

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

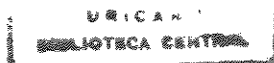
**Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Ácido
Azelaico, Bleomicina e 5-Fluorouracil para a Aplicação
na Terapia de Melanomas**

Autora: Carla Andréia Miranda da Costa
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas- São Paulo
Julho/2000

47000910020



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	TI UNICAMP
	C 823p
V.	Ex.
TOMBO BC	43759
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	13/02/01
N.º CPD	

CM-00153665-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C823p

Costa, Carla Andréia Miranda da

Preparação e caracterização de lipossomas encapsulando ácido azelaico, Bleomicina e 5-fluorouracil para a aplicação na terapia de melanomas / Carla Andréia Miranda da Costa.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadora: Ângela Maria Moraes

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Melanoma. 4. Tecnologia de liberação controlada. I. Moraes, Ângela Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

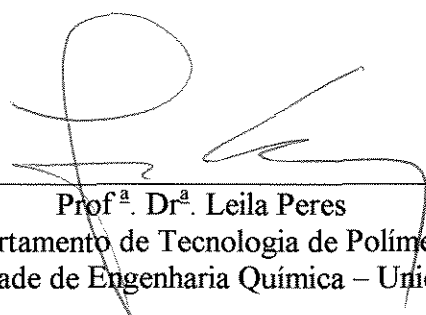
Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela Engenheira Química Carla Andréia Miranda da Costa e aprovada pela banca examinadora em 27 de Julho de 2000.



Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Moraes

Dissertação de Mestrado defendida por Carla Andréia Miranda da Costa e aprovada em 27 de julho de 2000 pela banca examinadora constituída pelos Professores Doutores:


Prof.ª. Dr.ª Ângela Maria Moraes
Orientadora


Prof.ª. Dr.ª Leila Peres
Departamento de Tecnologia de Polímeros
Faculdade de Engenharia Química – Unicamp


Prof. Dr. Pedro Luiz Onofrio Volpe
Departamento de Físico-Química
Instituto de Química - Unicamp

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Se nunca abandonas o que é importante para ti,
se te importar tanto
a ponto de estares disposto a lutar
para obtê-lo, asseguro-te que tua vida
estará plena de êxito.
Será uma vida dura,
porque a excelência não é fácil,
mas valerá a pena.*

Richard Bach

*Com amor e carinho, a meus pais,
Ari e Dulcinéia
e ao meu marido,
Jefferson.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Ângela Maria Moraes pela orientação e em especial a sua amizade e dedicação.

À Professora Maria Helena Andrade Santana pela utilização do seu laboratório na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana pelo laboratório e equipamentos utilizados neste trabalho.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos colegas do laboratório pela convivência, amizade e troca de experiências diárias.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho.

A minha família pelo amor, apoio e confiança em todos os momentos.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de Quadros	xxi
Lista de Abreviações	xxiii
Resumo	xxv
Abstract	xxvii
I- INTRODUÇÃO	1
II- REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1- Considerações Gerais sobre Lipossomas	5
2.1.1- Princípio da Formação das Vesículas	6
2.1.2- Classificação dos Lipossomas	11
2.1.3- Composição dos Lipossomas	13
2.1.4- Métodos de Preparação de Lipossomas	17
2.1.5- Mecanismos de Incorporação de Compostos Terapêuticos	22
2.1.6- Estabilidade	23
2.1.7- Aplicações Biológicas dos Lipossomas	27
2.2- Pele como Alvo e Local de Aplicação de Agentes Terapêuticos	31
2.2.1- Mecanismos de Penetração de Agentes Ativos na Pele	32
2.3- Quimioterapia de Melanomas Cutâneos	35
2.3.1- Ácido Azelaico	38
2.3.2- 5-Fluorouracil	39
2.3.3- Bleomicina	41
III- OBJETIVO	45
IV-MATERIAIS E MÉTODOS	47

4.1- Materiais	47
4.2- Métodos	47
4.2.1- Caracterização Preliminar do Comportamento das Drogas	47
4.2.2- Preparação dos Lipossomas Contendo Ácido Azelaico por Injeção de Etanol	50
4.2.3- Preparação dos Lipossomas contendo Bleomicina	53
4.2.4- Preparação dos Lipossomas Contendo 5- Fluorouracil	54
4.2.5- Remoção das drogas não Encapsuladas	60
4.2.6- Caracterização dos Lipossomas	61
 V- RESULTADOS E DISCUSSÃO	 67
5.1. Preparação e Caracterização dos Lipossomas Encapsulando Ác. Azelaico	67
5.1.1. Avaliação Preliminar do Comportamento da Droga Livre	67
5.1.2. Avaliação da Adequação da Técnica de Quantificação de Ácido Azelaico Encapsulado	71
5.1.3. Encapsulamento Passivo de Ácido Azelaico em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol	73
5.2. Preparação e Caracterização dos Lipossomas Encapsulando Bleomicina	78
5.2.1. Avaliação Preliminar do Comportamento da Droga Livre	78
5.2.2. Encapsulamento de Bleomicina em Lipossomas	78
5.3. Preparação e Caracterização dos Lipossomas Encapsulando 5-Fluorouracil	85
5.3.1. Avaliação Preliminar do Comportamento da Droga Livre	85
5.3.2. Encapsulamento Ativo de 5-Fluorouracil em Lipossomas Extrudados	87
5.3.3. Encapsulamento Passivo de 5-Fluorouracil em Lipossomas	92
5.3.4. Estabilidade das Vesículas contendo 5-Fluorouracil Preparadas pelo Método de Evaporação em Fase Reversa	96
 VI- CONCLUSÕES E SUGESTÕES	 103
6.1- Conclusões	103

6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	104
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação esquemática de lipossomas como veículos para o encapsulamento de compostos hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos (verde) parcialmente imersos na bicamada (adaptado de Ribas, 1997).	5
Figura 2.2 - Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lípidios em soluções aquosas (adaptado de Moraes, 1996).	7
Figura 2.3 - Representação esquemática da formação de vesículas multilamelares através da técnica de hidratação do filme lipídico seco (adaptado de Lasic, 1988).	8
Figura 2.4 - Representação do arranjo das moléculas de lípidios na transição de fases (adaptado de New, 1990).	9
Figura 2.5 - Curvas de microcalorimetria apresentando a temperatura de transição de fases de membranas compostas por um único tipo de fosfolípido ou misturas (adaptado de New, 1990).	11
Figura 2.6 - Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e à morfologia (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994).	12
Figura 2.7 - Estrutura básica de um fosfolípido	14
Figura 2.8 - Posição ocupada pelo colesterol na bicamada lipídica (adaptado de New, 1990).	16
Figura 2.9 - Etapas da preparação de lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa (adaptado de New, 1990).	21
Figura 2.10 - Representação esquemática do mecanismo de incorporação ativa de compostos terapêuticos em lipossomas.	24
Figura 2.11 - Representação do comportamento de lipossomas na presença de tensoativo (adaptado de Lasch, 1990).	26
Figura 2.12 - Perfil de estabilidade de lipossomas sonificados na presença de tensoativo (adaptado de Ribas, 1997).	27
Figura 2.13 - Representação das vias de penetração de substâncias ativas através da pele (adaptado de Sharata e Katz, 1996).	33
Figura 2.14 - Fórmula química estrutural do ácido azelaico.	38
Figura 2.15 - Fórmula química estrutural do 5-fluorouracil.	39

Figura 2.16 - Fórmula química estrutural da Bleomicina A ₂ e B ₂ .	42
Figura 4.1 - Preparação de lipossomas encapsulando ácido azelaico pelo método de injeção de etanol.	52
Figura 4.2 - Distribuição das amostras na placa do tipo ELISA.	66
Figura 5.1-Variação da tensão superficial de soluções aquosas com distintas concentrações de AA. Para cada amostra foram obtidas 10 medidas de tensão superficial.	69
Figura 5.2 - Modelo proposto para a agregação das moléculas de AA para a formação de uma micela.	69
Figura 5.3 - Comportamento esperado das moléculas de AA na interface ar-água.	70
Figura 5.4- Isoterma de Langmuir para o ácido azelaico.	71
Figura 5.5- Eletroferograma de uma mistura artificial de lipossomas e ácido azelaico.	69
Figura 5.6- Distribuição de tamanhos de lipossomas com AA. Método de injeção de etanol. Agulha de 4 µm, temperatura de 25°C e razão droga/lipídio inicial igual a 0,1.	74
Figura 5.7- Distribuição de tamanhos de lipossomas com AA. Método de injeção de etanol. Agulha de 7 µm, temperatura de 25°C e razão droga/lipídio inicial igual a 0,1.	75
Figura 5.8- Superfícies de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2 ³ de AA cujos fatores são: razão inicial droga/lipídio, temperatura e diâmetro da agulha.	77
Figura 5.9- Distribuição de tamanhos dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para o encapsulamento de Bleomicina.	79
Figura 5.10- Diagrama apresentando os resultados obtidos para a variação dos diâmetros médios das vesículas de acordo com os níveis de temperatura e razão molar droga/lipídio.	81
Figura 5.11 – Superfície de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2 ² cujos fatores são: razão inicial droga/lipídio e temperatura. Como resposta analisada tem-se o diâmetro médio das vesículas.	82
Figura 5.12- Distribuição de tamanhos de vesículas preparadas por incorporação ativa de Bleomicina.	83

Figura 5.13- Superfície de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2 ² cujos fatores são: razão inicial droga/lípido e temperatura. Como resposta analisada tem-se a razão final droga/lípido.	84
Figura 5.14- Coeficiente de partição de 5-Fluorouracil no sistema 1-octanol/tampão Tris-HCl a 10 mM sem a adição de NaCl e com 140 mM de NaCl.	85
Figura 5.15- Superfície de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2 ³ cujos fatores são: razão inicial droga/lípido, tempo e temperatura de incubação da solução de droga e lipossomas. Como resposta analisada tem-se o diâmetro médio das vesículas.	91
Figura 5.16- Perfil de estabilidade dos lipossomas vazios (com tampão Tris-HCl no interior) e com 5-fluorouracil encapsulado a 0,1 mM.	98
Figura 5.17- Variação do diâmetro dos lipossomas vazios e encapsulando 5-fluorouracil em função do tempo de estocagem sob refrigeração à 4°C.	99
Figura 5.18- Liberação do 5-Fluorouracil encapsulado nos lipossomas em função do tempo de estocagem sob refrigeração à 4°C.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estrutura química do grupo X ligado ao grupo fosfato.	15
Tabela 2.2- Métodos de preparação e tipo de lipossomas obtidos (adaptado de Crommelin e Schreier, 1994).	18
Tabela 2.3 - Lipossomas em aplicações dérmicas.	29
Tabela 2.4 - Produtos compostos por lipossomas disponíveis comercialmente (adaptado de Lasic, 1998).	30
Tabela 4.1 - Fatores e níveis do planejamento fatorial de experimentos de encapsulamento de ácido azelaico.	51
Tabela 4.2 - Fatores e níveis do planejamento fatorial de experimentos.	52
Tabela 4.3- Ensaio de encapsulamento ativo de Bleomicina	51
Tabela 4.4- Esquema do planejamento experimental para o encapsulamento ativo de 5-fluorouracil.	56
Tabela 4.5- Experimentos realizados no encapsulamento ativo de 5-fluorouracil em lipossomas.	57
Tabela 5.1- Coeficientes de partição de ácido azelaico no sistema 1-octanol/hepes.	68
Tabela 5.2-Concentração lipídica e diâmetros médios das vesículas encapsulando AA preparadas pelo método de injeção de etanol.	74
Tabela 5.3- Diâmetros médios de vesículas encapsulando AA após 30 dias a 5°C e variações percentuais com relação aos diâmetros médios iniciais.	76
Tabela 5.4- Eficiência de encapsulamento ativo da droga bleomicina e diâmetro médio das vesículas.	80
Tabela 5.5- Alterações na absorbância de solução de 5-FU a 0,4 mM por exposição a diferentes temperaturas por distintos períodos, iguais aos tempos de incubação da solução de droga com os lipossomas vazios por ocasião do encapsulamento ativo.	87
Tabela 5.6- Concentração final de lipídios e diâmetros médios das vesículas obtidas por encapsulamento ativo de 5-FU.	86
Tabela 5.7- Caracterização dos lipossomas encapsulando 5-FU solubilizada em Tris-HCl a pH 7,4 com 140 mM de NaCl preparados por incorporação passiva durante o processo de hidratação do filme lipídico.	93
Tabela 5.8- Preparações de lipossomas obtidos pela técnica de evaporação em fase	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 - Efeitos calculados do planejamento experimental para o encapsulamento de ácido azelaico.	75
Quadro 5.2 - Efeitos das variáveis do planejamento experimental para encapsulamento de Bleomicina por incorporação ativa no diâmetro final das vesículas.	81
Quadro 5.3 - Efeitos calculados do planejamento experimental para encapsulamento de bleomicina por incorporação ativa (para variável resposta, eficiência de encapsulamento).	84
Quadro 5.4 - Efeitos calculados do planejamento experimental sobre o diâmetro médio das vesículas obtidas no encapsulamento ativo de 5-fluorouracil.	88

Nomenclatura e Abreviações

AA – Ácido Azelaico

(AA/L)_{inicial} – Razão molar ácido azelaico /lipídio inicial

(AA/L)_{final} – Razão molar ácido azelaico /lipídio final

BLE – Bleomicina

BSO – Butionina sulfoximina

C₁₂E₅ – Polioxietileno 5 lauril éter

Col - Colesterol

CHS – Colesteril Sulfato

CM – Ceramidas

c.m.c. – Concentração micelar crítica

CO₂ – Dióxido de carbono

D – Diâmetro da agulha

(D/L)_{inicial} – Razão molar droga /lipídio inicial

(D/L)_{final} – Razão molar droga /lipídio final

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

DSPC –Distearoilfosfatidilcolina

EA – Ácido etacrínico

5-FU – 5-Fluorouracil

[HA⁺] – Concentração do composto terapêutico protonado

[H⁺] – Concentração de prótons

4-HA – 4- Hidroxianisol

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HPLC – “High performance liquid chromatography”

ME – Microemulsão

MEEKC – “Microemulsion electrokinetic chromatography”

NaCl – Cloreto de sódio

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Molibdato de amônio

PA – Ácido palmítico

PC – Fosfatidilcolina

PI – Fosfatidilinositol

PS – Fosfatidilserina

PVC – Cloreto de Polivinila

QLS – “Quasi elastic light scattering”

SDS – Dodecilsulfato de sódio

T_{inj} – Temperatura na injeção

T_m – Temperatura de transição de fases

Tris-HCl – Tampão Tris-HCl

UV – Ultra violeta

VML - Vesícula multilamelar

VMV - Vesícula multivesicular

VOL - Vesícula oligolamelar

VUP – Vesícula unilamelar pequena

VUG - Vesícula unilamelar grande

Resumo

A pesquisa envolvendo o uso de veículos para a liberação controlada de agentes anti-câncer no interior de tumores tem-se intensificado nos últimos anos. Dentre os veículos testados destacam-se os lipossomas, ou vesículas lipídicas. Este trabalho teve por objetivo a preparação e caracterização de lipossomas encapsulando compostos de interesse na terapia de melanomas, em formulações potencialmente adequadas para administração por via dermatológica.

Os encapsulamento em lipossomas de 5-fluorouracil e bleomicina, em caráter detalhado, e de ácido azelaico, em caráter preliminar, foram avaliados empregando-se diferentes métodos de incorporação. As formulações preparadas foram caracterizadas quanto às concentrações finais de lipídios e de drogas e quanto aos diâmetros médios das vesículas. Os lipossomas encapsulando 5-fluorouracil, por terem apresentado melhor eficiência de encapsulamento, tiveram sua estabilidade de estocagem e na presença do tensoativo $C_{12}E_5$ avaliadas, para a verificação da integridade da bicamada lipídica.

A bleomicina foi incorporada aos lipossomas através de encapsulamento ativo por gradiente de pH e de injeção de etanol. Ambas as técnicas resultaram em reduzida eficiência de encapsulamento.

O encapsulamento do 5-fluorouracil pelos métodos de hidratação do filme lipídico, incorporação ativa empregando gradiente de pH, injeção de etanol e evaporação em fase reversa indicaram que a última técnica foi a mais adequada do ponto de vista da eficiência de encapsulamento, porém este processo ainda pode ser otimizado. Na presença do tensoativo, verificou-se que a droga promove estabilização das vesículas. Quando estocados a 4°C, estes lipossomas não sofreram agregação ou fusão no período de um mês, tendo, entretanto, liberado praticamente toda a droga encapsulada neste período.

O encapsulamento de ácido azelaico mostrou-se promissor, entretanto a quantificação da droga encapsulada não pôde ser efetuada.

Palavras-chave: Lipossomas, Encapsulamento, Ácido azelaico, 5-Fluorouracil e Bleomicina.

Abstract

The investigation with vehicles for controlled release of anticancer agents into tumours has been intensified in the last years. Among the vehicles tested, outstanding liposomes or lipid vesicles, for drug delivery. The aim of this work was the preparation and characterization of liposomes entrapping compounds of interest in melanoma therapy with potential to be topically administered.

The entrapment of 5-fluorouracil and bleomycin in liposomes, in a detailed form, and of azelaic acid, in a preliminary form, were analyzed using different incorporation methods. The formulations were evaluated for stability both concerning storage and in the presence of the surfactant C₁₂E₅, to verify the lipid bilayer integrity.

Bleomycin was incorporated in liposomes by active loading with pH gradients and by ethanol injection. Both methods have resulted in low encapsulation efficiency.

The entrapment of 5-fluorouracil was tested by the hydration of a dried lipid film, active loading with pH gradients, ethanol injection and reverse-phase evaporation demonstrating that the last method was the most efficient in terms of encapsulation capacity, however this process should be optimized. In the presence of the surfactant, it was observed that the drug promotes the stabilization of these vesicles. When stored at 4°C, these liposomes showed no fusion or aggregation during a month, however the drug was completely released from the vesicles in this period.

The loading of azelaic acid seemed to be feasible, however the quantification of the encapsulated drug could not be performed.

Key words: Liposomes, Encapsulation, 5-Fluorouracil, Azelaic Acid and Bleomycin.

I. Introdução

A pele é o tecido do corpo humano mais exposto aos efeitos ambientais externos, tais como raios solares, umidade reduzida, ventos, água do mar e piscina e poluição, entre outros. Alterações ambientais podem provocar a formação de falhas na camada de ozônio que envolve e protege a Terra dos raios ultra-violeta (UV) emitidos pelo sol. Devido às falhas na camada de ozônio, ficamos mais expostos a tal radiação. Com isso, doenças de pele, como por exemplo, câncer de pele e hiperpigmentações diversas são preocupações atuais da área dermatológica, pois apresentam índices crescentes.

Os raios UV do sol atuam nos melanócitos, células responsáveis pela síntese de melanina. A melanina é o principal pigmento da pele, sendo responsável por sua coloração, oferecendo proteção contra a radiação solar excessiva. Este pigmento é originado através da oxidação da tirosina pela enzima tirosinase. A luz UV possibilita tal oxidação, desencadeando o processo de sua formação. A produção descontrolada de tal substância resulta em hiperpigmentação da pele, o que pode levar a doenças como câncer de pele, em especial o melanoma maligno.

Dentre os tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais sério e tem apresentado maior índice de progressão mundial. Na última década, o melanoma maligno cutâneo foi uma das doenças que mais rapidamente desenvolveu-se no homem e tem-se uma previsão de que sua incidência vá aumentar ainda mais com o avanço das falhas na camada de ozônio (Slominski, 1995).

Entre os diversos tipos de câncer, o de pele é o mais comum entre os norte americanos. A incidência anual é de 700.000 casos resultando numa taxa de mortalidade de 9000 pessoas por ano. Os maiores fatores de risco para o câncer de pele é a sensibilidade da pele e sua exposição à radiação ultravioleta. Embora os efeitos da exposição ao sol sejam observados em idades mais avançadas, de 50 a 80 % da exposição total aos raios solares ocorre até o indivíduo completar os 18 anos.

De acordo com a Central de registro de câncer de New South Wales, Austrália, a incidência de melanoma maligno é superior em homens em relação às mulheres. Segundo projeção realizada para o ano 2006, deve haver um aumento de 48% dos casos em mulheres e de até 80% entre os homens. Este aumento faz referência ao número de casos registrados

em 1996 na Austrália, país com maior incidência de casos de melanoma, onde neste ano foram diagnosticados 1068 casos entre as mulheres e 1458 entre os homens. Assim, este assunto tem recebido atualmente bastante atenção por parte de diversos pesquisadores.

O tratamento de melanomas malignos cutâneos pode envolver, dependendo do estágio de desenvolvimento do tumor, cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, dentre outros métodos, ou sua combinação. Embora a remoção cirúrgica seja normalmente a estratégia inicial para a terapia do tumor, o uso tópico de agentes quimioterápicos é de grande interesse para a redução do tamanho original do tumor que necessita ser extirpado. Assim, o estudo de veículos destinados ao transporte seletivo de drogas para células de melanoma maligno pode, eventualmente, conduzir ao aumento da qualidade de vida do paciente.

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, têm sido utilizados com sucesso como transportadores de compostos terapêuticos, agentes dermocosméticos, enzimas, material genético e outras macromoléculas para o interior de células vivas (Lasic, 1992). Embora estas vesículas tenham sido descobertas em 1961 por Alec D. Bangham, somente no final dos anos 80 foram lançados os primeiros produtos contendo lipossomas para aplicações dérmicas. Neste campo, as indústrias que mais se desenvolveram nos últimos anos foram as empresas de cosméticos.

O desenvolvimento bem sucedido de lipossomas para aplicações dermatológicas depende basicamente do tipo de composto que se deseja encapsular e da metodologia de preparação das vesículas. Para a obtenção de uma formulação eficiente no tratamento tópico de melanomas, é essencial a seleção de agentes ativos adequados e de uma estratégia de sua administração.

