na vesícula lipossomal (Figura 5). A extensão do PEG permanece fora da vesícula lipossomas e é intensamente solvatado. De acordo com Souza, o PEG é um processo muito utilizado no transporte de fármacos para “criar um obstáculo estéril e/ou uma camada hidrofílica superficial ao redor dos lipossomas, de forma a protegê-los contra as proteínas plasmáticas do corpo” (2018, p. 17).

Figura 5: Representação da estrutura de lipossomas convencionais, lipossomas peguilados com moléculas de polietilenoglicol na superfície, lipossomas sítio-dirigidos com a presença de macromoléculas como proteínas.



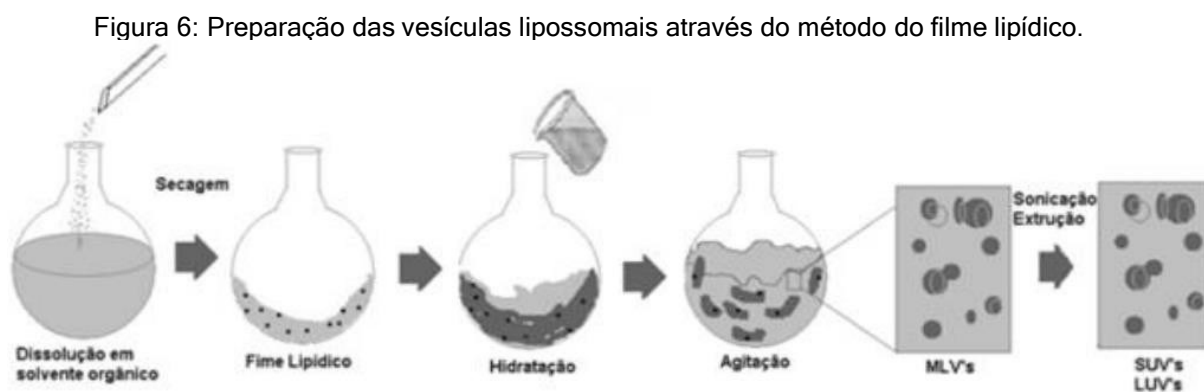
Fonte: (APOLINÁRIO, 2020) reproduzido.

Como resultado, se tem o prolongamento da vesícula na circulação sanguínea. O LF é um sistema desenvolvido para proporcionar a liberação de fármacos por longo

tempo de duração. Estudos mostram que o peso molecular do PEG pode alterar a farmacocinética do lipossoma, incluindo alterações no tamanho hidrodinâmico (NUNES, 2016). Também a hidrofiliicidade dos fármacos hidrofóbicos auxilia na redução da dosagem, diminuindo a toxicidade, e aumento de sua eficácia.

3.2.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Existem diferentes métodos de preparo de lipossomas, dentre eles: hidratação do filme lipídico, evaporação de fase reversa, injeção etanólica, congelamento e descongelamento (BATISTA et al., 2007). Entre as mais clássicas, a mais mencionada está o método da hidratação do filme lipídico, onde os lipídeos são dissolvidos em um solvente orgânico, seguido da sua evaporação e conseqüentemente a formação do filme lipídico. A hidratação do filme deve ser efetuada com água ou solução tampão contendo o fármaco a ser encapsulado, se este for de natureza hidrofílica. O processo de hidratação promove a formação da dispersão de lipossomas multilamelares (Figura 6). O fármaco também pode ser dissolvido na mistura lipídica (solvente clorofórmio, antes da obtenção do filme lipídico), se for de natureza lipofílica (BATISTA et al., 2007; AKBARZADEH et al., 2013).



Fonte: Adaptado de Sousa, 2007

O método de evaporação de fase reversa consiste na mistura do fosfolipídio dissolvido em solvente orgânico com ativo a ser encapsulado dissolvido em solução aquosa. Esta mistura é então homogeneizada, para obtenção de uma emulsão. Após isso o solvente orgânico é evaporado para adquirir uma dispersão aquosa com as

vesículas, que é levada para agitação para assim ocorrer a formação dos lipossomas (TAYLOR et al., 2005).