A seleção da composição em lipídios, do tamanho das vesículas e do método utilizado para a incorporação do agente ativo nos lipossomas são elementos fundamentais no projeto destes sistemas, determinando as características físico-químicas e o impacto biológico final associado à sua administração. Para a determinação destas variáveis é necessário um estudo dos métodos disponíveis, da relação entre custo e benefício entre métodos e produtos obtidos e da disponibilidade e custo da matéria-prima. Uma vez estabelecida a metodologia, é essencial o uso de estratégias de otimização de maneira a

garantir, entre outros fatores, a incorporação eficiente e econômica do composto ativo selecionado, bem como a estabilidade química e física do sistema obtido.

Vários grupos de pesquisa demonstraram em estudo pré-clínicos a potencialidade do uso de diferentes drogas encapsuladas em lipossomas na terapia de diversas doenças, entre elas a leishmaniose, a artrite, infecções fúngicas sistêmicas e especialmente o câncer. O projeto racional de vesículas contendo drogas ou vacinas encapsuladas aliado ao avanço recente na tecnologia de lipossomas culminou no desenvolvimento de diversas formulações injetáveis com uso já licenciado em humanos (Chon e Cullis, 1995; Lasic e Martin, 1995), onde destacam-se o Ambisome (vesículas contendo anfotericina B) e a Doxil (lipossomas contendo doxorubicina).

Neste trabalho avalia-se o encapsulamento em lipossomas de três compostos terapêuticos, o ácido azelaico (AA), o 5-fluorouracil (5-FU) e a bleomicina (BLE), empregando-se diversas metodologias, visando-se a incorporação eficiente e estável destas drogas em vesículas lipídicas. Dentre estes compostos, o AA é o único para o qual não foram localizados outros trabalhos envolvendo seu encapsulamento em lipossomas.

II-Revisão da Literatura

2.1. Considerações gerais sobre lipossomas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO DE CIRCULANTE

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas ocas nas quais o volume aquoso central é circundado por uma membrana composta de lipídios. O diâmetro destas vesículas pode variar de dezenas de nanômetros a dezenas de micra.

Por consistirem de uma parte polar ou cabeça hidrofílica (grupo fosfato) ligada a uma cauda hidrofóbica apolar (geralmente formada por duas cadeias longas de ácidos graxos), os fosfolipídios exibem propriedades anfífilas e tendem a agregar-se em estruturas ordenadas acima de uma concentração crítica. A estrutura em bicamadas dos lipossomas confere-lhes a capacidade de incorporação de compostos hidrofílicos, hidrofóbicos e anfipáticos, pois estas vesículas apresentam um ambiente lipofílico, composto pela membrana fosfolipídica, e um meio interno aquoso (Ostro, 1987; Lasic, 1992).

A Figura 2.1 ilustra a estrutura básica de um lipossoma e a possível localização de moléculas quando nele incorporadas.

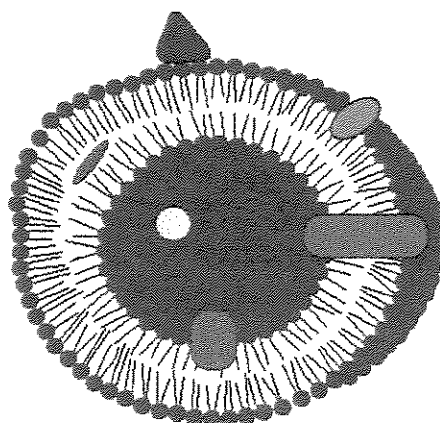


Figura 2.1 - Representação esquemática de lipossomas como veículos para o encapsulamento de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela) ou ligados à superfície interna/externa (lilás), hidrofóbicos no interior da bicamada lipídica (azul) ou de natureza anfífilica (verde) parcialmente imersos na bicamada (adaptado de Ribas, 1997).

As seções seguintes irão abordar aspectos relevantes na obtenção de lipossomas com características específicas, tais como: formação, classificação, composição, métodos de preparação, métodos de incorporação de agentes ativos e estabilidade de vesículas lipídicas.

2.1.1. Princípio da formação das vesículas

Os lipossomas são estruturas vesiculares compostas de bicamadas lipídicas hidratadas. Em geral, os lipossomas são constituídos de fosfolípidios e colesterol, contudo, nem todos os fosfolípidios são capazes de formar bicamadas quando hidratados. Outras formas de agregação seriam, por exemplo, a hexagonal invertida (formada por fosfatidiletanolamina sob certas condições) ou micelas (resultantes de lisofosfolípidos).

As moléculas de fosfolípidios apresentam propriedades anfífilas, sendo formadas por regiões polares e apolares bem definidas. Estas substâncias dispõem-se em formas organizadas quando em contato com meios aquosos. A altas concentrações, os fosfolípidios em água são capazes de formar predominantemente fases lamelares, enquanto que em soluções mais diluídas as moléculas normalmente formam estruturas esféricas ou ovais fechadas nas quais as bicamadas de fosfolípidios envolvem um cerne aquoso. O tipo de estrutura formada pela associação de moléculas de lípidios depende das características das moléculas envolvidas, podendo originar agregados com diferentes morfologias (Lasic, 1988; Moraes, 1996), como mostra a Figura 2.2. O mecanismo de formação dos lipossomas ainda não está totalmente definido, pois técnicas para o estudo das estruturas intermediárias deste processo ainda estão em desenvolvimento. A instabilidade termodinâmica das estruturas de transição dificulta análises por técnicas de espectroscopia, difração e microscopia.

No início da década de 80, Lasic propôs um mecanismo para a formação dos lipossomas através da técnica de remoção de detergente, predizendo a formação de estruturas intermediárias como micelas de fosfolípidios em forma discóide. Mais tarde, este modelo foi generalizado de forma a abranger outras técnicas de preparação de lipossomas. Neste modelo mais genérico, foi suposta a formação de um fragmento de bicamada lipídica como estrutura intermediária na formação dos lipossomas. Este fragmento seria

termodinamicamente instável nas suas extremidades, podendo então curvar-se, e fechando-se, daria origem a uma vesícula (Lasic, 1988).

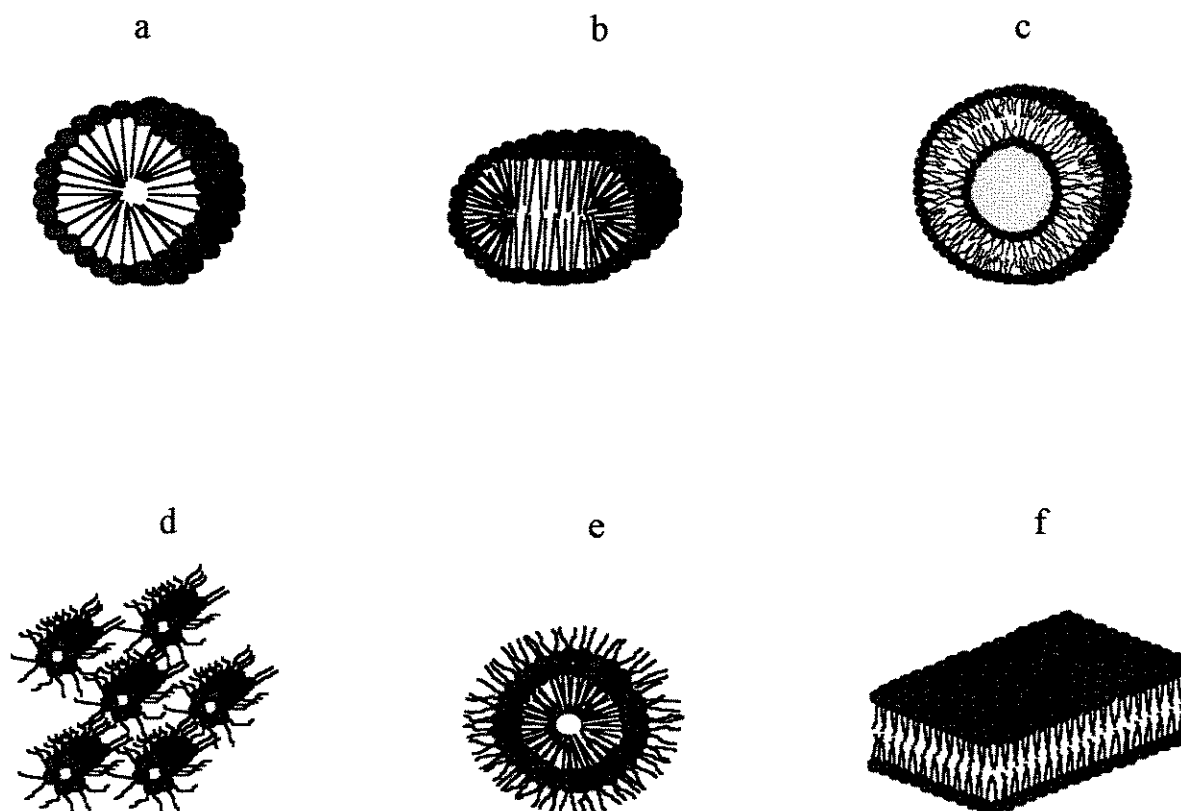


Figura 2.2 – Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lipídios em soluções aquosas. O tipo de estrutura geométrica resultante do empacotamento dos lipídios é determinado pelos tamanhos relativos das cabeças polares e das caudas apolares, assim como da concentração lipídica. Lipídios com cabeças polares relativamente grandes formam estruturas com elevados raios de curvatura (a, b e c). Lipídios com cabeças polares muito pequenas e caudas apolares grandes são empacotados em estruturas invertidas, onde as cadeias de hidrocarboneto compõem a camada externa (d e e). Misturas de lipídios com cabeças polares grandes e pequenas também podem formar vesículas (c). Moléculas de lipídios com partes polares e apolares de tamanho similar tendem a formar bicamadas achatadas (f), que podem se fechar sobre si mesmas, formando um lipossoma (figura adaptada de Moraes, 1996).

Vesículas multilamelares são formadas espontaneamente quando um filme lipídico seco é colocado em presença de água ou tampão em excesso. Para a obtenção de vesículas unilamelares a partir de fosfolípidios não carregados é necessário que seja fornecida energia ao sistema, por exemplo por processos de sonicação. O estágio com menor energia livre é o de precipitado hidratado. As vesículas multilamelares necessitam de um pouco mais de energia, que deve ser aumentada para a obtenção de vesículas unilamelares grandes e ainda maior para as vesículas unilamelares pequenas.

No processo de formação de vesículas multilamelares através de hidratação de filme lipídico seco, com a adição de água as bicamadas lipídicas vão sendo progressivamente hidratadas e, sob agitação, as bicamadas se desprendem do filme depositado nas paredes do frasco e se reorganizam na forma de vesículas fechadas sobre um cerne aquoso, conforme ilustrado na Figura 2.3.

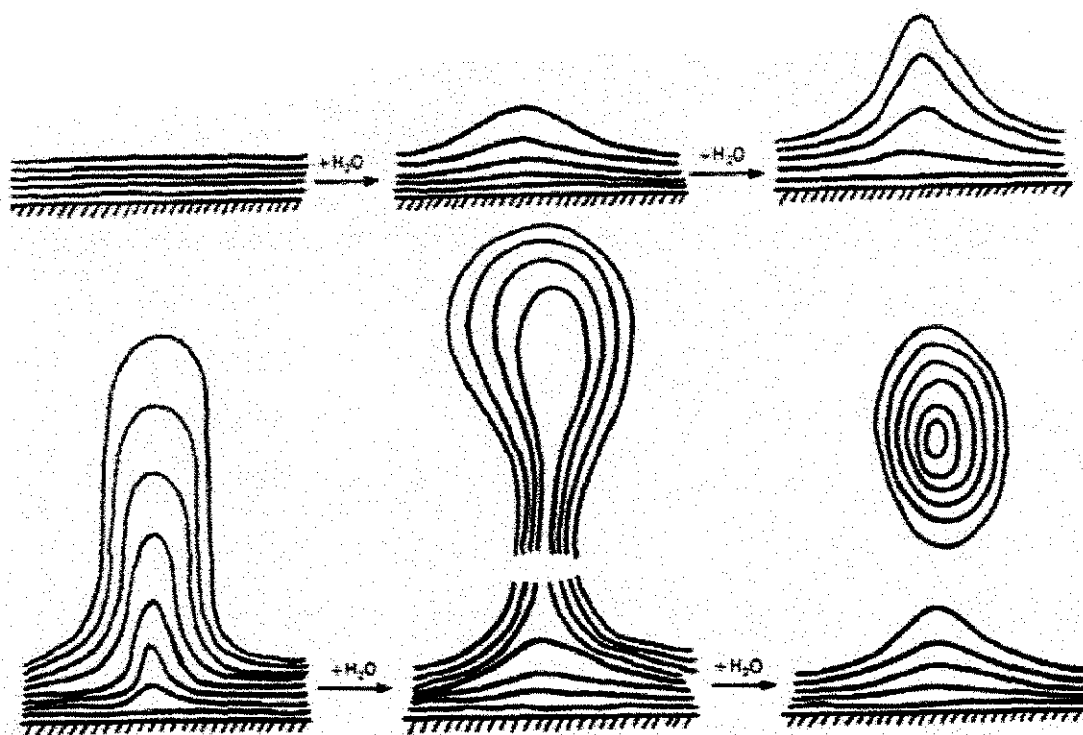


Figura 2.3.- Representação esquemática da formação de vesículas multilamelares através da técnica de hidratação do filme lipídico seco. As linhas representam as bicamadas lipídicas. Figura adaptada de Lasic (1988).

As fases lamelares hidratadas formadas em excesso de água podem ocorrer em dois estados diferentes: (1) fase gel ou ordenada, na qual as cadeias de hidrocarboneto estão totalmente estendidas e empacotadas bem próximas umas das outras, e (2) fase líquida cristalina ou desordenada, onde as cadeias de hidrocarboneto estão aleatoriamente ordenadas e fluidas. A representação esquemática do empacotamento das moléculas lipídicas de uma membrana nos estados gel e líquido cristalino pode ser observada na Figura 2.4. A transição de um estado para outro ocorre através de alteração de temperatura ou sob temperatura constante, e também pela mudança da pressão. Se as bicamadas forem compostas de fosfolípídios carregados negativamente, a mudança de um estado a outro pode se dar pela alteração do pH da solução aquosa.

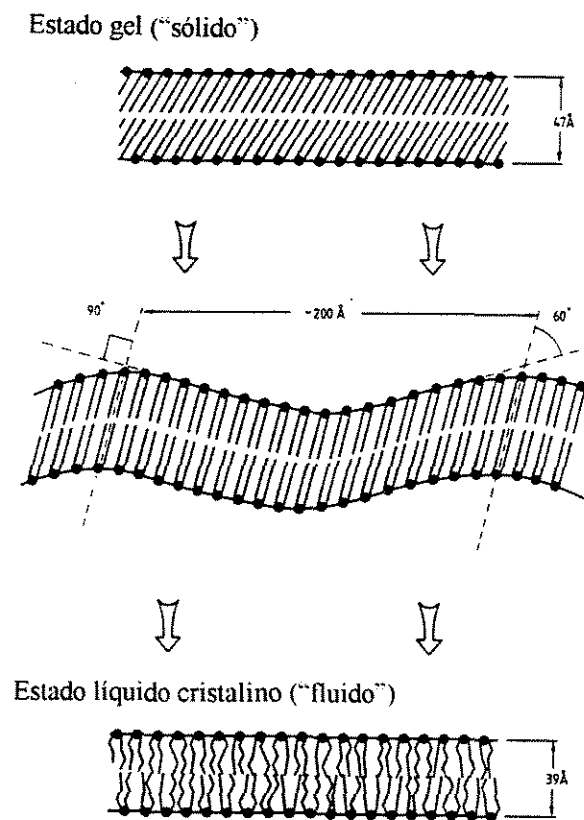


Figura 2.4- Representação do arranjo das moléculas de lipídios na transição de fases.
(Figura adaptada de New, 1990).

A temperatura de transição de fases (T_m) do estado gel para o líquido cristalino depende de fatores tais como natureza e carga do grupo polar, além do comprimento e grau de insaturação das cadeias apolares. A existência de insaturações na cadeia apolar leva à diminuição da temperatura de transição, dependendo da posição da dupla ligação. Quanto maior o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, mais fortes se tornam as interações de van der Waals, e mais energia é requerida para romper o empacotamento ordenado, ou seja, maior a temperatura de transição de fases. Esta temperatura de transição pode variar de -15°C para a fosfatidilcolina de ovo (com alto grau de insaturação nas cadeias acila) para mais de 50°C para a distearoilfosfatidilcolina (DSPC) completamente saturada (Barenholz e Crommelin, 1994).

A técnica mais comumente empregada para a determinação da temperatura de transição de fases é a Microcalorimetria Diferencial de Varredura, MicroDSC. Na Figura 2.5 podem ser observadas curvas de temperatura de transição de fases através da microcalorimetria para fosfolípidios de cadeias acilas de diferentes comprimentos. Como pode ser observado, existe uma grande variação na temperatura de transição de fases destes fosfolípidios em função do aumento da sua região hidrofóbica. O comprimento das cadeias varia de 12 carbonos para a dilauroilfosfatidilcolina (DLPC) até 18 carbonos nas cadeias da distearoilfosfatidilcolina (DSPC). A dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfolípido empregado neste trabalho, apresenta temperatura de transição de fases de 41°C (New, 1990).

Com a mistura de diferentes fosfolípidios, ocorre alteração na temperatura de transição de fases ou até mesmo o seu desaparecimento completo.

Informações sobre a temperatura de transição de fases são de fundamental importância para a seleção dos fosfolípidios constituintes dos lipossomas uma vez que a T_m determina propriedades como a fusão e agregação de vesículas, permeabilidade da bicamada e sua interação com proteínas. Com isso, dependendo da T_m , os lipossomas podem ter sua estabilidade e comportamento em sistemas biológicos diferenciados (New, 1990).

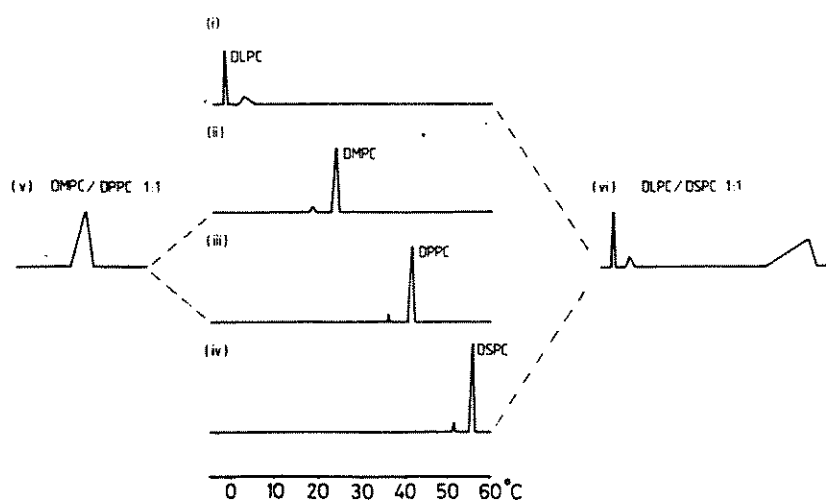


Figura 2.5- Curvas de Microcalorimetria Diferencial de Varredura apresentando a temperatura de transição de fases de membranas compostas por um único tipo de fosfolipídio ou por misturas. (Figura adaptada de New, 1990).

2.1.2. Classificação dos Lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas que apresentam em sua composição. Esta classificação, sob o ponto de vista estrutural e suas possíveis morfologias, estão ilustradas na Figura 3.6.

As vesículas lipídicas compostas por várias camadas lipídicas separadas por compartimentos fluidos, são denominadas vesículas multilamelares. Se apresentarem no seu interior outras vesículas de tamanhos variados, são conhecidas como vesículas multivesiculares. E, aquelas formadas por uma única região aquosa central são denominadas unilamelares, podendo ser pequenas ou grandes.

Contudo, a nomenclatura dos lipossomas ainda não está padronizada na literatura. A definição de faixas de tamanhos das vesículas unilamelares grandes (VUG) e pequenas (VUP) pode variar dependendo dos autores. Segundo Mayer et al. (1986), as VUP são definidas como vesículas de “tamanho limite”, isto significa que apresentam o menor tamanho possível para que ocorra a formação de lipossomas. Este tamanho limite mínimo

depende das condições de empacotamento das bicamadas. Todas as demais vesículas unilamelares, para estes autores, são definidas como grandes. Por outro lado, Barenholz e Crommelin (1994) sugerem que são classificadas como grandes as vesículas que não sofrem efeitos de curvatura das suas bicamadas lipídicas nas propriedades físicas das mesmas. Entende-se aqui como propriedades físicas das vesículas a distribuição de fosfolípidios entre as monocamadas formadoras da lamela dos lipossomas e a transição de fase gel/líquido cristalino. De acordo com este critério, o diâmetro mínimo para que as vesículas sejam consideradas grandes é 100 nm e as VUP são aquelas com diâmetros inferiores a este valor.

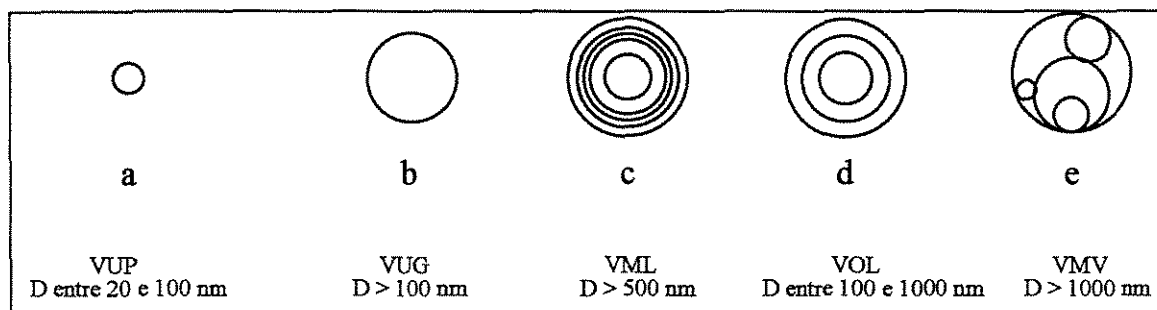


Figura 2.6 - Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro (D) e à morfologia. VUP: Vesícula unilamelar pequena; VUG: vesícula unilamelar grande; VML: vesícula multilamelar; VOL: vesícula oligolamelar; VMV: vesícula multivesicular. O diâmetro das vesículas está expresso em nanômetros. (Figura adaptada de Barenholz e Crommelin, 1994).

A técnica utilizada na preparação das vesículas, a seleção de lipídios, e as condições de preparação fazem com que os lipossomas possam variar em tamanho, número e posição das lamelas. Por exemplo, vesículas multilamelares (VML) *versus* vesículas multivesiculares (VMV), carga e rigidez da bicamada (estado de líquido cristalino *versus* gel). Estes parâmetros influenciam o comportamento dos lipossomas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Quando os lipossomas são administrados por vias sistêmicas pode ocorrer o processo de opsonização. Neste processo, ocorre a adsorção na superfície dos lipossomas de proteínas do sangue conhecidas por opsoninas. Tais proteínas promovem o reconhecimento das vesículas pelo sistema imunológico (chamado de sistema

reticuloendotelial), fazendo com que estas sejam removidas da corrente sanguínea. Fatores como o processo de opsonização, o perfil de liberação dos lipossomas na corrente sanguínea, sua distribuição no corpo e a vida de prateleira são dependentes do tipo de lipossoma empregado, ou seja, do seu tamanho, composição e método de preparação, daí a importância da escolha destes parâmetros, visando principalmente, a via de administração e sua estabilidade.

2.1.3- Composição dos lipossomas

Na composição dos lipossomas, além dos fosfolípidios, que são os principais componentes de membranas biológicas, pode-se utilizar o colesterol, o qual torna a vesícula mais rígida e menos permeável.

Existem cinco grupos de fosfolípidios que podem ser utilizados na preparação de lipossomas: fosfolípidios de fontes naturais, fosfolípidios naturais modificados, fosfolípidios semissintéticos, fosfolípidios totalmente sintéticos e fosfolípidios com grupos polares não naturais. Classificam-se como fosfolípidios naturais aqueles obtidos de fontes também naturais como ovo e soja, por exemplo. Nesta categoria estão incluídos os fosfolípidios do tipo: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SPM). Como alguns fosfolípidios naturais apresentam insaturações nas cadeias de ácidos graxos, o que facilita os processos de oxidação, estas moléculas podem passar por processos catalíticos de hidrogenação a fim de melhorar a estabilidade de lipossomas constituídos dos mesmos. Neste caso, denominam-se fosfolípidios naturais modificados.

No terceiro grupo, de fosfolípidios semissintéticos, estão aqueles naturais que possuem, por exemplo, uma cadeia acila substituída, e se o fosfolípido for totalmente sintetizado química ou enzimaticamente, denomina-se totalmente sintético. Por último, estão os fosfolípidios que tenham algum ligante acoplado na região polar da molécula. Como ligantes podem ser utilizados anticorpos para conferir maior especificidade à molécula ou por exemplo a inclusão de polietilenoglicol (PEG) a fim de obter lipossomas de longa circulação, sendo então denominados de fosfolípidios com grupos polares não naturais (Crommelin e Schreier, 1994).

A Figura 2.7 ilustra a estrutura básica de um fosfolípido. O grupamento X tem sua estrutura particular para cada fosfolípido. Na Tabela 2.1 estão apresentados alguns grupamentos X e os nomes dos fosfolípidos resultantes.

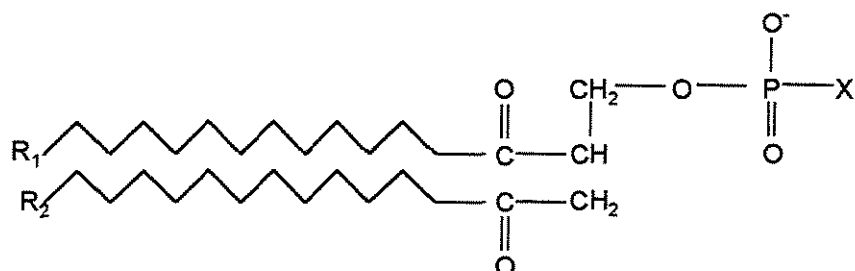


Figura 2.7 - Estrutura básica de um fosfolípido

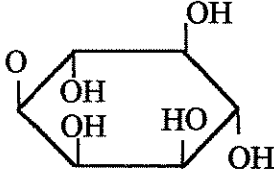
O tipo mais comum de fosfolípido é a fosfatidilcolina (PC), também conhecida como lecitina e tanto pode ser obtida de fontes naturais como sinteticamente. A PC é extraída da gema do ovo, soja ou menos comumente, do coração ou da medula espinhal de bovinos. Como a PC é o tipo de fosfolípido mais abundante em membranas biológicas, esta é a categoria de fosfolípidos mais empregada na composição de lipossomas. Este lipídio ainda é bastante utilizado por apresentar baixo custo em relação aos demais fosfolípidos, por ter carga líquida neutra e ser quimicamente inerte (New, 1990). Os fosfolípidos do tipo fosfatidilcolina de fontes naturais são constituídos de uma mistura de fosfatidilcolinas, variando o tamanho e grau de insaturação das cadeias de hidrocarboneto.

Fosfolípidos sintéticos podem ser preparados a partir de glicerol ou glicero-3-fosfocolina derivado de fonte vegetal ou animal. Os lipídios derivados de glicerol requerem um centro quiral preparado sinteticamente, o que pode originar a presença de impurezas estereoquímicas no produto final.

O colesterol é um tipo de lipídio, do grupo dos esteróis, bastante empregado no preparo de lipossomas, uma vez que também está presente em abundância em células de mamíferos. Isoladamente esta molécula não é capaz de se organizar em bicamadas, mas tem papel fundamental no empacotamento das bicamadas lipídicas. As moléculas de colesterol preenchem os espaços vazios originados no empacotamento de fosfolípidos (New, 1990), como ilustrado na Figura 2.8, modificando a liberdade de movimentação das cadeias acilas dos fosfolípidos. Para temperaturas acima da temperatura de transição de fases do principal

fosfolípido constituinte do lipossoma, a presença de colesterol diminui a movimentação das cadeias acila, ou seja, a membrana “condensa” levando a menor fluidez da bicamada. Abaixo desta temperatura de transição de fases, o empacotamento dos grupos polares dos fosfolípidos são enfraquecidos e, portanto, confere fluidez e permeabilidade às membranas e ainda maior estabilidade física quando incorporado em lipossomas (New, 1990; Thoma e Jocham, 1992).

Tabela 2.1– Estrutura química do grupo X ligado ao grupo fosfato.

Estrutura do Grupo X	Fosfolípido
$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{Me} \\ \\ \text{Me} \end{array} +$	Fosfatidilcolina
$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N H}_3^+$	Fosfatidiletanolamina
$\begin{array}{c} \text{N H}_3^+ \\ \diagup \\ \text{O}-\text{CH} \\ \diagdown \\ \text{COO}^- \end{array}$	Fosfatidilserina
$\begin{array}{c} \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	Fosfatidilglicerol
	Fosfatidilinositol

Existe também a possibilidade da preparação de lipossomas constituídos de lipídios do estrato córneo, camada mais externa da pele, que se traduzem em uma alternativa interessante por serem bastante biocompatíveis com a pele. Os lipídios mais abundantes no estrato córneo são: ceramidas, colesterol e ácidos graxos. Ceramidas e colesterol juntos não formam lipossomas, é preciso a presença de ácidos graxos. Pouco se sabe ainda a respeito das características destes lipossomas, havendo a necessidade da realização de estudos complementares com estas vesículas, para estudar sua interação com a pele e seu potencial para aplicação em tratamento de doenças de pele, com administração por via tópica, e mesmo para outras vias de administração (Wertz, 1992).

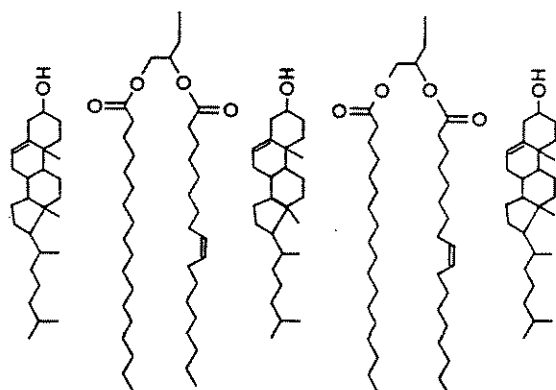


Figura 2.8 – Posição ocupada pelo colesterol na bicamada lipídica. O colesterol se situa na membrana com o grupo hidroxila na direção dos grupos carboxila das cadeias acil do fosfolípido. O núcleo planar do esteróide localiza-se paralelamente aos primeiros nove carbonos da cadeia acil, porção da cadeia onde a sua movimentação é severamente restrita na ausência do colesterol. Por outro lado, o movimento dos últimos carbonos da cadeia é relativamente livre, e aumentado com a presença de colesterol, uma vez que a inserção do esteróide no início da cadeia cria mais espaço para os carbonos do fim da cadeia (figura adaptada de New, 1990).

2.1.4. Métodos de preparação de lipossomas

A escolha da técnica de preparação dos lipossomas deve ser baseada em fatores como eficiência, simplicidade, segurança e potencial para ampliação de escala.

São muitos os métodos de preparação de lipossomas, cabendo aqui descrever mais detalhadamente aqueles de interesse neste trabalho. A Tabela 2.2 lista métodos de preparação, assim como técnicas de redução de tamanho dos lipossomas e de remoção de material não encapsulado comumente empregados.

Os métodos utilizados na etapa de hidratação podem ser divididos em: mecânicos, baseados na substituição de um solvente orgânico por um meio aquoso, baseados na remoção de detergente, baseados na transformação de tamanho e fusão, e fundamentados no ajuste de pH.

Na etapa de obtenção dos lipossomas no tamanho desejado, são utilizados em geral os processos de extrusão a baixa ou alta pressão e sonicação.

E, para a remoção do material não encapsulado dispõe-se de técnicas como a diálise, ultracentrifugação, cromatografia de permeação em gel e troca iônica.

A seguir, serão detalhados apenas os métodos de preparação, redução de tamanho e remoção da droga não encapsulada nos lipossomas empregados no desenvolvimento deste trabalho.

Método de Hidratação do Filme por Agitação Mecânica

Este método é baseado no conceito mais simples de formação de lipossomas, a dispersão mecânica. No método de hidratação do filme, os lipídios são secos, a partir de uma solução em solvente orgânico, formando um filme sobre uma superfície sólida (em um recipiente de fundo redondo, por exemplo) e então dispersos pela adição de uma fase aquosa seguida de agitação. Quando na forma de um filme seco, as moléculas de fosfolipídios já estão empacotadas como nas bicamadas dos lipossomas.

Tabela 2.2 – Métodos de preparação e tipo de lipossomas obtidos (tabela adaptada de Crommelin e Schreier, 1994).

Método	Tipo de vesícula
<i>Etapa de hidratação do filme lipídico</i>	
1. Métodos mecânicos a. Agitação manual ou por vórtex b. Microfluidização c. Borbulhamento de gás inerte d. Homogenização com alto cisalhamento 2. Métodos baseados na substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas a. Remoção dos solventes orgânicos antes da hidratação b. Evaporação em fase reversa c. Uso de solventes imiscíveis em água d. Uso de solventes miscíveis em água (ex. injeção de etanol) 3. Métodos baseados na remoção de detergentes a. Cromatografia de permeação em gel b. Diálise lenta c. Diálise rápida d. Técnicas mistas 4. Métodos baseados na modificação de tamanho e fusão a. Fusão espontânea de VUP na fase gel b. Congelamento / descongelamento c. Liofilização d. Desidratação/reidratação seguida ou não de ajuste de tamanho e. Fusão induzida pelo íon Ca^{2+} f. Crescimento de lipossomas induzido por detergente 5. Métodos baseados em ajuste de pH	VML VUP, VOL, VML VML, VUG, VOL VUG, VOL, VML VML, VOL, VUP VUP VUG, VOL, VML VML, VOL, VUP VUP VUG, VPL, VML VUG, VOL VML, VOL, VUG, VUP VUG VML VML VUP, VUG VUG, VOL, VML VUG, VOL VUP, VUG
<i>Etapa de redução de tamanho</i>	
1. Extrusão a alta pressão 2. Extrusão a baixa pressão 3. Tratamento com ultrassom	VOL, VUP, VUG VUP, VUG VUP

Com a adição da fase aquosa ocorre a hidratação entre as camadas lipídicas, que vão inchando, e a agitação promove o desprendimento das bicamadas hidratadas já na forma de vesículas, conforme mencionado anteriormente. Nesta etapa ocorre a formação de vesículas multilamelares. A eficiência de encapsulamento de substâncias hidrofílicas depende do percentual de captura da solução aquosa contendo o material que se deseja encapsular, sendo bem menor em relação aos compostos lipofílicos, já que estes podem apresentar até 100% de eficiência de encapsulamento na bicamada lipídica (New, 1990).

Método de Injeção de Etanol

Neste método, os lipídios são primeiramente dissolvidos em uma solução orgânica e então colocados em contato com uma solução aquosa. Os métodos envolvendo dispersão de solventes subdividem-se em três categorias.

Na primeira categoria, o solvente orgânico é miscível com a fase aquosa. Na segunda categoria, o solvente é imiscível com a fase aquosa, sendo o processo conduzido em excesso de fase aquosa. Na terceira categoria, o solvente orgânico é miscível com a fase aquosa, sendo empregado em excesso.

Na categoria de solvente orgânico miscível com a fase aquosa enquadra-se o método de injeção de etanol, que foi primeiramente desenvolvido por Batzri e Korn (1973). Esta técnica consiste na injeção rápida de uma solução de lipídios em etanol em uma fase aquosa salina ou outro meio aquoso, através de uma seringa provida de uma agulha fina. A força de injeção em geral é suficiente para proporcionar mistura completa, de forma que o etanol é diluído quase que instantaneamente na fase aquosa e as moléculas de fosfolipídios são dispersas no meio organizadas em vesículas. Com esta técnica obtém-se uma alta proporção de vesículas unilamelares pequenas (diâmetros da ordem de 25 nm), embora possam ser formados agregados de lipídios e mesmo vesículas maiores se a mistura não for suficiente (New, 1990). Este método possui a vantagem de apresentar fácil execução e não promover alterações degradativas nos lipídios. Suas principais limitações são a baixa solubilidade de alguns lipídios em etanol (40 mM para fosfatidilcolina), e o volume de etanol a ser introduzido no meio, que deve ser tal que a suspensão final de lipossomas possua no

máximo 7,5% em volume deste solvente. Estes fatos limitam a quantidade de lipídio utilizada, originando em geral uma suspensão de lipossomas relativamente diluída (New, 1990).

Como desvantagem do método deve ser mencionado que a eficiência de encapsulamento é baixa para compostos hidrofílicos. Deve-se também considerar a dificuldade de remoção de etanol das bicamadas lipídicas, que se faz necessária em função da via de administração do composto obtido. Entretanto, uma vantagem deste método é a maior facilidade no escalonamento quando comparado à tecnologia de dispersão mecânica.

Kriftoner (1992) estudou o escalonamento do processo de produção de lipossomas para aplicação por via dérmica por este método encapsulando econazol (substância antimicótica com propriedade hidrofóbica). A droga e a lecitina foram solubilizadas em etanol e então injetadas na fase aquosa. A eficiência de encapsulamento da droga foi da ordem de 90% e o diâmetro das vesículas variou de 115 a 600 nm.

Método de Evaporação em Fase Reversa

Este método foi desenvolvido por Szoka e Papahadjopoulos (1978), utilizando uma emulsão de água em óleo, chamada de emulsão em fase reversa por ser o reverso de uma emulsão padrão, óleo em água. E ainda, o método tem este nome porque a etapa chave no seu desenvolvimento é a remoção do solvente da emulsão por evaporação.

Os fosfolipídios são primeiramente solubilizados em um solvente orgânico como o éter dietílico, isopropílico, ou mesmo uma mistura destes solventes com clorofórmio na razão 1:1 (v:v), caso o lipídio tenha solubilidade limitada em éter. A fase aquosa, contendo o material a ser encapsulado, é injetada na solução orgânica. Esta preparação é então levada a um banho ultrassônico para originar uma emulsão homogênea. O solvente orgânico é então removido em evaporador rotatório empregando-se baixo vácuo. Numa primeira etapa de evaporação, ocorre a formação de um gel, o qual deve ser submetido à agitação por vórtex para que sofra um colapso, levando à formação da suspensão de lipossomas. O esquema de preparação pode ser observado na Figura 2.9.

Uma característica relevante é a alta razão entre a fase aquosa disponível e a quantidade de lipídios destas vesículas, levando a altas eficiências de encapsulamento da fase aquosa. As vesículas obtidas por este método podem ser do tipo unilamelares grandes ou multilamelares, dependendo de alguns fatores, dentre eles, a quantidade de fosfolípido utilizada. Deve ser considerado que o emprego de grandes quantidades de lipídios leva à obtenção de vesículas multilamelares, pois ocorre a sobreposição de monocamadas lipídicas umas sobre as outras, enquanto que quantidades reduzidas originam vesículas unilamelares. A principal vantagem deste método é a obtenção de vesículas unilamelares grandes ou oligolamelares com grande espaço interno, e ainda a alta eficiência de encapsulamento da fase aquosa (20 a 68 %). Como principal desvantagem tem-se a exposição do material a ser encapsulado aos solventes orgânicos, o que pode levar à sua degradação. A distribuição de tamanhos obtida é bastante uniforme para a maioria das misturas de fosfolípidios, porém, preparações contendo colesterol podem apresentar distribuições de tamanhos relativamente heterogêneas (Szoka e Papahadjopoulos, 1980).

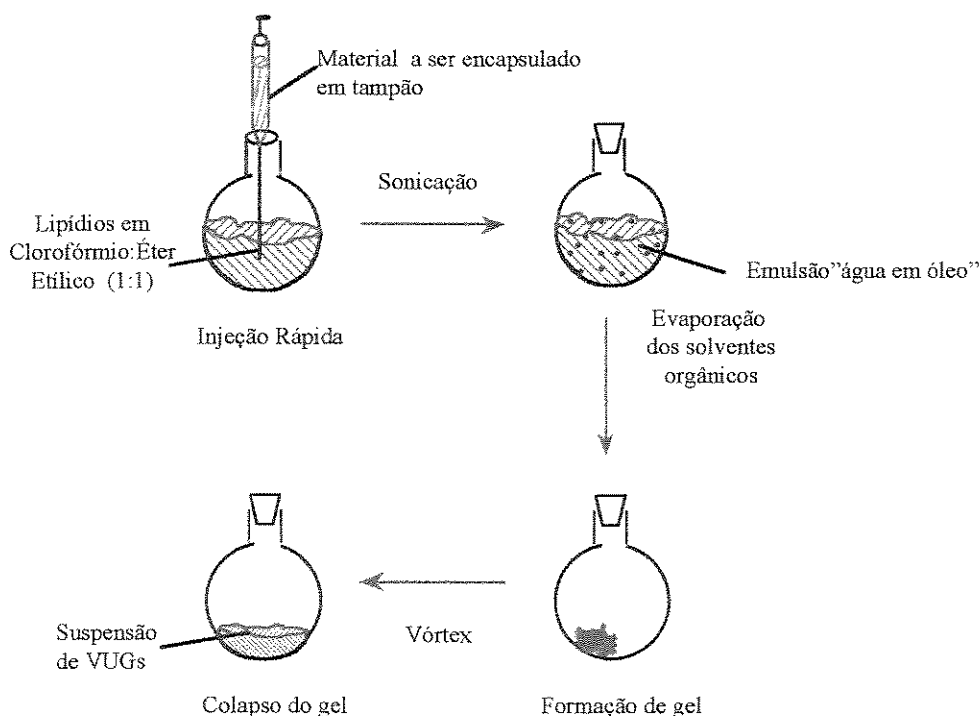


Figura 2.9- Etapas da preparação de lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa. (Figura adaptada de New, 1990).

2.1.5. Mecanismos de incorporação de compostos terapêuticos

A incorporação dos compostos terapêuticos em lipossomas pode ser feita por incorporação passiva ou ativa (Mayer et al., 1986). Na incorporação passiva, o encapsulamento do composto ocorre durante a formação das vesículas. Este tipo de encapsulamento, para compostos hidrofílicos, é realizado mediante a hidratação das bicamadas lipídicas com uma solução aquosa do composto em estudo. A eficiência de encapsulamento é determinada pela fração de composto terapêutico incorporado na vesícula, e depende do volume aquoso retido no cerne do lipossoma onde a droga está dissolvida, o qual, por sua vez depende do tamanho e do número de lamelas dos lipossomas (Moraes, 1996). Para compostos predominantemente hidrofóbicos, a incorporação passiva pode ser feita diretamente na bicamada lipídica, dissolvendo-se o composto e os lipídios simultaneamente no mesmo solvente orgânico. Neste caso, a quantidade de droga incorporada será limitada pela estabilidade da bicamada lipídica resultante, ou seja, a presença da droga não deve afetar seriamente o empacotamento dos lipídios.