O método de congelamento e descongelamento é realizado congelando abruptamente a solução lipossomas em nitrogênio líquido. Depois de 10 minutos o sólido é levado para o aquecimento a 50º C durante 10 minutos. Esse processo é repetido três vezes.

O método de injeção etanólica os fosfolipídios são dissolvidos em etanol e a fase orgânica decorrente do processo é injetada em uma fase aquosa contendo o fármaco sob agitação, em seguida o etanol é removido por evaporação (SKALKO et al., 1996)

Após a obtenção dos lipossomas por um dos métodos tem-se vesículas grandes e multilamelares. Para obtenção dos lipossomas de tamanho pequeno e com bicamada, pode se utilizar a técnica de extrusão ou sonicação.

O método de extrusão consiste na preparação e obtenção de vesículas unilamelares sem uso de solventes, tendo seu tamanho controlado por uma membrana de policarbonato. O tamanho da partícula de vesículas unilamelares depende do quanto a amostra foi passada pela membrana extrusora (AVANTI, [s.d]).

O método de sonicação consiste no uso de um sonificador como fonte de energia para desarranjar e rearranjar as vesículas lipossomais e obter lipossomas de menores tamanhos mais homogêneos (BRAGA, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal é o desenvolvimento e caracterização da formulação lipossoma/Xilazina para liberação controlada.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar estruturas lipossomais utilizando lipídeos de fosfatidilcolina de soja (SPC), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG2000) e colesterol.
- Preparar o complexo de inclusão entre lipossomas e Xilazina
- Caracterizar o complexo quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, carga superficial e eficiência de encapsulação.

5 MATERIAIS E METODOS

5.1 MATERIAIS

Os principais materiais utilizados para a realização do trabalho foram: Lipídeo de fosfatidilcolina de soja (SPC) (Lipoid GmbH); Colesterol (Sigma); diestearoilfosfatidiletanolamina (Lipoid GmbH); clorofórmio (Synth); Xilazina (fornecido pela Dechra).

5.1.1 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

O método que foi utilizado para a preparação dos lipossomas foi o filme lipídico (HAERI et al., 2013). Os lipídios utilizados para formação dos lipossomas foram: fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol e DSPEPEG2000 (0,5:0,41:0,05) na concentração total de 1 mM.

1º MÉTODO

Os lipídeos em solução estoque de clorofórmio foram misturados nas proporções adequadas e deixados em temperatura ambiente por 24h para evaporação do clorofórmio e formação do filme lipídico. Após a formação do filme lipídico (1 mM) esse foi hidratado com solução tampão fosfato pH 7,5 (0,05 mM) (1 mL) contendo o fármaco Xilazina a ser encapsulado. A solução foi extrusada em um mini extrusor Avanti Polar (Figura 7 e 8) com membrana de policarbonato de 400nm, sendo realizados 13 ciclos.

Figura 7: Mini extrusor



Fonte: autoria própria (2021)

2° MÉTODO

Nesse método os lipídeos em solução estoque de clorofórmio foram misturados nas proporções adequadas e deixados em temperatura ambiente por 24h para evaporação do clorofórmio e formação do filme lipídico, igualmente no primeiro método. Após a formação do filme lipídico (1 mM) esse foi hidratado com solução tampão fosfato pH 7,5 (0,05 mM) (1 mL) contendo o fármaco Xilazina a ser encapsulado. Os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao banho de ultrassom durante 30 minutos. Em seguida, a solução foi extrusada em um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400nm, sendo realizados 13 ciclos.

3° MÉTODO

Depois da preparação do filme lipídico e hidratação com solução tampão fosfato (pH 7,5, 0,05 mM) (1 mL) contendo o fármaco Xilazina. Os lipossomas multilamelares obtidos foram levados ao sonicador (QSonica, Q500) no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFPR-LD). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e máxima amplitude (240 μ m). Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo.