Na incorporação ativa, o composto que se deseja encapsular é misturado a lipossomas previamente preparados encapsulando, por exemplo, ácido cítrico a pH 4,0 e cujo meio externo tenha sido substituído por uma solução a pH 7,4. Desta forma é estabelecido um gradiente de prótons entre as fases aquosas interna e externa das vesículas. O encapsulamento ativo baseia-se no fato de que apenas espécies não protonadas (neutras) podem atravessar a bicamada lipídica dos lipossomas, enquanto que as moléculas carregadas não apresentam esta capacidade. O composto a ser encapsulado não deve estar ionizado no pH externo dos lipossomas para atravessar a membrana lipídica. Uma vez encapsulado e havendo um excesso de prótons na fase aquosa interna das vesículas, o composto ionizando-se torna-se positivamente carregado, e não é capaz de permear a bicamada lipídica, permanecendo então, retido no interior dos lipossomas, como ilustrado na Figura 2.10.

O efeito do gradiente de prótons nas concentrações do composto terapêutico nos ambientes interno e externo das vesículas é descrito pela equação de Henderson-Hasselbach (2.1):

$$\frac{[HA^+]_{\text{interna}}}{[HA^+]_{\text{externa}}} = \frac{[H^+]_{\text{interna}}}{[H^+]_{\text{externa}}} \quad (2.1)$$

onde $[HA^+]$ é a concentração do composto terapêutico protonado e $[H^+]$ é a concentração de prótons.

Madden et al. (1990) avaliaram a incorporação de compostos terapêuticos em lipossomas em resposta a gradientes de pH, e demonstraram que esta técnica pode ser usada para uma ampla variedade de drogas, podendo alcançar eficiências de encapsulamento próximas a 100 %. Estes autores observaram que ocorre considerável variabilidade de respostas ao gradiente de pH entre os diferentes compostos em função das características do composto terapêutico, tais como o pK e a tendência de interagir com a bicamada, e das condições experimentais utilizadas.

O encapsulamento ativo de compostos em lipossomas apresenta algumas vantagens em relação ao encapsulamento passivo: pode-se obter elevadas eficiências de encapsulamento, não utiliza solventes orgânicos, detergentes ou condições onde seja envolvido cisalhamento intenso, e ainda, permite que o encapsulamento seja feito imediatamente antes do uso dos lipossomas, evitando a degradação de compostos e a desestabilização da vesícula com o tempo. Como desvantagem, o gradiente de pH pode ser dissipado com o decorrer do tempo, causando a liberação precoce da droga encapsulada.

2.1.6. Estabilidade

A estabilidade é um dos fatores principais das preparações com lipossomas, pois com o decorrer do tempo as vesículas podem sofrer várias alterações. Normalmente são estudadas numa preparação contendo lipossomas a estabilidade química, física e microbiológica.

A estabilidade química dos lipossomas pode ser afetada por reações de degradação como a hidrólise das ligações do tipo éster e a peroxidação de insaturações das cadeias de

hidrocarbonetos dos fosfolípidios (Crommelin e Schreier, 1994). Estas reações em geral levam a alterações na permeabilidade da bicamada lipídica.

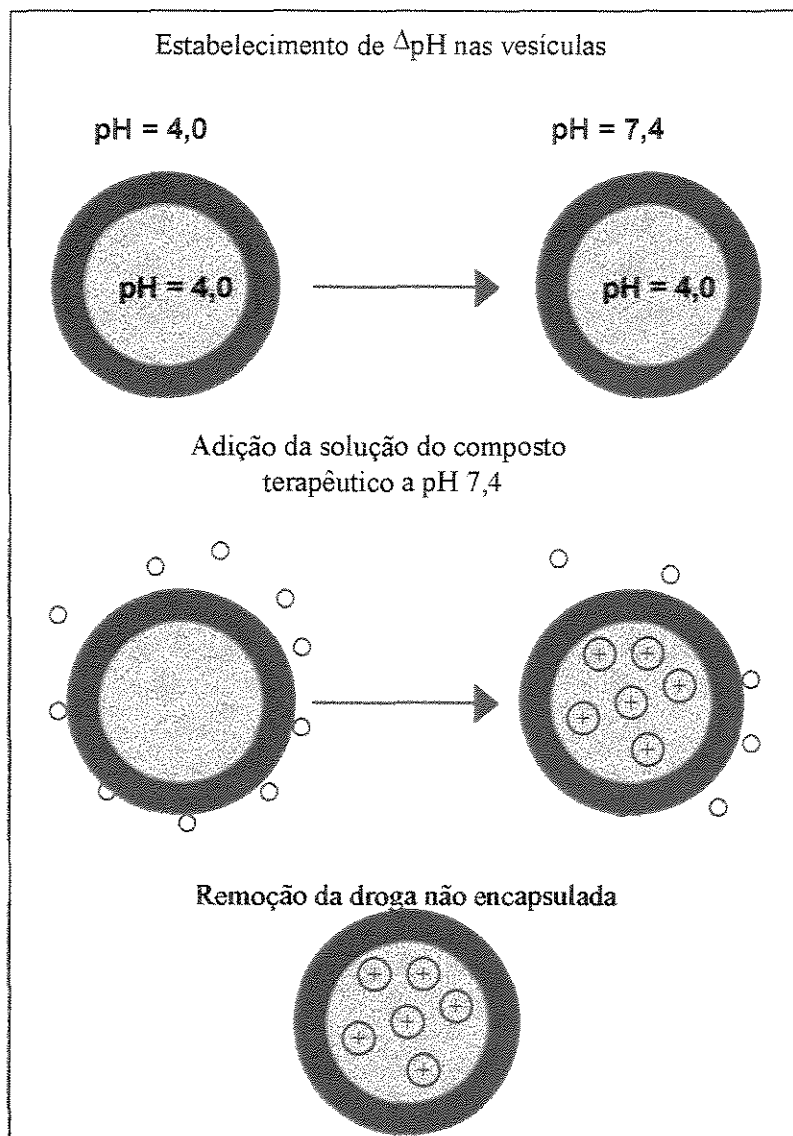


Figura 2.10- Representação esquemática do mecanismo de incorporação ativa de compostos terapêuticos em lipossomas. (Figura adaptada de Justo, 1999).

A instabilidade física leva a problemas tais como a liberação indesejável do composto terapêutico do interior da vesícula, e a alterações no tamanho e forma das vesículas

(Crommelin e Schreier, 1994) decorrentes de processos de agregação e fusão dos lipossomas. O processo de agregação consiste na formação de estruturas maiores compostas por lipossomas individuais, a princípio de caráter reversível. A fusão é resultante da formação de novas estruturas coloidais, sendo um processo irreversível.

Quando colocados em contato com moléculas anfifílicas, como por exemplo, as inúmeras substâncias presentes no fluido corpóreo, os lipossomas interagem com tais partículas, liberando o material encapsulado. O estudo do efeito de interação dos lipossomas com moléculas de tensoativos é uma ferramenta útil para a previsão do comportamento dos mesmos quando administrados *in vivo*.

A adição de tensoativo às bicamadas lipídicas leva à formação de micelas mistas. Esta transição ocorre em três etapas. No primeiro estágio, as moléculas de detergente estão em equilíbrio entre a fase aquosa e lipídica. No segundo estágio, as bicamadas com moléculas de detergente incorporadas coexistem com micelas mistas. Ocorre uma formação progressiva de micelas mistas em função do aumento da concentração de tensoativo até o desaparecimento das bicamadas, no terceiro estágio (Lasch, 1990). Este comportamento pode ser observado na Figura 2.11.

A ocorrência de tais fenômenos pode ser verificada através do perfil de turbidez da suspensão de lipossomas na presença de tensoativos. Inicialmente as vesículas não sofrem alteração de tamanho, observando-se pequena variação na turbidez. Com a incorporação de moléculas de tensoativos na bicamada observa-se a desestabilização das vesículas, levando ao aumento de tamanho e conseqüentemente da turbidez ou densidade óptica do meio. Este fato é observado até que se tenha a completa solubilização das vesículas e a formação de micelas mistas, promovendo então a diminuição da turbidez. Este comportamento está ilustrado na Figura 2.12.

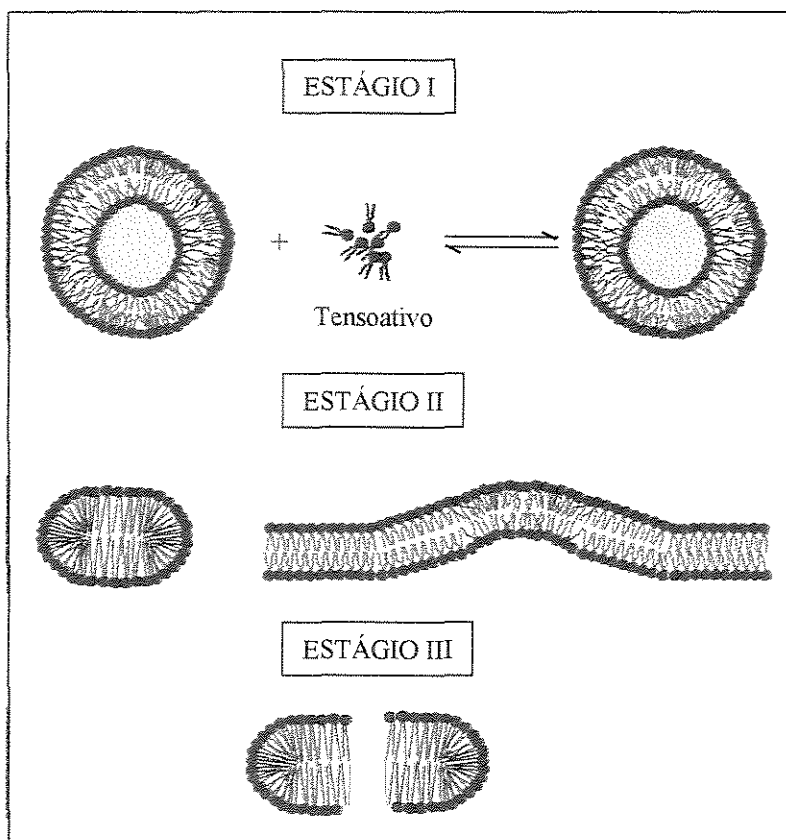


Figura 2.11- Representação do comportamento de lipossomas na presença de tensoativo. (Figura adaptada de Lasch, 1990).

Outro fator a ser considerado é a inclusão de moléculas de colesterol na bicamada lipídica. Thoma e Jocham (1992) estudaram o efeito da adição de colesterol na estabilidade de lipossomas empregados em preparações dermatológicas. Com a adição de 50 % de colesterol às vesículas, as preparações apresentaram-se mais estáveis, com menor taxa de aumento do tamanho das vesículas durante a estocagem.

Sob o ponto de vista microbiológico, os lipossomas constituem um meio bastante atrativo para o desenvolvimento de microrganismos. Dependendo da via de administração, a exigência sobre o controle microbiológico é de maior ou menor intensidade. No caso de produtos injetáveis, deve-se garantir sua esterilidade e apirogenicidade (ausência de toxinas), enquanto que para aplicações tópicas somente esterilidade. Outro fator a ser considerado é a

interação dos lipossomas com preservativos antimicrobianos, que pode levar tanto à desestabilização física quanto à química.

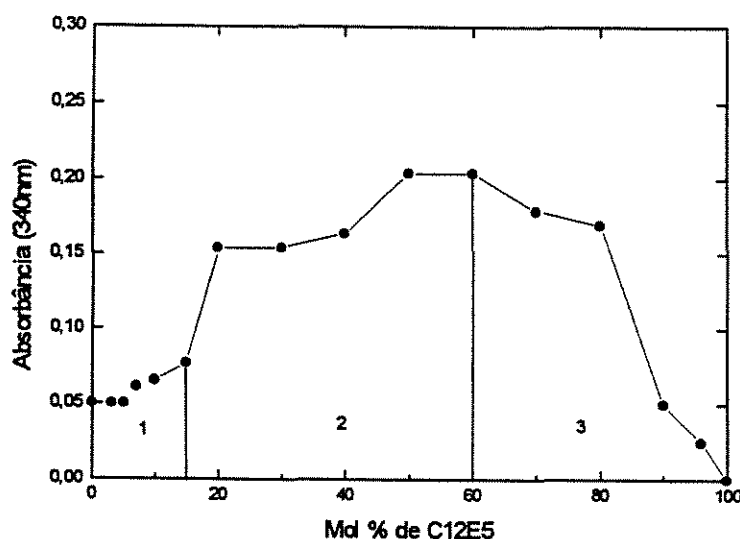


Figura 2.12- Perfil de estabilidade de lipossomas sonificados na presença de tensoativo. Região 1- as moléculas de detergente estão em equilíbrio entre a fase aquosa e lipídica; Região 2- as moléculas de detergente são incorporadas na bicamada lipídica e presença de micelas mistas; e na Região 3- existência apenas de micelas mistas. (Figura adaptada de Ribas, 1997).

2.1.7. Aplicações Biológicas dos Lipossomas

A grande versatilidade dos tipos de lipossomas, suas composições e ainda o fato de suas propriedades serem determinadas por variáveis controláveis tornam os lipossomas muito atrativos para aplicações na área médica, cosmética e outras. As formulações de lipossomas são compostas de substâncias anfífilas como os lipídios, ingredientes ativos (drogas ou moléculas bioativas), e em alguns casos preservativos como, por exemplo, antioxidantes e agentes microbicidas, que protegem a formulação.

As formulações contendo lipossomas podem ser administradas através de diversas vias, tais como intravenosa, intradérmica, pulmonar, ocular, nasal e tópica. E ainda, os lipossomas podem ter sua superfície modificada de modo a conferir-lhes uma maior especificidade, possibilitando sua aplicação na área de imunologia, por exemplo.

A indústria cosmética é aquela que apresenta maior desenvolvimento em relação aos lipossomas, porém aplicações dérmicas de fármacos estão sendo estudadas e apresentam grande tendência de desenvolvimento. A Tabela 2.3 sumariza parte da literatura localizada em relação à pesquisa envolvendo lipossomas para aplicação dérmica, abordando os aspectos de composição lipídica, método de preparação, tamanho das vesículas resultantes, tipo de composto encapsulado e de veículo empregado para a suspensão das vesículas.

Pode-se verificar que existe uma grande variedade de lipídios empregados em formulações de lipossomas para aplicação dérmica. Dentre eles destacam-se a fosfatidilcolina, o fosfatidilinositol, a fosfatidilserina, as ceramidas, a lecitina de soja ou ovo e o colesterol. A presença do antioxidante α -tocoferol ou vitamina E pode ser observada em várias preparações. Entre os métodos de preparação, o mais utilizado é o de hidratação do filme, seguido pelas técnicas de remoção de detergente, sonicação e injeção de etanol.

Quanto ao tamanho das vesículas, existe uma grande variedade, havendo vesículas com diâmetros de 50 a 500 nm e ainda dos tipos uni e multilamelares. Os tipos de agentes ativos encapsulados também são diversificados, incluindo anti-micóticos, hormônios, vitaminas, anti-inflamatórios e outros. Através destes trabalhos, nota-se que não são adotadas metodologias universais aplicáveis a todas as preparações.

Cada preparação é formulada de maneira a atender requisitos específicos e, assim, envolve metodologias e materiais distintos.

Já existem disponíveis comercialmente alguns produtos constituídos por lipossomas encapsulando compostos ativos para fins terapêuticos e cosméticos. A Tabela 2.4 apresenta alguns destes produtos da área farmacêutica.

Tabela 2.3– Lipossomas em aplicações dérmicas.

Composição em lipídios	Método de preparação	Diâmetro médio (nm)	Agente ativo encapsulado	Veículo	Referência
Lecitina	Injeção de etanol	Unilamelares 100 a 500 nm	Econazol	Não mencionado	Kriftner, 1992
PC:CH:PS CM:Col:PA:CS 1% tocoferol	Hidratação do filme pH 7,4	VML tamanho não mencionado	Ciclosporina e inulina	Não mencionado	Egbaria e Weiner, 1992
PC	Hidratação do filme pH 6,5	250 nm	Lipossomas livres	Não se aplica	Röding e Artman, 1992
Lecitina de soja	Diálise de detergente	159 ± 50 nm	Lipossomas livres	Não se aplica	Schmid, 1992
PC:Col:PS 1: 0,5: 0,1	Hidratação do filme pH 7,4	Não mencionado	Carboxifluoresceína	Não mencionado	Lieb et al., 1992
65% lecitina de ovo 3,5%HC 4,4%Vitamina E 27,5% Colesterol	Hidratação do filme ou sonicação	Não mencionado	Hidro-cortisona	Não mencionado	Wohlrab, et al., 1992
Lecitina de soja	Sonicação	100 a 200 nm	Vitamina A	Gel de carbopol 1,25%	Meybeck, 1992
3 composições EL:Col:PS (2:1:0,33) DMPC:Col:PS (2:1:0,33) CM:Col:PA:CHS (4:2,5:2,5:1)	Hidratação do filme pH 7,0 e desidratação/reidratação	V ML 100 nm	Interferon	Não mencionado	Weiner et al., 1992
Lecitina de ovo	Diálise de detergente	Unilamelares 50 nm	Propionato de Betametasona	Gel de poliacrilato	Korting, 1992
65% Lecitina de ovo 4,4%Tocoferol 27,5%Colesterol 3,5% Hidrocortisona	Sonicação	Não mencionado	Hidro-cortisona	Não mencionado	Wohlrab e Lasch, 1987
DL - α -DPPC Colesterol	Hidratação do filme	Não mencionado	Triancinolone	Não mencionado	Mezei et al., 1980

CHS, colesteril sulfato; PA, ácido palmítico; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; CM, ceramidas; Col, colesterol.

Tabela 2.4- Produtos compostos por lipossomas disponíveis comercialmente (tabela adaptada de Lasic, 1998).

Produto	Princípio ativo	Fabricante
Doxil	Doxorubicina	Sequus, Menlo Park, EUA
Ambisome	Anfotericina B	NeXtar, Boulter, CO, EUA
Crema anti-câncer	Não mencionado	Asta Medica, Frankfurt, Alemanha
Epaxal	Antígeno contra hepatite A	Swiss Serum Institute, Bern, Suíça
ELA-Max	Lidocaína	Biozone Labs, Pittisburgh, EUA

Entre os produtos apresentados na Tabela 2.4, o Ambisome, que se trata de formulação de lipossomas unilamelares encapsulando anfotericina B, utilizado na terapia de infecções causadas por fungos está disponível comercialmente desde 1990 no mercado europeu e desde 1997 no mercado americano. A Doxil é uma suspensão líquida de doxorubicina em lipossomas estabilizados estericamente e encontra-se disponível no mercado americano desde 1995. Para ambas as formulações verificou-se uma redução considerável nos severos efeitos colaterais resultantes da administração das drogas livres.

A mesma empresa fabricante da vacina contra a hepatite A vem desenvolvendo novas vacinas para hepatite B, gripe, difteria e tétano. O interesse nesta área baseia-se no fato dos lipossomas potencializarem a resposta imune ao antígeno.

A partir de informações a respeito de formulações envolvendo lipossomas, espera-se o desenvolvimento de preparações de lipossomas na área médica encapsulando agentes anticâncer, citocinas, antifúngicos, antibióticos em lipossomas convencionais ou de longa circulação (Lasic, 1998).

Um crescimento explosivo do uso de lipossomas foi observado no ramo de cosméticos, tendo iniciado em 1987 com o produto Capture da Christian Dior e produto anti-envelhecimento da L'Oreal.

2.2. A pele como alvo e local de aplicação de agentes terapêuticos

A pele é a região mais externa do corpo, sendo, portanto, de acesso relativamente mais fácil em comparação aos demais órgãos. A aplicação de drogas livres, em conjunto com substâncias promotoras de sua penetração na pele, aumenta a concentração de droga no interior da pele através da redução do coeficiente de permeabilidade da epiderme, porém promove também um aumento dos níveis da droga no plasma, o que pode levar à manifestação de efeitos colaterais (Martin e Lloyd, 1992).

Os lipossomas constituem uma alternativa bastante promissora para o tratamento de doenças de pele, pois aumentam a concentração de droga no local de ação desejado, minimizando a absorção sistêmica da droga e conseqüentemente seus possíveis efeitos colaterais.

A região mais externa da pele, ou epiderme, em seres humanos possui normalmente 0,04 mm de espessura, e em alguns casos isolados pode ter até 0,2 mm (Cevc, 1992). Esta camada mais externa, o estrato córneo, consiste de cerca de 20 camadas de células queratinizadas e de grande quantidade de células mortas. Os pequenos interstícios entre as células de corneócitos são preenchidos com estruturas *quasi*-lamelares consistindo de 80% de lipídios saturados. O interior dos corneócitos é preenchido com filamentos de queratina. O estrato córneo, conseqüentemente, é mecanicamente muito rígido e resistente a ácidos, sendo pouco permeável à água e atuando como uma barreira eficiente para a entrada de substâncias lipofílicas. O estrato córneo previne a perda de fluidos corpóreos, lipídios e macromoléculas da pele, assim como faz o contra-transporte dos agentes aplicados na superfície. Diretamente abaixo do estrato córneo está a epiderme viável, composta de três camadas: o estrato granuloso, espinoso e basal. A epiderme viável contém queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans (importantes para a resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial).

A região abaixo da epiderme é denominada derme e tem espessura de 10 a 20 vezes maior que a epiderme. Na derme encontram-se vasos capilares, glândulas, células imunologicamente ativas, terminações nervosas, etc. Para se ter uma idéia a respeito da complexidade da pele, estima-se que em média um centímetro quadrado de pele contém 10

foliculos, 15 glândulas sebáceas, 12 nervos, 100 glândulas sudoríparas, 360 cm de nervos e três vasos sanguíneos (Asbill e Michniak, 2000).

O estrato córneo raramente é o alvo para a administração de agentes ativos, com exceção dos casos de tratamento de algumas infecções bacterianas ou por fungos. A derme é a região preferida como alvo da liberação controlada de drogas para tratamento de doenças da pele. Algumas drogas são absorvidas pela pele em maior extensão em regiões com foliculos capilares, e em menor extensão ocorre a absorção através de glândulas sudoríparas. A rota transdérmica é a que apresenta maior resistência à penetração de agentes ativos. Estas rotas de penetração de substâncias na pele estão representados na Figura 2.13.

Os lipídios, que são capazes de se estruturar na forma de bicamadas não têm sua penetração aumentada quando administrados na forma de emulsão, mas somente quando encontram-se em estruturas lamelares. Lipossomas multilamelares possuem maior habilidade em permear a pele através de orifícios de foliculos. Preparações à base de lipossomas são capazes de aumentar de cinco a oito vezes a liberação de drogas nos foliculos em comparação à capacidade de penetração de preparações aquosas. A composição lipídica e o tamanho dos lipossomas determinam a capacidade destas vesículas em atingir determinada camada da pele. Lipossomas compostos de fosfatidilcolina encapsulando melanina, por exemplo, são capazes de depositar a substância em regiões periféricas dos foliculos e no interior de suas células (Sharata e Katz, 1996).

Assim, as razões da baixa permeabilidade da epiderme devem ser entendidas antes da formulação de substâncias terapêuticas, para que se tenham aumentadas as probabilidades de sucesso decorrente de sua aplicação.

2.2.1. Mecanismos de penetração de agentes ativos na pele

A superfície da pele é uma barreira eficiente para a penetração de compostos com peso molecular acima de algumas centenas de Dáltons. A dificuldade de penetração de substâncias na pele é aumentada de acordo com o peso molecular do composto. Considere-se, por exemplo, uma molécula pequena, como a de 5-fluorouracil, droga comumente

empregada na terapia de melanomas. A quantidade de droga que penetra na pele não excede uma fração de $1\%/h.cm^2$ da dose aplicada (Cevc e Blume, 1992), ou seja, a capacidade de penetração é muito pequena.

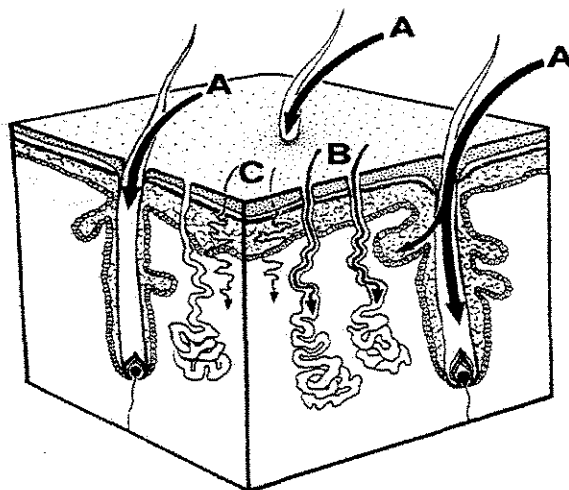


Figura 2.13 – Representação das vias de penetração de substâncias ativas através da pele. Rota A- penetração através dos folículos; B- penetração através de glândulas sudoríparas e C- penetração por via transdérmica.(Figura adaptada de Sharata e Katz, 1996).

A maior barreira à penetração de substâncias na pele é o estrato córneo, que é composto de corneócitos imersos em uma matriz lipídica. Conforme mencionado anteriormente, esta matriz lipídica é formada de camadas duplas de membranas lipídicas compostas de colesterol, ácidos graxos e ceramidas. Então, existe a hipótese de que substâncias que fluidifiquem esta matriz lipídica possam promover um aumento da penetração de drogas através da pele. Entretanto, o uso de substâncias que aumentem a penetração de agentes ativos na pele pode ser limitado pela toxicidade destas substâncias (Kirjavainen et al., 1996).

O uso de lipossomas minimizaria este problema, e apesar de sua aplicação na liberação transdérmica de drogas estar sendo intensamente avaliada, existem poucos estudos a respeito da interação entre estas vesículas lipídicas e a pele humana.

O mecanismo de penetração de preparações contendo lipossomas na pele ainda não está bem definido, porém algumas hipóteses foram propostas por Kirjavainen et al. (1996) e Cevc e Blume (1992).

Segundo Kirjavainen et al. (1996), a interação entre as vesículas lipídicas e a pele depende da composição destas vesículas. Segundo estes autores, a presença de cargas na superfície das vesículas ou de colesterol não influencia o processo de penetração de lipossomas na pele. E ainda, segundo este trabalho, os lipossomas penetram no estrato córneo aderindo na superfície da pele, desestabilizando-se, fundindo-se ou misturando-se aos lipídios da pele. Com isso, os lipossomas poderiam atuar como substâncias promotoras de penetração de agentes ativos na pele.

Outra hipótese a respeito do mecanismo de penetração de agentes ativos na epiderme baseia-se na existência de um gradiente de concentração de água. A superfície da epiderme é considerada seca, normalmente contém menos de 15% de água, o que representa um fator cinco vezes menor do que nas camadas inferiores. Embora, o gradiente de concentração de água transdérmico possa ser considerado como pequeno, e a permeabilidade da pele seja também limitada, este gradiente de umidade e a força osmótica, gerada pelo gradiente de pressão entre a superfície e camadas internas da pele, promovem uma força motriz suficiente para permitir a penetração de vesículas lipídicas através do estrato córneo (Cevc e Blume, 1992).

As formulações convencionais, como soluções, cremes e ungüentos liberam as drogas através das células mortas do estrato córneo por um mecanismo de difusão passivo, seguindo a lei de Fick. Lipossomas podem liberar drogas para o estrato córneo e a epiderme dentro de um período de 30 minutos, em concentrações significativamente superiores às preparações convencionais com drogas livres (Wohlrab e Lasch, 1987).

Propriedades físicas dos lipídios que constituem os lipossomas, como por exemplo a temperatura de transição de fases, também influenciam a penetração dos mesmos na pele. Formulações de lipossomas contendo gliceril dilaurato na bicamada são capazes de levar dez vezes mais droga a camadas mais profundas da epiderme que preparações convencionais. O gliceril laurato tem temperatura de fusão igual a 30°C, que é um valor pouco abaixo da temperatura normal da pele. O aumento na penetração pode ser devido à transição de fases

da bicamada lipídica, na qual ocorre um rompimento parcial da vesícula, o que colocaria a droga em contato direto com estrato córneo, promovendo então a penetração da mesma através da epiderme (Sharata e Katz, 1996).

2.3. Quimioterapia de Melanomas Cutâneos

As formas de tratamento de melanoma cutâneo correntemente utilizadas são a cirurgia, a radioterapia, a imunoterapia, a quimioterapia e a combinação de duas ou mais destas técnicas. A quimioterapia ou emprego de agentes químicos é uma das formas mais utilizadas no tratamento de melanomas porque atua de maneira generalizada, possibilitando o tratamento da doença quando já exista a presença de metástases, enquanto que a cirurgia e a radiação são limitadas a áreas específicas. Contudo, a quimioterapia não se mostra muito efetiva, sendo que o agente de maior efeito no melanoma tem sido a dacarbazina e a quimioterapia combinada permanecem sendo empregados (Harry et al., 1994).

A dacarbazina induz melhora nos pacientes em 15 a 25% dos casos, embora por um curto período de tempo. Agentes alquilantes citotóxicos como o melfalano, a lomustina, a fotemustina e outros têm sido empregados na terapia do melanoma. Contudo, a ação destes agentes deve ser reforçada a fim de diminuir a resistência dos tumores, especialmente no caso de melanomas, que apresentam uma das piores taxas de respostas à quimioterapia em relação às demais neoplasias.

Vicente et al. (1998) estudaram o efeito de algumas drogas em células de melanoma de humanos e ratos, entre elas o melfalano, a lomustina, a fotemustina, e o 4-hidroxianisol (4-HA) isolados, combinados e após pré-tratamento com butionina sulfoximina (BSO), ácido etacrínico (EA), e ácido azelaico (AA). A droga que apresentou melhor resultado no seu uso isolado foi o melfalano, seguida de lomustina, fotemustina e 4-HA. O uso destes agentes de forma combinada não apresentou resultados promissores. O BSO aumentou a citotoxicidade do melfalano e da lomustina, enquanto que aumentou a toxicidade da fotemustina. O EA aumentou a potencialidade do melfalano, da lomustina e da fotemustina. O AA aumentou a efetividade da lomustina e da fotemustina nas células de ratos e na de humanos. O 4-HA não apresentou aumento na efetividade de nenhuma das drogas testadas.

De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que o pré-tratamento é uma opção que deve ser considerada para melhorar o efeito de drogas utilizadas no tratamento principal.

Outros autores consideram o uso isolado de ácido azelaico na terapia de melanoma. Nazzaro-Porro et al. (1980) estudaram o efeito da administração de ácido azelaico em 23 pacientes com melanoma cutâneo. Neste tratamento foram combinadas as administrações por via oral (10 a 15 gramas por dia) e tópica (creme contendo 15% de AA aplicado duas vezes ao dia) por um período de duas a doze semanas antes de intervenção cirúrgica e foi observado efeito benéfico nas lesões de melanoma. Este resultado indicou que o ácido azelaico apresenta efeito citotóxico em melanomas humanos.

O AA, quando administrado por via oral, não apresentou toxicidade ou efeitos mutagênicos agudos de acordo com estudos realizados em animais. A administração tópica de cremes contendo de 15 a 20% de ácido azelaico é bem tolerada por humanos, não levando a reações alérgicas na pele, porém com seu uso mais frequente observa-se a formação de eritemas e irritações cutâneas caracterizadas por escamação, prurido e sensação de queimadura (Fitton e Goa, 1991).

De acordo com Fitton e Goa (1991), o AA pode ser empregado no tratamento de casos de melanoma em que o local ou extensão da lesão tornem a cirurgia impraticável.

Outra droga que deve ser considerada na terapia tópica de melanomas é o 5-fluorouracil (5-FU), agente anti-câncer. Aplicações tópicas de 5-fluorouracil foram utilizadas com sucesso em três pacientes com lesões de melanoma, porém ainda em caráter experimental, Harry et al. (1994).

Ryan et al., 1988, estudaram o efeito de 5-FU em pacientes apresentando melanoma cutâneo. Especialmente para casos de pacientes com lesões na face, estes autores consideram que o emprego desta droga é uma alternativa relevante, pois apresenta bons resultados sob o ponto de vista estético, e ainda, este tratamento tem custo mais baixo do que se fosse feita uma reconstituição da pele, por exemplo. No caso de pacientes que não possam ser submetidos a cirurgias, por razões de saúde, estes pesquisadores também consideram a administração de 5-FU uma boa alternativa. Contudo, o emprego de 5-FU em casos de melanoma apresenta algumas dificuldades. O tratamento é longo e muitas vezes

doloroso, o que leva muitos pacientes a interromperem a aplicação da droga antes da obtenção de resultados significativos.

Uma terceira droga a ser considerada na terapia de melanomas é a bleomicina. Esta droga, descoberta por Umezawa em 1970, apresenta atividade contra uma variedade de tumores sólidos e linfomas. São diversas as vias de administração empregadas para esta droga: via intravenosa, intramuscular, intradérmica e tópica. A aplicação tópica da bleomicina foi empregada para o tratamento de uma variedade de doenças dermatológicas e ainda pode ser indicada no tratamento local de câncer de pele e psoríase (Carter e Crooke, 1978).

Como os demais agentes quimioterápicos mencionados, a bleomicina administrada na sua forma livre leva a uma série de efeitos colaterais. Outro ponto crítico é o pouco tempo que se mantém na corrente sanguínea após sua administração, o que leva à diminuição de sua eficácia.

Diante desta revisão da literatura a respeito de terapia de melanomas, foram selecionadas, neste trabalho, as drogas 5-fluorouracil, ácido azelaico e bleomicina para o encapsulamento em lipossomas para aplicação por via tópica. Os três compostos mencionados mostram-se promissores no tratamento de melanoma. Com o ácido azelaico não foram localizados trabalhos envolvendo seu encapsulamento em lipossomas. Porém, considerou-se importante sua veiculação em lipossomas não apenas para o tratamento de lesões de melanoma, como também para a terapia de manchas de pele e acne, reduzindo seus efeitos colaterais e ainda promovendo o aumento de sua absorção através da pele.

Para o 5-fluorouracil e bleomicina foram localizadas algumas investigações (citadas no decorrer deste trabalho) que mostraram resultados promissores com o encapsulamento destes fármacos em lipossomas. Contudo, ainda não foram desenvolvidos sistemas de lipossomas encapsulando tais drogas para administração por via tópica.

Desta forma poder-se-ia aumentar a penetração destes agentes, AA, BLE e 5-FU, na pele e reduzir efeitos colaterais provocados pela aplicação dos compostos em sua forma livre. A seguir, estas drogas serão mais detalhadamente abordadas.

2.3.1. Ácido azelaico

O ácido azelaico é um ácido dicarboxílico saturado constituído de 9 carbonos, obtido através da oxidação do ácido oléico pelo ácido nítrico (Nazzaro-Porro, 1987). Sua fórmula química estrutural pode ser observada na Figura 2.14.



Figura 2.14- Fórmula química estrutural do ácido azelaico.

Dentre algumas de suas propriedades físicas e químicas de relevância para este trabalho, deve-se destacar que este composto não apresenta absorção de luz apreciável no espectro visível, sendo apenas limitadamente solúvel em água, enquanto que no solvente orgânico etanol sua solubilidade é aumentada.

De acordo com Prieto e Lopez (1993), o ácido azelaico é um composto terapêutico interessante para o tratamento de lentigo maligno, especialmente em casos de pacientes que, por algum motivo, não possam ser submetidos a cirurgia.

Ácidos dicarboxílicos de 8 a 12 carbonos são inibidores competitivos de tirosinase *in vitro*, enzima ligada à síntese de melanina. O ácido azelaico apresenta menor custo, além de ser mais solúvel em relação a outros ácidos dicarboxílicos quando incorporado em bases de cremes (Nguyen et al., 1993).

A pesquisa a respeito do AA no tratamento de melanoma é justificada pelo fato deste composto apresentar efeito citotóxico sobre células anormais de melanócitos enquanto que em células sadias o seu efeito é praticamente inexistente (Nazzaro-Porro et al., 1980). O mecanismo de ação deste composto ainda necessita de investigação, porém é sugerido que a ação seletiva do ácido azelaico está relacionada ao fato deste composto ser capaz de

penetrar mais em células anormais em comparação a células normais (Nazzarro-Porro, 1987).

Quando aplicado em concentrações de 10 a 100 mM, o ácido azelaico demonstrou efeito anti-proliferativo *in vitro* em células de melanoma humano. Este efeito é observado principalmente pela inibição na síntese de DNA. Citotoxicidade foi observada em concentrações superiores a 40 mM, devendo-se ressaltar que o AA não é ativo contra estas células em concentrações inferiores a 10 mM (Nguyen et al., 1993).

A administração do ácido azelaico tem sido empregada por diversas vias tais como: oral, intravenosa, intra-arterial, intra-linfática (15% em solução de sal de sódio) e tópica (em geral, creme com concentração de 20% em AA), de acordo com Fitton e Goa (1991).

Um dos fatores mais importantes no estudo de uma droga de ação dermatológica é a capacidade, assim como o mecanismo, de absorção percutânea da mesma. Na aplicação tópica de um grama de creme contendo 20% de ácido azelaico, Nguyen et al. (1993) verificaram uma absorção percutânea de aproximadamente 3% e, no plasma, foi quantificado 0,038 µg/mL ($2,1 \times 10^{-7}$ M). A absorção percutânea do ácido azelaico é determinada pelo veículo no qual este está suspenso, por exemplo, o uso de um gel contendo 15% de ácido azelaico conduz a 8% de absorção, enquanto que num ungüento de polietilenoglicol solúvel em água, a absorção é de apenas 3%.

Diante destes fatos, verifica-se que este composto poderia ter sua absorção cutânea substancialmente aumentada se encapsulado em lipossomas, aumentando-se a penetração do agente ativo na pele.

2.3.2. 5-Fluorouracil

As pirimidinas fluoradas e seus nucleosídeos possuem atividade anti-câncer. Dentre estes compostos, destaca-se o 5-fluorouracil, que é uma das drogas anti-câncer mais ativas. Este composto terapêutico é utilizado clinicamente em casos de câncer do trato gastrointestinal, pulmão, do aparelho genital feminino e em terapia de melanomas como um complemento terapêutico ou como tratamento primário (Zambonin et al., 1996; Ryan et al., 1988).

A fórmula química estrutural deste composto está apresentada na Figura 2.15.

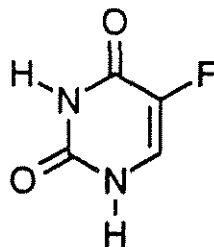


Figura 2.15- Fórmula química estrutural do 5-fluorouracil.

Comercialmente existe disponível o 5-FU em creme Lima (1993), constituído de 5 % da droga suspensa numa base emulsionada água-óleo, para administração tópica (Efurix ®, Hoffman-La Roche). A administração desta droga por via tópica apresentou resultados satisfatórios em pacientes com melanoma. Esta droga é usada como alternativa em casos de pacientes que por razões de saúde, como por exemplo, problemas cardíacos, não possam ser submetidos à cirurgia (Ryan et al., 1988).

Um fator limitante na terapia desta doença com 5-FU livre consiste nos efeitos colaterais indesejados causados por sua administração (Zambonin et al., 1996). Isto se deve ao fato de que quando administrado na sua forma livre, proporciona picos de concentração, fato este que vem a agravar seus efeitos colaterais, como danos ao epitélio gastrointestinal quando administrado na forma oral ou endovenosa, mielotoxicidade e a possível ocorrência de distúrbios cerebelares. Além disso, a droga apresenta pouco tempo de ação *in vivo* (Simmons et al., 1988).

Diante deste fato, este último grupo de pesquisadores estudou o encapsulamento de 5-FU em lipossomas com o objetivo de prolongar o efeito ativo e reduzir a toxicidade da droga em pessoas que sofrem de glaucoma. Com este sistema, os picos indesejáveis de concentração da droga foram significativamente reduzidos. Estudos suplementares são

necessários a fim de se estabelecer a efetividade do composto encapsulado em lipossomas em relação à sua administração na sua forma livre.

Elorza et al. (1993) também estudaram lipossomas encapsulando 5-FU a fim de verificar a liberação deste composto através da bicamada lipídica. Foram preparados lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa, obtendo-se uma eficiência de incorporação da droga em torno de 60%. Neste trabalho também foi estudado o efeito do lipídio empregado na capacidade destes lipossomas em reter a droga no seu interior. Foi observado que a liberação deste composto das vesículas está relacionada à sua atividade superficial, e que lipossomas compostos por DSPC são capazes de manter o 5-FU encapsulado por mais tempo que lipossomas compostos por esfingomieline bovina.

Dentre as propriedades físicas e químicas da droga importantes no desenvolvimento de formulações de 5-FU encapsulado em lipossomas devem-se destacar: sua solubilidade em água é de 0,1 g/100 mL, apresenta absorção de luz na região do ultra violeta a 254 nm, pKa igual a 8,04 e ainda, é uma droga fotossensível (Merck Index, 1996; Jarugula et al., 1996 e Krogsgaard et al., 1996).

Outros aspectos relevantes são referentes à estabilidade desta droga. Segundo Amer et al. (1998), o 5-FU apresenta três produtos de degradação conhecidos, fluoroacetato de sódio, uréia e formaldeído. Alguns fatores que levam a tal degradação são condições alcalinas (pH>9) e temperaturas elevadas. Tais produtos de degradação do 5-FU absorvem espectrofotometricamente na mesma região da droga não afetada, com isso, sua determinação colorimétrica direta ficaria comprometida.

Outro fator importante relaciona-se à estocagem do composto terapêutico. (Martindale, 1993) relata que a droga deve ser estocada em frascos de PVC, pois, quando em solução, é capaz de interagir com o vidro.

2.3.3. Bleomicina

Bleomicinas fazem parte de um importante grupo de agentes tumoricidas obtidos como produtos de fermentação do *Streptomyces verticillus*. Esta droga é empregada clinicamente como uma mistura de dois peptídeos quelantes de cobre, bleomicinas A₂ e B₂.

Como pode ser observado na Figura 2.16, estas bleomicinas diferem apenas no seu grupo amino-terminal, que podem ser alterados em função de grupos amina adicionados ao meio de fermentação (Goodman, 1996).

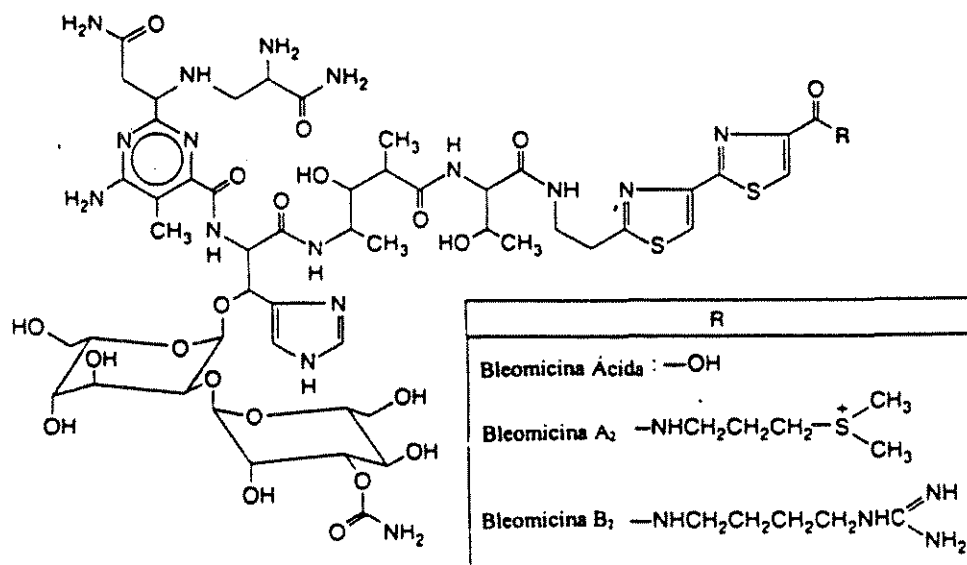


Figura 2.16- Fórmula química estrutural da Bleomicina A₂ e B₂.