5.1.2 EFICIENCIA DE ENCAPSULAMENTO

O teste de eficiência de encapsulação do fármaco no lipossoma foi realizado utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000 Da). Uma alíquota de 0,4 mL da amostra extrudada foi transferida para uma unidade de filtro e foi submetida a uma ultracentrifugação. A quantidade de amostra que permeou o filtro foi quantificada utilizando espectrofotometria de UV à 210 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\% \text{Fármaco encapsulado} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que C_i e C_x representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

Para quantificar a concentração do fármaco na solução analisada foi realizado uma curva de calibração do fármaco. Para a curva de calibração foram preparadas amostras de xilazina com concentrações variando de 0,01mmol a 0,15mmol.

5.1.3 MEDIDAS DE TAMANHO DA PARTICULA, POTENCIAL ZETA E ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

A distribuição de tamanho dos lipossomas presentes nas amostras foi medida a partir alíquotas de 600 μL de concentrações 1 mM em um aparelho Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer) no laboratório multiusuário do UTFPR Londrina.

Análises de potencial zeta e do índice de polidispersividade das amostras foram realizadas com o aparelho Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer). Para o teste de potencial zeta amostras foram diluídas (4 μL da formulação para 996 μL de água deionizada) e feitas em triplicata, na temperatura de 25°C.

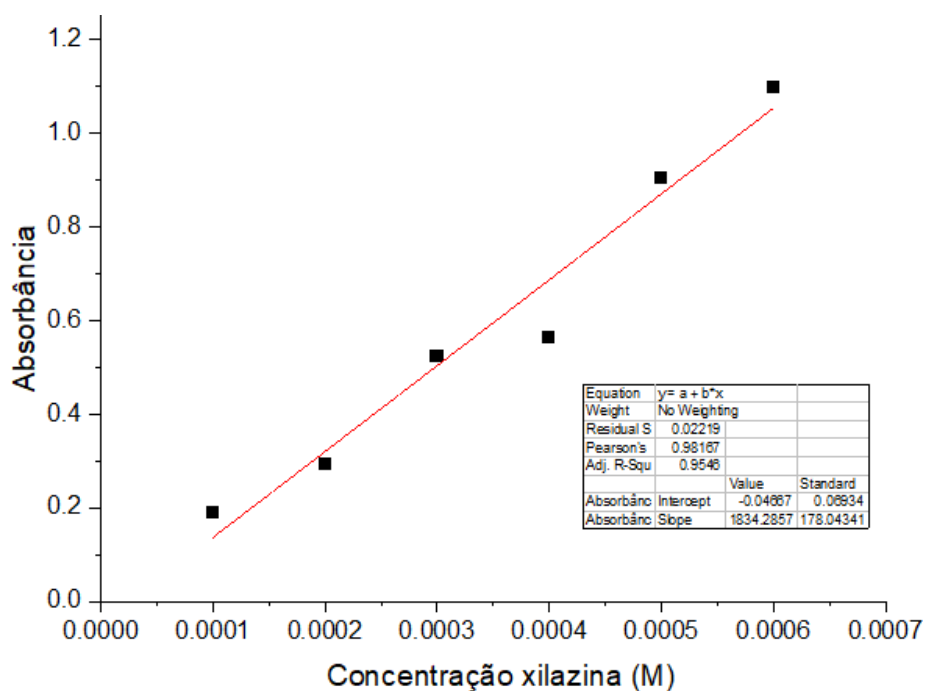
O espalhamento dinâmico de luz (do inglês dynamic light scattering - DLS) é uma técnica, que permite a determinação do tamanho médio e distribuição do tamanho médio de partículas em dispersão (HALLETT, 1994).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As vesículas lipossomais são altamente eficientes quando se trata de encapsulação e liberação de substâncias hidrofílicas e lipofílica. Sendo assim, foi utilizado as vesículas lipossomais para o desenvolvimento de uma formulação contendo Xilazina. A Xilazina (Figura 1) é um anestésico que já está empregado no mercado farmacêutico para animais.