Esta droga é comumente comercializada na forma de sulfato de bleomicina (Blenoxane®, Bristol-Myers Squibb), apresentada em frasco-ampola contendo 15 unidades da droga.

A aplicação da bleomicina (BLE), como agente isolado ou em associação a outros agentes quimioterápicos, é indicada em diversos casos de neoplasias como carcinoma espinocelular, de cabeça e pescoço, incluindo boca, língua, amígdalas, nasofaringe, orofaringe, mama, palato, lábios, mucosa bucal, gengiva, epiglote, laringe, pele, pênis, colo uterino e vulva. Esta droga pode ser administrada por via intramuscular, intravenosa ou subcutânea (Lima, 1993). A bleomicina pode ser empregada na terapia de uma variedade de doenças de pele. Injetada intradermicamente, apresentou atividade contra diversos tipos de verrugas. Sua aplicação tópica pode ser empregada no tratamento local de vários tipos de câncer de pele (Carter e Crooke, 1978).

De acordo com Roy e Kim (1991), no tratamento de neoplasias a dose terapêutica requerida deve ser administrada por um período prolongado, visto que existe a comprovação de que sua administração nesta forma é menos tóxica do que no caso de

injeções de altas doses intermitentes. A administração contínua da droga torna o tratamento inconveniente, doloroso e de alto custo para o paciente. Com isso, o encapsulamento de bleomicina em lipossomas seria indicado.

Dentre as propriedades físicas importantes no desenvolvimento de formulações de bleomicina encapsulada em lipossomas, deve-se destacar que a droga é bastante solúvel em água, e pouco solúvel em álcool (AHFS, 1992), apresentando massa molecular média igual a 1400 Da.

Dentre os trabalhos envolvendo encapsulamento de bleomicina em lipossomas, destaca-se o de Roy e Kim (1991), que descrevem a preparação de lipossomas multivesiculares por um método consistindo numa modificação do método de evaporação em fase reversa descrito por Szoka e Papahadjopoulos (1978). Estes lipossomas multivesiculares, apresentando diâmetros médios de 19,1 μm e eficiência de encapsulamento de 73 %, foram desenvolvidos para administração por via subcutânea e os autores mostraram que o emprego destes lipossomas aumentou o índice terapêutico da droga.

Com base na revisão da literatura apresentada, foram preparados lipossomas encapsulando AA, 5-FU e BLE empregando os métodos de hidratação do filme com incorporação ativa e passiva, de injeção de etanol e de evaporação em fase reversa, conforme descrito na próxima seção.

III- Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de lipossomas encapsulando eficiente e estavelmente os compostos utilizados na terapia de melanomas, ácido azelaico, 5-fluorouracil e bleomicina. A influência do método de encapsulamento, da razão molar inicial agente terapêutico/lípido e da temperatura, dentre outros fatores, na eficiência de incorporação das drogas em lipossomas foi abordada. O comportamento das amostras quanto à estabilidade de estocagem e à presença de um composto capaz de desestabilizar a bicamada lipídica, o tensoativo $C_{12}E_5$, a fim de inferir sobre o comportamento de tais vesículas quando em presença de fluidos biológicos também foi parâmetro avaliado.

IV- Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Fármacos: Ácido azelaico e 5-fluorouracil obtidos da Sigma Chemical Company, e Bleomicina, na forma de Sulfato de Bleomicina (Blenoxane), adquirido da Bristol-Myers Squibb.

Lípidios: Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e Colesterol (Col) obtidos da Sigma Chemical Company.

Outros materiais: Reagente tamponante N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico] (hepes), cloreto de sódio, 1-octanol, gel Sephadex G-50, carbonato de sódio e polioxietileno 5-lauril éter (C₁₂E₅) foram obtidos da Sigma, Chemical Company. Hidróxido de sódio e ácido cítrico foram obtidos da Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Etanol, metanol, clorofórmio, iso-octano, peróxido de hidrogênio (30 %), ácido bórico, ácido ascórbico, 1-butanol, dodecilssulfato de sódio (SDS), éter dietílico e Tris-HCl foram adquiridos da Merck. Ácido sulfúrico 10 N foi obtido da Química Especializada Erich Ltda. Molibdato de amônio foi obtido da ECIBRA. Tetraborato de sódio foi adquirido da Synth. Monofosfato de sódio hidratado foi obtido da Baker Analyzed Reagent. A água utilizada foi bidestilada e purificada em sistema Milli-Q da Millipore. Todos os reagentes utilizados tinham qualidade analítica certificada.

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterização preliminar das drogas livres

4.2.1.1. Determinação das características de solubilidade das drogas

As solubilidades de AA e de 5-fluorouracil foram testadas em água, tampão hepes a 10 mM com 120 mM de NaCl a pH 7,4 e no solvente orgânico etanol. A BLE teve sua

solubilidade testada apenas nos meios aquosos. As drogas foram misturadas aos solventes mencionados de forma que suas concentrações iniciais atingissem 10 mM. No caso da não solubilização nesta concentração, verificada por observação visual, adicionou-se mais solvente até que a droga fosse completamente solubilizada. A solubilidade de 5-fluorouracil foi também testada em tampão Tris-HCl com 140 mM de NaCl a pH 7,4 para uma concentração inicial de 5-fluorouracil de 100 mM.

4.2.1.2. Determinação do coeficiente de partição de ácido azelaico e 5-fluorouracil em sistema 1-octanol / solução tampão hepes

Soluções de AA e 5-fluorouracil tiveram seus coeficientes de partição determinados no sistema 1-octanol/tampão hepes a 10 mM com 120 mM de NaCl a pH 7,4. O composto 5-fluorouracil ainda teve seu coeficiente de partição determinado no sistema 1-octanol/Tris-HCl a 10 mM com 140 mM de NaCl a pH 7,4 e sem a adição do NaCl. Estes ensaios foram realizados para que se pudesse inferir a respeito da possível localização das drogas nos lipossomas quando neles incorporados.

Estes experimentos foram efetuados para soluções de ácido azelaico em hepes nas concentrações de 0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 2,5 mM e 5,0 mM. Para o 5-fluorouracil, foi utilizada a concentração de 5 mM. Para a bleomicina não foi realizado o ensaio de partição, por esta droga ser bastante hidrofílica, característica esta que resultaria na migração do composto praticamente todo para a fase aquosa.

Primeiramente, a fase orgânica, 1-octanol, foi saturada com 10% de tampão hepes e em tubos com tampa foram misturados 1 mL de cada solução de droga com 1 mL de 1-octanol saturado. Os tubos foram então agitados por inversão, manualmente, por 30 vezes. As amostras permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos para a separação das fases. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi coletada a parte aquosa, inferior, e a concentração de droga nesta fase foi determinada.

Em todas as situações, a concentração dos compostos terapêuticos em 1-octanol foi estimada como sendo a diferença entre a quantidade originalmente adicionada ao sistema e a quantidade determinada na fase aquosa. O coeficiente de partição aparente, P , foi definido

como a razão entre as concentrações do composto na fase superior e na fase inferior após a incubação. Não foram feitas correções para a inclusão de material adsorvido nas paredes dos tubos ou nas interfaces ar/octanol e octanol/solução aquosa.

4.2.1.3. Determinação da concentração micelar crítica do ácido azelaico

As características de dispersão de AA em água foram estudadas pela alteração na tensão superficial deste solvente em presença do referido composto. Para tal, foi utilizado um tensiômetro Krüss modelo K-12. Foram feitas medidas da tensão superficial do ácido azelaico em água nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 mM. O equipamento dispõe de uma placa plana de platina que foi imersa em cada solução de AA, até a profundidade de 1 mm, e forneceu 10 medidas de tensão superficial para cada amostra. Para cada concentração foi calculada a média da tensão superficial da série de medidas realizadas e então graficou-se a tensão superficial versus concentração, e através de análise gráfica foi obtida a concentração micelar crítica.

4.2.1.4. Comportamento do ácido azelaico em interfaces ar-água

Moléculas anfifílicas têm tendência de se organizar quando dispersas em uma interface ar-água, formando um filme monomolecular. Como o AA apresenta regiões da molécula com características hidrofílicas e hidrofóbicas distintas, averiguou-se o seu comportamento neste tipo de interface com a finalidade de se inferir sobre sua possível localização na bicamada lipídica dos lipossomas. Para tal, foram realizados ensaios de compressão do AA utilizando uma cuba de Langmuir-Blodgett modelo 611 da Nima Technology.

O experimento consistiu da aplicação de alíquotas de solução de clorofórmio contendo AA solubilizado em uma cuba preenchida com 420 mL de água destilada, equipada com duas barreiras móveis. Depois da aplicação da amostra, as barreiras foram fechadas. Durante a compressão monitorou-se a pressão superficial.

O experimento foi realizado com uma solução de AA a 1,5 mM. Primeiramente, 50 μ L de amostra foram colocados, manualmente, na superfície da água com o auxílio de uma seringa de vidro de 100 μ L de capacidade de forma lenta para minimizar perturbações no sistema. Em seguida, aguardou-se aproximadamente 2 minutos para ocorrer a evaporação do clorofórmio e então foi iniciado o fechamento das barreiras. Os valores da pressão superficial medidos foram registrados por um computador. A isoterma de Langmuir, para temperatura ambiente igual a 20°C, foi obtida graficando-se a área ocupada por molécula contra a pressão superficial.

O mesmo procedimento foi realizado com a aplicação de 2,05 mL de amostra.

4.2.2. Preparação dos lipossomas contendo ácido azelaico por injeção de etanol

A preparação dos lipossomas encapsulando AA pelo método de injeção de etanol é uma técnica de simples e rápida execução, sendo baseada na metodologia descrita por Batzri e Korn (1973).

No desenvolvimento de lipossomas por este método foi empregado um planejamento experimental do tipo 2^3 , ou seja, foram estudados os efeitos de três fatores em dois níveis cada um. As variáveis independentes ou fatores foram: razão molar inicial AA/lipídios ($AA/L_{inicial}$), temperatura da solução tampão no momento da injeção (T_{inj}) e diâmetro da agulha (D). A Tabela 4.1 mostra os valores destas variáveis estudados no planejamento experimental. As variáveis dependentes avaliadas foram a razão molar final AA/lipídios (AA/L_{final}) e o diâmetro médio das vesículas.

Neste caso não foi possível a realização do experimento referente ao ponto central porque não se dispunha de uma agulha com diâmetro intermediário aos utilizados.

As vesículas foram preparadas a partir de DPPC e colesterol na razão molar percentual de 60:40, respectivamente, variando-se a concentração de ácido azelaico a fim de obter razões molares iniciais droga/lipídio iguais a 0,1 e 0,2. As concentrações molares de DPPC e colesterol foram mantidas em 24 mM e 16 mM, respectivamente, mantendo-se a concentração total de lipídios em 40 mM (antes da injeção na fase aquosa), valor este

próximo à solubilidade máxima em etanol. Em consequência, as concentrações de ácido azelaico utilizadas foram de 4 mM (razão inicial AA:L igual a 0,1) e 8 mM (razão inicial AA:L igual a 0,2).

Primeiramente foram preparadas soluções de lipídios e ácido azelaico em etanol e, em seguida, alíquotas de 0,25 mL destas soluções foram injetadas em um béquer de 10 mL de capacidade contendo 4,75 mL de tampão hepes 10 mM com 120 mM de NaCl a pH 7,4. No momento da injeção, o béquer contendo a solução tampão estava imerso em um banho ultrassônico na temperatura previamente estabelecida. Os volumes de injeção e de solução tampão foram calculados a fim de manter a presença de 5% de etanol na suspensão final de lipossomas e a concentração de lipídios final (após a injeção) em 2 mM. Foram empregadas as temperaturas de 25°C e 45°C no momento da preparação das vesículas porque a primeira é a temperatura ambiente e a segunda por estar acima da temperatura de transição de fase do DPPC, a fim de se verificar a influência desta variável no processo.

Tabela 4.1 – Fatores e níveis do planejamento fatorial de experimentos.

Fatores	Níveis	
	-	+
Diâmetro da agulha (µm)	4	7
Temperatura (°C)	25	45
Razão molar inicial AA / L (mmol/mmol)	0,1	0,2

Para a injeção foi utilizada uma seringa de vidro de 1mL de capacidade e agulhas de 10 cm de comprimento. Com a agulha imersa na solução aquosa, a mistura de lipídios e ácido azelaico em etanol foi injetada, manualmente, o mais rápido possível na solução tampão mencionada. A formação das vesículas se deu de maneira instantânea. O esquema experimental empregado está ilustrado na Figura 4.1. Na Tabela 4.2 estão listados os experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental.

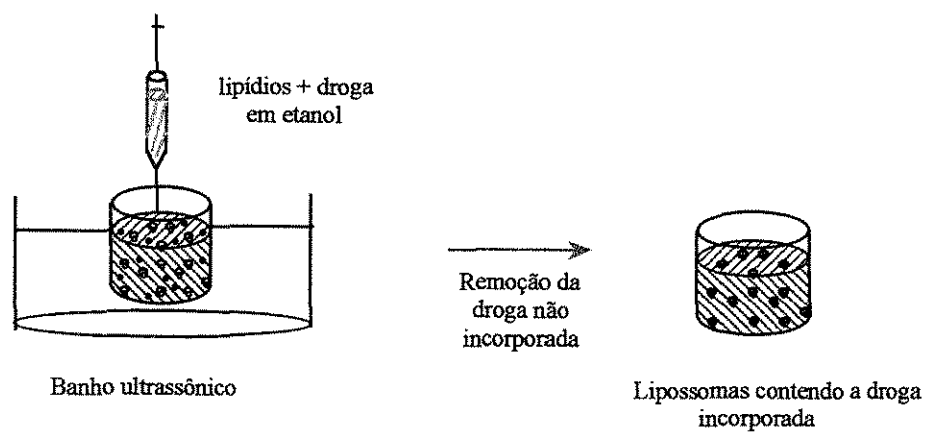


Figura 4.1 - Preparação de lipossomas encapsulando AA pelo método de injeção de etanol.

Tabela 4.2 - Experimentos de encapsulamento de AA realizados pelo método de injeção de etanol.

Ensaio	Diâmetro da agulha (μm)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	AA / L _{inicial} (mmolAA/mmolL)
1	7	45	0,2
2	4	45	0,2
3	7	25	0,2
4	4	25	0,2
5	7	45	0,1
6	4	45	0,1
7	7	25	0,1
8	4	25	0,1

4.2.3. Preparação dos lipossomas contendo bleomicina

4.2.3.1. Preparação dos lipossomas contendo bleomicina pelo método de injeção de etanol

As vesículas foram preparadas conforme já descrito para o ácido azelaico. A solução de lipídios (DPPC e Col, 60:40 mol%) em etanol foi injetada em uma solução de bleomicina em tampão hepes 10 mM com 120 mM de NaCl a pH 7,4. A razão molar inicial droga/lipídio testada foi de 1,5. Para tal, a concentração de lipídios foi de 2,0 mM (após a injeção) e de droga, 3,0 mM. A mistura de BLE aos lipídios em presença de etanol não foi efetuada devido à reduzida solubilidade da droga neste solvente.

4.2.4.2. Preparação dos lipossomas contendo bleomicina por incorporação ativa

Os lipossomas compostos por DPPC e Colesterol (60:40 mol% respectivamente), com 7,5 mM de concentração total de lipídios, foram preparados pelo método de hidratação do filme seguida de extrusão. A droga foi incorporada por encapsulamento ativo, baseado em estabelecimento de gradiente de pH de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Para tal, foi utilizado um planejamento fatorial de experimentos do tipo 2^2 , ou seja, dois fatores, estudados em dois níveis. Os fatores ou variáveis independentes selecionados foram a temperatura de incubação da droga com os lipossomas e a razão molar inicial droga/lipídio. Desta forma, foram realizados os experimentos apresentados na Tabela 4.3.

Foram utilizadas as temperaturas de 25 e 37°C por serem a temperatura ambiente e corpórea, respectivamente, de tal forma que a droga não fosse submetida a condições drásticas de temperatura, a fim de evitar a degradação da mesma. Quanto aos limites estabelecidos para a razão molar inicial droga/lipídio, selecionou-se valores para os quais as concentrações fossem tais que possibilitassem a detecção da droga encapsulada.

Tabela 4.3 - Ensaio de encapsulamento ativo de Bleomicina

Ensaio	Temperatura (°C)	D/L _{inicial} (mmolBLE/mmolL)
1	25	0,2
2	37	0,2
3	25	1,0
4	37	1,0
5*	31	0,6
6*	31	0,6

* Ensaio em duplicata referentes ao ponto central

4.2.4. Preparação dos lipossomas contendo 5-fluorouracil

4.2.4.1. Preparação dos lipossomas contendo 5-fluorouracil por incorporação ativa

Foram preparadas vesículas unilamelares pequenas extrudadas com a composição de DPPC/Col (em razões molares percentuais de 60:40) apresentando um gradiente de pH de 3,5 unidades. Este método foi selecionado por produzir lipossomas com estreita distribuição de tamanhos, por ser de execução relativamente simples e pela droga em questão apresentar características compatíveis com seu emprego.

As vesículas foram preparadas de forma a apresentar concentração total de lipídios de 7,5 mM. Para tal, os lipídios foram pesados em frasco de fundo redondo com capacidade de 50 mL e solubilizados adicionando-se uma solução de clorofórmio/metanol (9:1 v/v). Os solventes foram removidos em evaporador rotatório sob vácuo. A evaporação foi constituída de duas etapas, nos primeiros 20 minutos os solventes orgânicos foram evaporados à temperatura ambiente e em seguida por mais 15 minutos à temperatura de 55°C. Depois de totalmente evaporados os solventes, foi obtido um filme lipídico seco depositado na parede interna do frasco. Este filme lipídico foi hidratado com uma solução

contendo 300 mM de ácido cítrico a pH 4,0 por 15 minutos a 65°C, também em evaporador rotatório, com o vácuo desconectado. Após a hidratação, a suspensão contendo as vesículas multilamelares foi extrusada 15 vezes através de duas membranas filtrantes de polycarbonato da Osmonics Inc., sobrepostas, com diâmetro de poro igual a 100 nm a fim de se obter vesículas unilamelares. A temperatura de extrusão foi de 65°C e a cada passagem pela extrusora a amostra permanecia em repouso por 3 minutos para que fosse atingido o equilíbrio térmico.

Esta etapa foi realizada em extrusora de aço inox, modelo T. 001 da Lipex Biomembranes Inc. de 10 ml de capacidade provida de sistema de aquecimento através de camisa térmica para circulação de água.

A extrusão foi realizada sob pressão de 10 Kgf/cm². Para tal, a extrusora foi acoplada a um cilindro de nitrogênio equipado com válvula reguladora de pressão.

Depois de concluída a extrusão, realizou-se o processo de encapsulamento da droga por incorporação ativa, através da geração de um gradiente de pH entre o interior dos lipossomas e o meio externo. Tal gradiente foi gerado por titulação da suspensão de lipossomas a pH 4,0 com Na₂CO₃ a 2 M até que se atingisse o pH de 7,5. Com isso, o gradiente de pH gerado foi de 3,5 unidades.

As vesículas foram convenientemente diluídas com tampão hepes 10 mM e 120 mM de NaCl a pH 7,4 para uma concentração de lipídios de 2 mM e em seguida incubadas com solução de 5-fluorouracil em hepes de modo a obterem-se as razões molares iniciais droga/lipídio iguais a 0,4; 1,2 e 2,0.

Nestes ensaios foi empregado um planejamento estatístico de experimentos a fim de verificar a influência dos fatores razão molar inicial droga/lipídio, temperatura e tempo de incubação da droga com as vesículas na razão molar final droga/lipídio (D/L) e no diâmetro das vesículas. Neste planejamento, os efeitos dos três fatores mencionados foram avaliados em dois níveis, ou seja, planejamento experimental do tipo 2³, o que originou oito experimentos. A Tabela 4.4 apresenta os fatores e os respectivos níveis utilizados no encapsulamento ativo de 5-fluorouracil nos lipossomas.

Como ponto central do planejamento, foi realizado o experimento em duplicata nas seguintes condições: temperatura igual a 48,5°C, tempo de incubação de 35 minutos e razão inicial droga/lipídio igual a 1,2.

As suspensões de lipossomas e 5-fluorouracil foram mantidas em incubadora modelo G-24 da New Brunswick Scientific Co., Inc. a 200 rpm de rotação para cada experimento nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental. Todas as amostras foram protegidas da luz durante e após os ensaios realizados.

Tabela 4.4 - Esquema do planejamento experimental para o encapsulamento ativo de 5-fluorouracil.

Fatores	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
Temperatura (°C)	37	60
Tempo (minutos)	10	60
Razão inicial 5-fluorouracil/L (mmol/mmol)	0,4	2,0

De acordo com o planejamento estatístico apresentado realizaram-se os experimentos descritos na Tabela 4.5. A numeração dos ensaios foi utilizada apenas de forma ilustrativa, uma vez que os experimentos foram realizados em ordem cronológica aleatória.

4.2.4.2. Preparação dos lipossomas contendo 5-fluorouracil por incorporação passiva

Foram preparadas vesículas unilamelares pequenas extrudadas, na mesma composição já descrita anteriormente, pelo método de hidratação do filme lipídico em presença da droga, com incorporação passiva de 5-fluorouracil. Este método foi selecionado de maneira alternativa à incorporação ativa do 5-fluorouracil.

A concentração de lipídios também foi mantida em 7,5 mM. As soluções de hidratação utilizadas foram 5-fluorouracil nas concentrações de 10, 20, 30 e 50 mM em tampão Tris-HCl a 10 mM com 140 mM de NaCl a pH 7,4. Este tampão foi utilizado pois a droga apresenta maior solubilidade neste que em tampão hepes. Com isso, foi possível o teste de maiores razões molares iniciais droga/lipídio. A etapa de hidratação do filme lipídico foi realizada a 55°C por 15 minutos, em evaporador rotatório a 200 rpm. Após a hidratação, as suspensões contendo as vesículas multilamelares foram extrudadas conforme descrito na seção 4.2.4.1.

Tabela 4.5 - Experimentos realizados no encapsulamento ativo de 5-fluorouracil em lipossomas.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	D/L _{inicial} (mmol5-FU/mmolL)
1	10	37	0,4
2	60	37	0,4
3	10	60	0,4
4	60	60	0,4
5	10	37	2,0
6	60	37	2,0
7	10	60	2,0
8	60	60	2,0
9	35	48,5	1,2
10	35	48,5	1,2

4.2.4.3. Preparação dos lipossomas contendo 5- fluorouracil por injeção de etanol

O encapsulamento desta droga também foi testado pelo método de injeção de etanol de acordo com procedimento proposto por Batzri e Korn (1973).

Neste caso, foi utilizada apenas a agulha de 4 μm de diâmetro interno. A composição das vesículas foi a mesma utilizada no método de hidratação do filme já descrito.

Como a 5-fluorouracil apresentou maior solubilidade em tampão Tris-HCl, a solução aquosa consistiu-se de 5-fluorouracil a 50 mM neste tampão, e assim, foram injetados, nesta solução, os lipídios solubilizados em etanol. A concentração final de lipídios após a injeção foi de 2 mM, resultando então, em uma razão molar inicial droga/lipídio de 25:1. Foi testada esta razão inicial droga/lipídio relativamente alta porque quando a droga é solubilizada na fase aquosa, a eficiência de encapsulamento pelo método de injeção de etanol pode ser bastante reduzida (New, 1990).

Esta técnica de injeção de etanol também foi testada com a 5-fluorouracil solubilizado na solução etanólica e então injetada na fase aquosa livre de droga. Desta forma, a técnica permitiria maiores eficiências de encapsulamento caso a droga fosse incorporada na bicamada lipídica dos lipossomas. Para tal, a concentração de lipídios em etanol foi a mesma empregada anteriormente, 40 mM, e a concentração de 5-fluorouracil foi de 20 mM, solubilidade máxima da droga em etanol e à temperatura de 25°C, a fim de se evitar a degradação da droga.

Em todas as situações estudadas, a exposição da droga à luz e a variações de temperatura foi minimizada para evitar degradação.

4.2.4.4. Preparação dos lipossomas contendo 5-fluorouracil pelo método de evaporação em fase reversa

Foram preparados lipossomas na mesma composição dos anteriores, ou seja, DPPC e Col (60:40 mol%). O procedimento utilizado, descrito por New (1990), constitui-se das etapas descritas a seguir.

Foram pesadas massas de DPPC e Col (60:40 mol%) correspondentes à concentração de 3,0 mM (em relação à fase orgânica) para a preparação de 10 mL de uma

solução de éter dietílico e clorofórmio (1:1) num balão de fundo redondo com tampa. A esta solução adicionou-se 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM com 140 mM de NaCl a pH 7,4 contendo 50 mM de 5-FU injetando-se rapidamente a solução com uma seringa hipodérmica de 4 µm de diâmetro interno e 1 mL de capacidade.

O sistema foi tampado e colocado em banho ultrassônico por 2 minutos, e então transferiu-se o frasco para um evaporador rotatório para a remoção dos solventes orgânicos, a 37°C com baixo vácuo, até que se formasse um gel.

Suspendeu-se o vácuo, removeu-se o frasco do evaporador e submeteu-se a amostra à agitação intensa em vórtex. Nesta etapa, o gel sofre um colapso e transforma-se num fluido, embora viscoso, ou seja, a suspensão de lipossomas. Depois de formada a suspensão de lipossomas, continuou-se a evaporação por 15 a 20 minutos, e então se removeram os traços de solvente orgânico por cromatografia de permeação em gel ou diálise.

Uma vez que porque fatores como força iônica do meio, razão fase aquosa/orgânica e concentração inicial de droga são importantes sob o ponto de vista da eficiência de encapsulamento do composto de interesse e do volume de fase aquosa capturado (Szoka e Papahadjopoulos, 1978), ensaios suplementares foram realizados utilizando a técnica de evaporação em fase reversa. Nestes ensaios, a concentração de lipídios foi reduzida, foram avaliadas duas razões molares iniciais droga:lipídio, e a razão fase aquosa:orgânica foi de 1:3 ao invés de 1:10 empregada anteriormente.

Pesaram-se as massas de DPPC e Col (60:40 mol%) correspondentes à concentração de lipídios de 2,0 mM na fase orgânica, adicionou-se 45 mL de uma solução de éter dietílico e clorofórmio (1:1) num balão de fundo redondo com tampa, ao qual adicionaram-se 15 mL de tampão Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, como descrito anteriormente. Concentrações de droga de 50 e 15 mM, solubilizada em tampão Tris-HCl a pH 7,4, foram utilizadas. Desta forma, assegurou-se uma razão molar inicial de droga/lipídio igual a 8,3 e 2,5, respectivamente. Em seguida, os lipossomas foram submetidos à extrusão a 55°C através de membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 100 nm a fim de homogeneizar a população de vesículas em relação ao diâmetro (Szoka et al., 1980).

4.2.5. Remoção das drogas não encapsuladas

Após o encapsulamento, para a separação entre os lipossomas e a droga não encapsulada, as amostras foram submetidas à cromatografia de permeação em gel ou à diálise.

4.2.5.1. Separação por cromatografia de permeação em gel

A coluna utilizada foi adquirida da Sigma, com dimensões de 2,5 cm de diâmetro por 10 cm de altura, perfazendo um volume de leito de 49 mL. A coluna foi empacotada com gel de Sephadex G-50 previamente equilibrado com tampão adequado a cada amostra e saturada com lipossomas vazios.

Antes de proceder a separação das amostras, foi verificada a eficiência de separação da coluna através da realização de cromatografia de amostras contendo lipossomas vazios e as drogas livres.

As amostras foram injetadas em alíquotas de até 3,0 mL e eluídas com o tampão utilizado para equilibrar a coluna. Frações de cerca de 0,8 mL foram coletadas e as amostras ricas em lipossomas foram combinadas. A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente.

4.2.5.2. Separação por diálise

As preparações de lipossomas obtidas pelo método de evaporação em fase reversa tiveram o 5-fluorouracil não encapsulado removido por diálise. Primeiramente, as membranas (Inlab) foram fervidas em água deionizada por 30 minutos e cortadas nas dimensões de 12,5 mm por 16 mm. Amostras de 2 mL foram vertidas nos sacos de diálise, que foram então imersos em 100 mL de tampão Tris-HCl e mantidas sob refrigeração à 4°C. A cada dez horas foi realizada uma troca do tampão externo, perfazendo um total de quatro trocas.

4.2.6. Caracterização dos lipossomas

As amostras, após a remoção das drogas não incorporadas, foram caracterizadas quanto à concentração de lipídios e de droga, ao diâmetro médio e à estabilidade conforme descrito a seguir.

4.2.6.1. Determinação da concentração de lipídios

Para a determinação da concentração de lipídios utilizou-se o método de quantificação de fosfato fundamentado em Chen Jr. et al. (1956). Este método é baseado na digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e CO_2 por H_2SO_4 e H_2O_2 . O ortofosfato forma um complexo com molibdato de amônio, que quando reduzido pelo ácido ascórbico, forma um complexo azul detectável espectrofotometricamente.

O método consistiu das etapas descritas a seguir. Lavou-se toda a vidraria utilizada com detergente isento de fosfato e enxaguou-se com água deionizada para evitar interferentes na análise. Prepararam-se padrões de concentração conhecida de fosfato orgânico (distearoilfosfatidilcolina) e inorgânico (fosfato de sódio dibásico heptaidratado) na faixa de 0,2 mM a 2,7 mM. Em tubos do tipo Pyrex®, contendo cada um duas esferas de vidro, adicionaram-se 100 μL dos padrões (em duplicata), das amostras (em triplicata) convenientemente diluídas e do branco (tampão hepes ou Tris). Em seguida, adicionaram-se 500 μL de H_2SO_4 a 10 N a cada tubo. Aqueceram-se os tubos à temperatura de 200°C durante 30 minutos em placa digestora. Removeram-se os tubos do digestor e, após o seu resfriamento à temperatura ambiente, adicionaram-se 165 μL de água oxigenada a 30% livre de fosfato. Retornaram-se os tubos ao digestor por mais 30 minutos. Retiraram-se os tubos do digestor e após seu esfriamento à temperatura ambiente, adicionaram-se 4mL de água deionizada e 500 μL de uma solução aquosa de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 2,5% (m/v). Em seguida, agitou-se vigorosamente em vórtex cada tubo. Adicionaram-se 500 μL de uma solução aquosa de ácido ascórbico a 10% (m/v) e agitou-se novamente. Aqueceram-se as amostras em banho-maria a 100°C por 7 minutos e após o seu resfriamento, mediu-se a

absorbância a 830 nm contra água deionizada e então se subtraiu a absorbância referente à média obtida para as amostras em branco.

A concentração molar de lipídios totais foi calculada dividindo-se a concentração de fosfolipídios determinada pela curva de calibração (com os padrões) pela fração molar de fosfolipídio presente na amostra (igual a 0,6), para considerar a presença do colesterol.

4.2.6.2. Determinação da concentração de ácido azelaico

O AA não apresenta absorção espectrofotométrica na faixa de 190 a 1100 nm. Para determinação da concentração de AA foi utilizada a técnica conhecida como “microemulsion electrokinetic chromatography” (MEEKC) proposta por Watarai (1991).

Para preparar 50 gramas de microemulsão foram pesados 1,655 g de SDS; 44,635 g de tampão borato 10 mM a pH 9,0 e 3,305 g de 1-butanol. Num segundo frasco pesou-se 0,405 g de iso-octano e então se acrescentou este último à mistura pesada no primeiro frasco, para se evitar a evaporação deste solvente. Em seguida a microemulsão foi colocada em banho ultrassônico por 30 minutos.

A análise foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar P/ACE 5010 da Beckman. Foi utilizado um capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno e comprimento de 37 cm. As amostras foram injetadas por pressão com nitrogênio e a temperatura do capilar foi mantida em 30°C. A voltagem aplicada para a separação foi de 18 KV e o tempo de injeção de amostra foi de 10 segundos. Antes da primeira análise de cada dia o capilar era lavado com NaOH 1,0 M por três minutos e com a microemulsão por cinco minutos. Entre cada análise o capilar foi recondicionado com a passagem de NaOH 0,1 M por um minuto, seguida da microemulsão por mais um minuto (Altria, 1999).

Foi testada a resolução do método neste sistema através da injeção de amostras de concentrações conhecidas de ácido azelaico, lipossomas, e de misturas artificiais de ácido azelaico e lipossomas. As concentrações de ácido azelaico foram verificadas através do cálculo das áreas dos picos observados. Como as amostras estavam em presença de hepes, este composto foi utilizado como padrão interno, sendo então a área do pico referente ao ácido azelaico dividida pela área do pico do hepes. Este procedimento corrige possíveis

diferenças na quantidade de amostra injetada automaticamente pelo equipamento. As curvas de calibração (concentração de AA e de lipídios *versus* área) foram construídas considerando-se esta correção com a área do pico referente ao tampão hepes.

4.2.6.3. Determinação da concentração de bleomicina encapsulada

As vesículas foram solubilizadas com metanol na proporção volumétrica de 4:1 (v/v, metanol:amostra) para ter seu conteúdo de BLE encapsulado determinado por medida direta de absorbância a 289 nm imediatamente após a mistura. As curvas de calibração foram obtidas para lipossomas vazios, para droga livre e para misturas artificiais de lipossomas e droga a várias concentrações.

4.2.6.4. Determinação da concentração de 5-fluorouracil

A determinação da concentração de 5-fluorouracil encapsulado nos lipossomas foi realizada usando-se como agente solubilizante dessas vesículas uma microemulsão (ME) composta por 0,81% iso-octano, 6,61% 1-butanol e 3,31% dodecilssulfato de sódio em tampão borato 10 mM a pH 9,0. As amostras foram misturadas à ME na proporção de 1:3 (v/v) e tiveram suas absorbâncias medidas a 254 nm após uma hora. Foram construídas curvas de calibração dos lipossomas vazios, da droga livre e de misturas de concentrações conhecidas de droga e de lipossomas.

No caso de lipossomas preparados por evaporação em fase reversa, utilizou-se metanol para a solubilização das vesículas na proporção de 4:1 (v/v, metanol: lipossomas), medindo-se a absorbância também a 254 nm, imediatamente após a mistura.

Em todos os casos estudados, a quantificação da droga foi efetuada dentro de 12 horas após o início de sua manipulação, para evitar a interferência dos produtos de degradação.

4.2.6.5. Determinação dos diâmetros médios das vesículas

Determinou-se o tamanho das vesículas encapsulando as drogas através da medida de seus raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz por incidência de raios laser (Quase-Elastic Light Scattering, QLS) em equipamento da Malvern Instruments modelo Autosizer 4700.

As amostras de lipossomas foram diluídas na solução tampão adequada, Tris-HCl ou hepes, até concentrações inferiores a 1,0 mM em lipídios.

4.2.6.6. Avaliação da incorporação das drogas nos lipossomas

A avaliação da incorporação das drogas nas vesículas foi avaliada através de dois parâmetros, a eficiência de encapsulamento percentual e a concentração interna do material encapsulado nos lipossomas.

A eficiência de encapsulamento percentual, ε , foi definida como a relação entre a razão molar final droga/lipídio após a remoção do composto não encapsulado e a razão molar inicial empregada na preparação das vesículas como mostra a equação 4.1.

$$\varepsilon = \frac{(\text{moles de droga/moles de lipídio})_{\text{final}}}{(\text{moles de droga/moles de lipídio})_{\text{inicial}}} * 100 \quad (4.1)$$

A concentração interna de droga encapsulada por vesícula foi estimada através do diâmetro médio final das vesículas e as concentrações de lipídio e de droga encapsulada. A área da seção transversal para 60 mol% de DPPC e 40 mol% de colesterol foi considerada $50,2 \text{ \AA}^2$ (DPPC igual a $71 \text{ \AA}^2$ e colesterol $19 \text{ \AA}^2$) (Israelachvili e Mitchel, 1975). Considerando-se que 60% das moléculas de lipídio que compõem um lipossomas unilamelar estão localizadas na parte externa da bicamada lipídica (Powers et al., 1990), calculou-se o número de moléculas de lipídio por lipossoma de um determinado diâmetro, o número de vesículas por volume de amostra, o volume correspondente de solução aquosa capturada, o

número de moléculas de droga encapsuladas por lipossomas e, finalmente, a concentração interna do material encapsulado.

4.2.6.7. Estabilidade das vesículas na presença de tensoativo $C_{12}E_5$

A estabilidade dos lipossomas encapsulando 5-fluorouracil suspensos em tampão hepes 10 mM a pH 7,4, preparados pelo método de evaporação em fase reversa foi monitorada através de medidas de absorbância na presença do tensoativo polioxietileno 5-lauril éter ($C_{12}E_5$).

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno da Costarcorporation, Cambridge (EUA), com 96 poços de fundo redondo. A leitura da absorbância a 340 nm foi realizada utilizando uma leitora de placas do tipo ELISA, modelo EL312e, da Bio-Tek Instruments Inc.

Foram preparadas soluções estoque de tensoativo em tampão hepes a pH 7,4 na faixa de concentração de 3 a 96 mol%. A porcentagem de tensoativo destas soluções foi definida como a razão entre o número de moles de tensoativo e o número de moles total de tensoativo e lipídios, multiplicada por 100.

Adicionou-se a cada poço 120 μ L de soluções estoque de tensoativo com 80 μ L de lipossomas a 2,5 mM a fim de garantir que a concentração final da mistura fosse de 1 mM em lipídios.

A análise foi realizada em triplicata e as amostras foram distribuídas na placa de acordo com a Figura 4.2.

Os brancos (br) foram constituídos de solução de tensoativo na concentração indicada (120 μ L) e de solução tampão (80 μ L) ao invés de lipossomas. Obteve-se a média das absorbâncias e subtraiu-se o valor da absorbância do branco correspondente a cada concentração de tensoativo

Plotou-se a absorbância normalizada em função da concentração de tensoativo. Definiu-se absorbância normalizada conforme a equação 4.2.

$$\text{Abs. Norm.} = (A_x - A_0) / A_0 \quad (4.2)$$

onde A_x é a média da absorbância subtraído o efeito do branco e A_0 é a média da absorbância em 0% de tensoativo subtraído o efeito do branco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
B	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
C	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
D	br0	br5	br10	br20	br30	br40	br50	br60	br70	br80	br90	br96
E	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
F	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
G	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
H	br3	br7	br15	br25	br35	br45	br55	br65	br75	br85	br93	br100

Figura 4.2- Distribuição das amostras na placa do tipo ELISA. As porcentagens referem-se à concentração de tensoativo. Os brancos são denotados por br.

4.2.6.8. Estabilidade de estocagem das vesículas encapsulando 5-fluorouracil

As vesículas encapsulando 5-fluorouracil preparadas pelo método de evaporação em fase reversa foram avaliadas quanto à sua estabilidade em função do tempo de estocagem. Para tanto, os lipossomas foram avaliados quanto à sua agregação ou fusão, assim como quanto à retenção da droga encapsulada.

As amostras foram submetidas à medida de diâmetro médio e de concentração de droga periodicamente por quatro semanas, após a remoção da droga por diálise, conforme descrito anteriormente.

V-Resultados e Discussão

5.1. Preparação e caracterização dos lipossomas encapsulando ácido azelaico

5.1.1. Avaliação preliminar do comportamento da droga livre

As características físico-químicas de compostos encapsulados em lipossomas são importantes para se prever o comportamento destes compostos quando em contato com as bicamadas lipídicas. Informações a respeito de solubilidade da droga, do coeficiente de partição, da tensão superficial e de seu comportamento na interface ar-água podem ser de grande valia para a compreensão do comportamento da droga na presença de lipossomas. Assim, antes de se proceder com a preparação dos lipossomas e encapsulamento do composto pré-determinado foram realizados alguns ensaios preliminares de caracterização da droga.

Testou-se a solubilidade de AA em tampão hepes até o limite de 10 mM de droga. Nesta concentração o composto não foi solubilizado, a máxima solubilidade foi observada a 6 mM. Assim, seu encapsulamento em lipossomas pelo método de hidratação do filme seria pouco recomendado.

Em etanol, o AA é mais solúvel. Na concentração de 10 mM o composto foi completamente solubilizado. Este comportamento indica uma possibilidade de sua incorporação em lipossomas pelo método de injeção de etanol.

A medida do coeficiente de partição para o AA em sistema 1-octanol/tampão hepes a 10 mM e pH 7,4 com 120 mM de NaCl foi realizada nas concentrações de droga de 0,5 a 5 mM. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 5.1 e o coeficiente de partição foi definido como a razão entre as concentrações do composto na fase orgânica e aquosa.

Através destes resultados, verifica-se que quanto maior a concentração de AA, maior a tendência de migração do composto para a fase aquosa, indicando uma possível saturação Vdo 1-octanol. Estima-se que, para estas amostras, a concentração de AA em 1-octanol tenha variado de 0,15 a 0,31 mM. Estes dados indicam que possivelmente a incorporação desta droga poderia ser feita na bicamada lipídica dos lipossomas, desde que baixas razões

molares droga/lípido fossem utilizadas. Desta forma, com base na boa solubilidade do AA em etanol e no seu coeficiente de partição em 1-octanol, a técnica de injeção de etanol, possivelmente traria bons resultados.

Tabela 5.1 – Coeficientes de partição de ácido azelaico no sistema 1-octanol/hepes. Temperatura ambiente, hepes a 10 mM e 120 mM de NaCl a pH 7,4.

Concentração de AA inicial em tampão hepes (mM)	Coeficiente de partição
0,5	0,800
1,0	0,250
2,5	0,140
5,0	0,031

Com a finalidade de averiguar as formas possíveis de arranjo molecular do AA, tanto entre si quando em solução aquosa como quando em interfaces ar-água, para se estimar sua maneira de empacotamento quando incorporado aos lipossomas, realizou-se ensaios para a avaliação da tensão superficial de soluções de AA em água, em distintas concentrações. A Figura 5.1 mostra os resultados obtidos.

Como pode ser observado, ocorre um decréscimo da tensão superficial com o aumento da concentração de ácido azelaico, indicando que este composto apresenta atividade superficial. A Figura 5.1 indica também que o AA se acumula na interface ar-água até que, ao saturá-la, começa a se estruturar em micelas para que possa se manter de forma estável em água. A partir do gráfico mostrado na Figura 5.1, pode-se determinar a concentração micelar crítica (c.m.c.) do AA, igual a 4,3 mM, na junção das retas que descrevem o comportamento do sistema a altas e baixas concentrações. Uma hipótese seria que quando agregadas na forma de micelas, as moléculas de AA apresentem a organização ilustrada na Figura 5.2. As micelas formadas poderiam ser esféricas, cilíndricas ou mesmo planas.