Para ser desenvolvido esse sistema de lipossomas/Xilazina para a liberação controlada, foram realizados a três diferentes métodos, todos partindo de formação de filme lipídico. No primeiro caso, após a formação do filme lipídico, foi realizada a extrusão do complexo lipossomas/Xilazina. No segundo caso a Xilazina foi sonicada e no terceiro caso, foi deixada em banho de ultrassom. Caracterizações do complexo serão realizadas e calculada a porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%). Para o cálculo da EE da Xilazina foi realizado uma curva de calibração. Para a construção da curva, foram preparadas novas concentrações de solução de oxacilina com tampão a partir da solução estoque. As novas concentrações foram 10 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 70 $\mu\text{mol/L}$, 110 $\mu\text{mol/L}$ e 150 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 9).

Figura 9: Curva de calibração - absorvância em 210 nm pela concentração da solução de Xilazina.



Fonte: Autoria própria (2022).

O coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9546, ou seja, foi capaz de interpretar 95,46% dos pontos plotados. A equação abaixo foi utilizada para identificar a relação linear entre a absorbância da Xilazina e as concentrações das soluções.

$$y = -0,04667 + 1834,2857x \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde (x) se refere a concentração de Xilazina e (y) a intensidade da absorbância no comprimento de onda de 210 nm no espectro de absorção no UV-Vis. Os valores de absorção para cada concentração foram determinados por espectroscopia de absorção no ultravioleta em 210nm. Além da composição dos lipossomas (tipo de lipídio) a ausência de tensoativos pode influenciar na porcentagem de encapsulação do fármaco.

Para encapsular a Xilazina no lipossoma, foi utilizado duas formulações: lipossoma com colesterol e lipossoma com colesterol e PEG. Então foi realizado o método 1 para tentar encapsular, mas não foi possível obter bons resultados, com indicativo que o efeito de encapsulação é praticamente zero. Em seguida, foi

modificado o método de preparo para obter a encapsulação utilizando o método de ultrassom, mas também não conseguimos obter o processo de encapsulação. Foi então utilizado um terceiro método para fazer a tentativa de encapsulação, sendo ele o processo de sonicação utilizando somente a formulação EPC, mas novamente não obteve o processo de encapsulação adequado.

Mesmo utilizando três diferentes métodos de preparação da formulação xilazina/lipossomas a eficiência de encapsulação foi menos de 1%. Isso pode ser explicado devido ao caráter hidrofílico do anestésico.

Para caracterizar as vesículas lipossomais foi feito tamanho e potencial zeta usando o DLS (dynamic light scattering). As medidas da tabela 1 foi feita de acordo com o método de extrusão.

Tabela 1: Valores de diâmetro médio, índice de polidispersividade (PDI), eficiência de encapsulação e potencial zeta (PZ).

Amostra	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE%	PZ
1 SPC/Col/Xil	188,7	17%	1%	-11,1 ± -0,86
2 SPC/Col/Peg/Xil	192,8	15%	-	-7,9 ± -0,41

Fonte: Autoria própria (2022).

Os resultados da Tabela 1 estão adequados, mesmo não tendo encapsulados a Xilazina no lipossoma.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No desenvolvimento da formulação lipossoma, a amostra 1 forneceu os valores de diâmetro médio (188,7 nm) e de potencial zeta (-11,1 ± -0,86). O tamanho das vesículas está adequado para permeação cutânea, e o PDI está dentro dos parâmetros indicando uma amostra homogênea em termos de tamanho das vesículas,

sendo ele 17%. A amostra 2 forneceu os valores de diâmetro médio (192,8 nm) e de potencial zeta ($-7,9 \pm -0,41$). O tamanho das vesículas também está adequado para permeação cutânea, e o PDI está dentro dos parâmetros indicando uma amostra homogênea em termos de tamanho das vesículas, sendo ele 15%. O PDI foi abaixo de 0,3 o que exprime que a amostra é homogênea. Os dados fornecidos foram resultantes do processo de extrusão para ambas as amostras.

De acordo com a Tabela 1, podemos concluir que a caracterização das vesículas lipossomais tanto da formulação (amostra) 1 e a 2 estão adequadas. Porém mesmo com os resultados adequados, em virtude do tempo, não foi possível obter nenhum tipo de eficiente de encapsulação, sugestão para que novos métodos sejam utilizados na tentativa de encapsular.

8 REFERENCIAIS

AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABAY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N., HANIFEHPOUR, Y; ... & NEJATI-KOSHKI, K. **Liposome: classification, preparation, and applications.** 2013. Disponível em: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>. Acesso em: 05 de abril de 2021.

APOLINÁRIO, Alexandra C. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS 'ESPAÇO LÁ EMBAIXO'. **Química Nova**, v. 43, n° 2, São Paulo, maio 2020.

BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros de; MAGALHAES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** São Paulo, v. 43, n. 2, p. 167-179, Jun 2007.

BRAGA, R.R. Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para determinação de alantoína em lipossomas e formulações tópicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), setembro, 2010.

EGUSQUIAGUIRRE, S. P. et al. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: Advances in clinical and preclinical research. **Clinical and Translational Oncology**, v. 14, n. 2, p. 83- 93, 2012.

GALLO, A. **Estudo da interação de lipossomas furtivos com anestésico local ropivacaína.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, Paraná.

HALLETT, F. R. Particle size analysis by dynamic light scattering. **Food Research International**, v. 27, n. 2, p. 195-198, 1994.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. November, p. 1-7, 2013.

NUNES, Shirleide S. **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO POLIETILENOGLICOL NA CIRCULAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DE LIPOSSOMAS PH-SENSÍVEIS, RADIOMARCADOS COM TECNÉCIO-99m EM MODELOS EXPERIMENTAIS.** 2016. Belo Horizonte.

SANTOS, Daniela P. **Caracterização do sistema Butamben/2- Hidroxipropil- β -ciclodextrina/Lipossoma furtivo e seu efeito na eficiência de encapsulação.** 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, 2017. Disponível em:

http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/bitstream/1/12359/1/LD_COLIQ_2017_2_02.pdf. Acesso em: 13 de abr. 2021.

SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 286, 2015.

SILVA, Aline T. M. **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FURTIVA E ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM CARBOIDRATOS CONTENDO DOXORRUBICINA**. Belo Horizonte. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/33814#:~:text=Os%20estudos%20de%20atividade%20antitumoral,toxicidade%20para%20os%20lipossomas%20glicosilados>. Acesso em: 02 de mar. 2022.

SKALKO, N., BRANDL, M., BEDIREVID-LADAN, M., FILIPOVID-GREIE, J., & JALSENJAK, I. Liposomes with nifedipine and nifedipinecyclodextrin complex: 41 Calorimetrical and plasma stability comparison. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 4,359-366, 1996.

SOUSA, Samuel S. **EFEITOS DA XILAZINA E DA CETAMINA EM EQUINOS E BOVINOS**. Jaboticabal – SP. 2015. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2015/ses-30919/ses-30919-5665.pdf>. Acesso em: 02 de mar. 2022.

SOUZA, Wesley A. **MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS FÁRMACO- HPβCD - LIPOSSOMAS FURTIVOS**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso II (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, Paraná. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/10403/1/LD_COLIQ_2018_1_06.pdf. Acesso em: 12 de abr. 2021.

TAYLOR, T. M.; WEISS, J.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. **Food Science and Nutrition**, v. 45, 587-605, 2005.

WANG, A.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 63, n. 1, p. 85-98, 2011.

XILAZINA. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. [São Francisco CA: Fundação Wikimedia]. 2021. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Xilazina>. Acesso em: 13 de abr. 2021.

ZHENG, X.; MI, X.; LI, S.; CHEN, G. Determination of Xylazine and 2,6-Xylidine in Animal Tissues by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Food Science**. 2013. Vol. 78, Nr. 6, T955.

MERCK. **Avanti® Polar Lipids.** [s.d]. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/products/chemistry-and-biochemicals/biochemicals/avanti-polar-lipids>. Acesso em: 13 de abr. 2021.