Uma vez que este composto apresentou atividade superficial, acumulando-se na interface ar-água a ponto de reduzir sensivelmente a tensão superficial da água, decidiu-se estudar seu comportamento quando comprimido lateralmente em uma interface do mesmo tipo. Este ensaio possibilitaria a determinação da área ocupada por molécula de AA quando sob máxima compressão, fornecendo indícios da maneira pela qual tal molécula se apresentaria quando na bicamada lipídica.

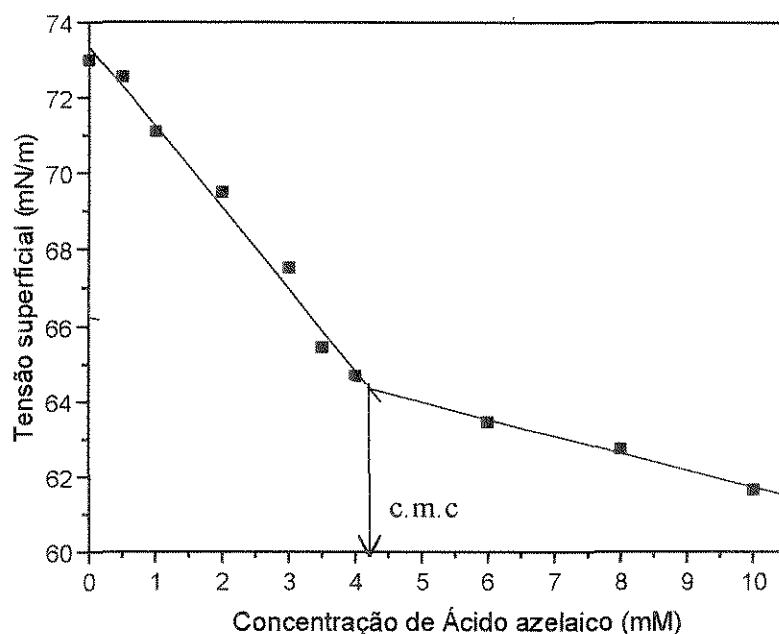


Figura 5.1- Variação da tensão superficial de soluções aquosas com distintas concentrações de AA. Para cada amostra foram obtidas 10 medidas de tensão superficial.

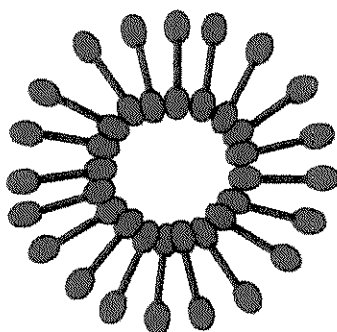


Figura 5.2 – Modelo proposto para a agregação das moléculas de AA para a formação de uma micela.

Moléculas anfifílicas pouco solúveis em água, quando na interface ar-água ordenam-se mantendo a cabeça polar hidrofílica em contato com a água e a cauda apolar em contato com o ar. Inicialmente, supôs-se que, quando na interface ar-água, as moléculas de AA poderiam apresentar a conformação ilustrada na Figura 5.3.

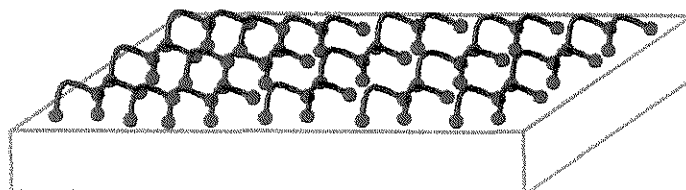


Figura 5.3 – Comportamento esperado das moléculas de AA na interface ar-água.

Como se pode observar, a monocamada formada pelas moléculas de AA não sofre ruptura, conforme indicado na isoterma de Langmuir apresentada na Figura 5.4, ou porque apresenta elevada compressibilidade, ou devido à sua limitada, mas existente, solubilidade em água, o que faria com que, sob pressão, as moléculas migrassem para a fase aquosa, onde poder-se-iam organizar na forma de micelas.

O padrão de organização inicialmente idealizado para estas moléculas na interface ar-água poderia não estar ocorrendo devido à grande tensão a que estaria sujeita a cadeia apolar do AA, muito curta (com apenas 9 carbonos) para se dobrar, permitindo que as duas cabeças polares ficassem simultaneamente em contato com a água.

Segundo Gaines, Jr.(1966), a compressão de ácidos dicarboxílicos com cadeias carbônicas inferiores a 12 grupos metil em cuba de Langmuir-Blodgett é, de fato, de difícil obtenção, uma vez que as monocamadas podem ser consideradas como gasosas ou expandidas. Assim, um filme de AA em estado condensado, com as moléculas mais próximas umas das outras, teria baixa estabilidade e não apresentaria o fenômeno de colapso.

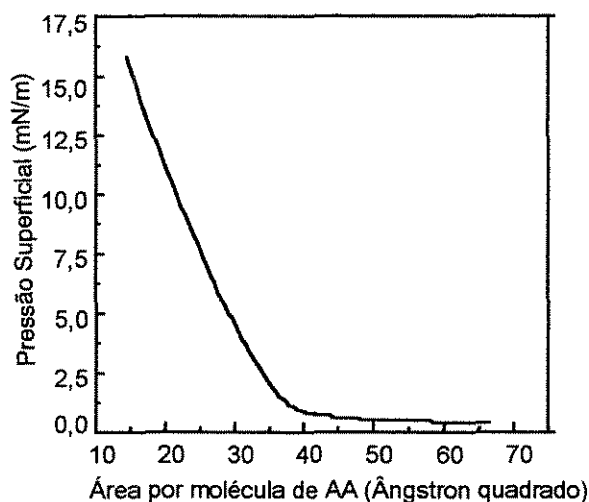


Figura 5.4 – Isoterma de Langmuir para o ácido azelaico. Temperatura ambiente igual a 20°C. Foram aplicadas alíquotas de ácido azelaico solubilizado em clorofórmio em uma cuba contendo 420 mL de água deionizada.

Desta forma, com base no conjunto de resultados descritos, supõe-se que a referida molécula poderá acumular-se parcialmente tanto na bicamada lipídica quanto no cerne aquoso de um lipossoma quando encapsulada.

5.1.2. Avaliação da adequação da técnica de quantificação de ácido azelaico encapsulado

Para a definição da técnica de quantificação de AA foi necessária a realização de uma revisão rigorosa da literatura. Dentre as técnicas promissoras, destaca-se a de Passi et al. (1983), que quantificou ácidos dicarboxílicos, inclusive de nove carbonos, após uma reação de derivatização para originar um éster que posteriormente seria identificado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Esta técnica não foi testada neste estudo para a quantificação do AA encapsulado em lipossomas por ser uma técnica relativamente complexa, com muitas etapas que demandariam longo tempo de análise.

Outra técnica utilizada para quantificação de AA foi proposta por Mainka et al. (1997) utilizando eletroforese capilar. Neste trabalho, os autores quantificaram ácidos dicarboxílicos presentes em amostras de chuva. Este procedimento foi testado com lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol, mas não apresentou resultados satisfatórios, provavelmente devido à presença dos lipídios.

Assim, para a quantificação de AA foi selecionado o método proposto por Altria (1999), utilizando uma microemulsão para a separação e a quantificação de AA por eletroforese capilar (*Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, MEEKC).

Primeiramente foi verificada a possibilidade de separação do ácido azelaico e dos lipídios após o rompimento das vesículas com a microemulsão. Os tempos de migração destes compostos foram bem distintos, em torno de 5 minutos para o AA e 8 minutos para os lipídios, conforme mostrado no eletroferograma típico ilustrado na Figura 5.5.

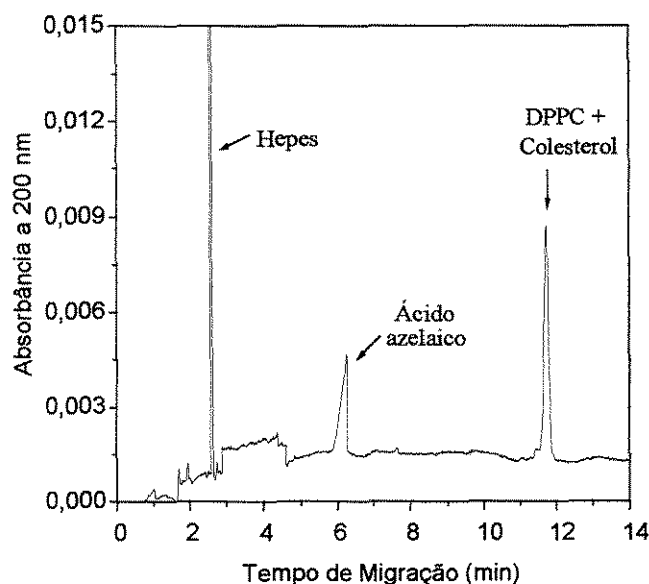


Figura 5.5 – Eletroferograma de uma mistura artificial de lipossomas e ácido azelaico. Capilar de sílica fundida de 50 μm de diâmetro interno e 37 cm de comprimento. A temperatura do capilar foi mantida a 30°C, a injeção foi feita sob pressão com nitrogênio por 10 segundos e a voltagem aplicada foi igual a 18 KV.

Com isso, confirmou-se a viabilidade do uso da técnica sob o ponto de vista da separação entre as espécies. Em seguida, foi construída uma curva de calibração para o ácido azelaico a partir de misturas artificiais entre a droga e os lipossomas, usando-se hepes como padrão interno. Observou-se boa linearidade, coeficiente de correlação igual a 0,998, entre as áreas do picos e as concentrações na faixa de 0,125 a 2,5 mM de AA.

5.1.3. Encapsulamento passivo de AA em lipossomas preparados por injeção de etanol

Foi testado o método de injeção de etanol para o encapsulamento de ácido azelaico de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Imediatamente após a injeção e obtenção dos lipossomas, as amostras foram submetidas à cromatografia de permeação em gel, e após esta etapa de separação as amostras foram caracterizadas.

Os lipossomas preparados apresentaram os diâmetros médios e as concentrações lipídicas listados na Tabela 5.2. A variação observada na concentração final dos lipídios deve-se à mistura de números distintos de frações coletadas na cromatografia. As Figuras 5.6 e 5.7 ilustram distribuições de diâmetros de vesículas típicas obtidas usando-se agulhas com diâmetros de 4 e 7 μm , respectivamente. Os lipossomas preparados com agulha de maior diâmetro apresentaram diâmetro médio maior e distribuição de tamanhos mais ampla em comparação aos lipossomas obtidos com a agulha de menor diâmetro. Nota-se que, nas condições testadas, os diâmetros obtidos foram bastante superiores aos citados na literatura, de cerca de 25 nm (Batzri e Korn, 1973).

Utilizando o programa Fatorial, desenvolvido por Bruns (1996), foram calculados os efeitos de interação de cada um dos fatores estudados no diâmetro médio das vesículas: diâmetro da agulha, temperatura e a razão molar inicial droga/lipídio. Os efeitos calculados estão apresentados no Quadro 5.1.

Como esperado, o fator que apresenta maior efeito sobre a variável resposta diâmetro médio das vesículas, é o diâmetro da agulha utilizada na injeção. Observando-se a Tabela 5.2, pode-se notar que a agulha de menor diâmetro origina vesículas também de menor diâmetro. Isto se deve também ao fato de que no momento da injeção, com a agulha

mais grossa é mais difícil obter-se uma injeção rápida e homogênea. Este fato possivelmente leva a uma distribuição menos uniforme de tamanhos de vesículas e também à obtenção de lipossomas de maior tamanho.

Tabela 5.2 - Concentração lipídica e diâmetros médios das vesículas encapsulando AA preparadas pelo método de injeção de etanol.

Ensaio	Diâmetro da agulha (μm)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	AA/L inicial	Concentração de lipídios (mM)	Diâmetro médio (nm)
1	7	45	0,1	1,10	299,2
2	4	45	0,1	0,71	263,0
3	7	25	0,1	0,90	215,7
4	4	25	0,1	0,97	273,9
5	7	45	0,2	0,98	195,0
6	4	45	0,2	1,14	339,8
7	7	25	0,2	0,82	209,2
8	4	25	0,2	0,88	308,2

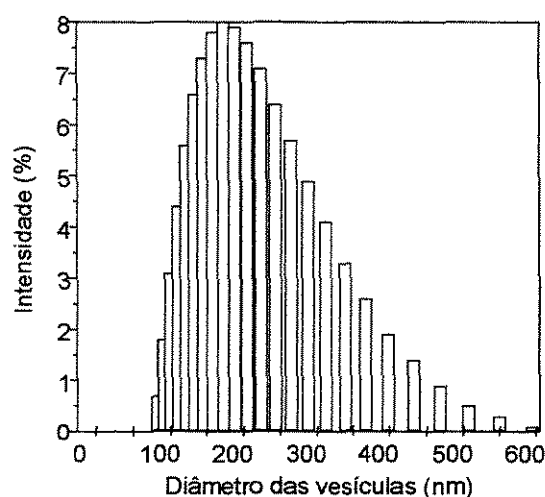


Figura 5.6– Distribuição de tamanhos de lipossomas com AA. Método de injeção de etanol. Agulha de 4 μm , temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ e razão droga/lipídio inicial igual a 0,1.

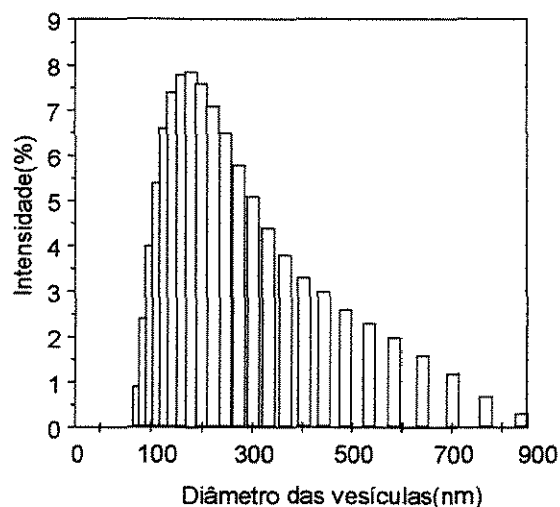


Figura 5.7 – Distribuição de tamanhos de lipossomas com AA. Método de injeção de etanol. Agulha de 7 μm , temperatura de 25°C e razão droga/lípido inicial igual a 0,1.

Quadro 5.1 – Efeitos calculados do planejamento experimental para o encapsulamento de ácido azelaico.

Efeitos principais

Efeito do diâmetro da agulha = 66,45

Efeito da temperatura = -22,5

Efeito da razão inicial AA/L = 0,1

Efeitos de interação entre dois fatores

Efeito de interação entre diâmetro da agulha e temperatura = 12,15

Efeito de interação diâmetro da agulha e razão inicial D/L = 55,45

Efeito de interação entre temperatura e razão inicial D/L = 13,8

Efeito de interação entre os três fatores = -35,05

O efeito da razão molar inicial AA/L isoladamente poderia ser desprezado, porém quando em conjunto com os demais fatores deve ser considerado para se adotar medidas de otimização deste processo.

A temperatura tem efeito significativo, fato também esperado uma vez que a temperatura de 45°C está acima da temperatura de transição de fases do DPPC, igual a 41°C.

Através da Figura 5.8, que mostra a superfície de resposta do planejamento experimental, pode-se visualizar o efeito das variáveis independentes temperatura e razão inicial droga/lípido no diâmetro médio das vesículas obtidas. Pode-se observar que a variável que apresenta maior efeito sobre o diâmetro médio dos lipossomas é, efetivamente, o diâmetro da agulha.

A fim de verificar a estabilidade estrutural das amostras preparadas, após trinta dias os diâmetros médios das vesículas foram determinados novamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Diâmetros médios de vesículas encapsulando AA após 30 dias a 5°C e variações percentuais com relação aos diâmetros médios iniciais.

Ensaio	Diâmetro médio após 30 dias (nm)	Variação (%)
1	348,9	16,6
2	493,1	87,5
3	347,1	60,9
4	423,4	54,6
5	367,9	88,7
6	393,3	15,7
7	499,2	138,6
8	374,2	21,4

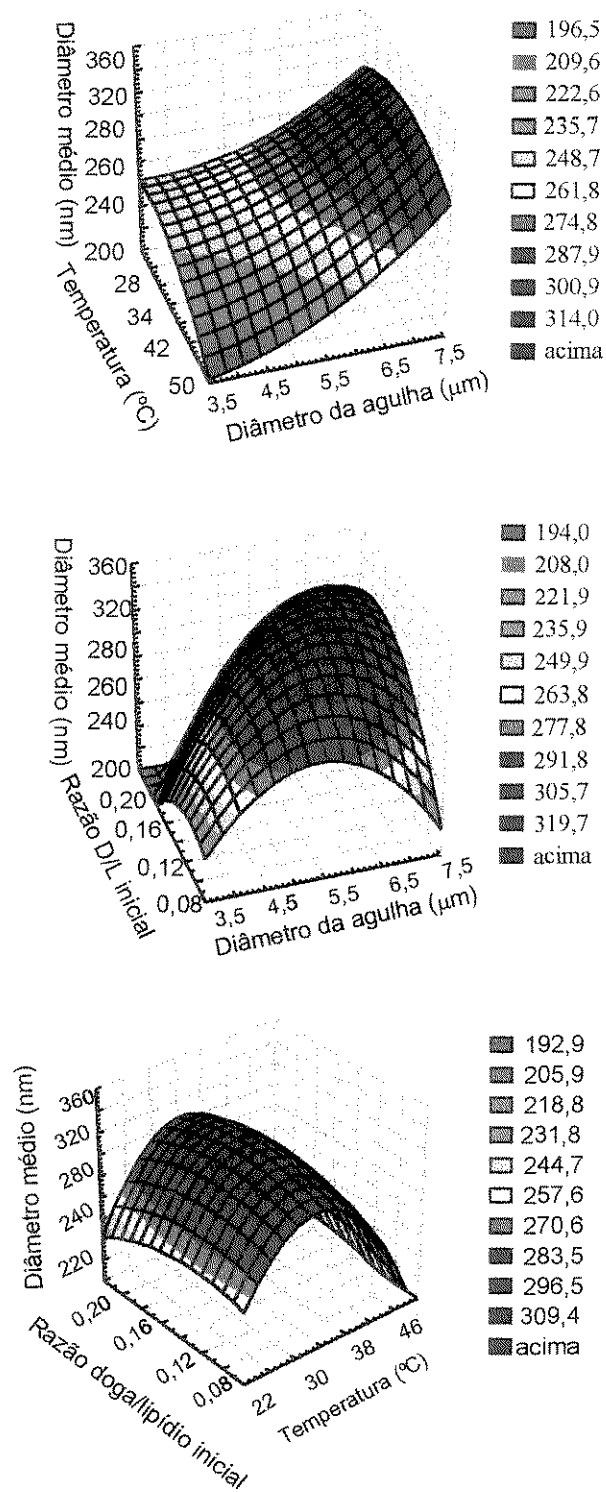


Figura 5.8 – Superfícies de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2^3 cujos fatores são: razão inicial droga/lípido, temperatura e diâmetro da agulha.

Como pode ser observado, em todos os casos houve aumento apreciável do diâmetro médio das vesículas. Isto significa que pode estar havendo agregação ou fusão destas vesículas. Como a distribuição de tamanhos em geral é bem ampla, pode estar havendo fusão das vesículas menores, que são normalmente mais sujeitas a este processo. As preparações que apresentaram melhor estabilidade de estocagem, com 15,7% a 21,4% de aumento nos seus diâmetros poderiam ser viáveis comercialmente, se num período de tempo mais prolongado tivessem seu tamanho estabilizado.

A quantificação do ácido azelaico através de análise por eletroforese capilar não foi concluída devido a problemas mecânicos apresentados no equipamento, que por sua vez não puderam ser solucionados no decorrer deste trabalho. Por este motivo, não foi dado prosseguimento aos estudos envolvendo ácido azelaico. Não foi encontrada na literatura outra técnica para a detecção deste composto que fosse viável em preparações contendo lipossomas. O uso da eletroforese capilar seria extremamente interessante porque permitiria a quantificação da droga e ainda do fosfolípido na mesma análise.

5.2. Preparação e caracterização dos lipossomas encapsulando bleomicina

5.2.1. Avaliação preliminar do comportamento da droga livre

Quanto à solubilidade em tampão hepes 10 mM a pH 7,4 com 120 mM de NaCl, esta droga apresentou boa solubilização na concentração de 10 mM. Diante deste resultado, pode-se supor que quando encapsulada suas moléculas devem ser alojadas no cerne aquoso dos lipossomas.

5.2.2. Encapsulamento de bleomicina em lipossomas

Para o encapsulamento de BLE em lipossomas foram testados os métodos de injeção de etanol e de incorporação ativa da droga em lipossomas extrudados.

O método de injeção de etanol foi realizado em uma única condição para esta droga, empregando-se a injeção da solução de lipídios em etanol em uma solução de BLE a 3 mM

em tampão hepes devido a dois fatores. A droga é praticamente insolúvel em etanol (*Merck Index*, 1996), o que inviabiliza sua mistura à solução de lipídios neste solvente orgânico e, devido a seu custo elevado (cerca de US\$ 90,00 o frasco de 15 mg), a utilização de amostras aquosas de BLE com concentrações elevadas não é viável do ponto de vista econômico em termos de escalonamento.

Nestas condições, os lipossomas obtidos não resultaram em encapsulamento apreciável da droga, obtendo-se uma eficiência de encapsulamento nula.

O diâmetro médio destas vesículas, igual a 300 nm, apresentou valor comparável com os diâmetros obtidos na incorporação de ácido azelaico pelo mesmo método. Na Figura 5.9 observa-se a formação de três populações de vesículas, sendo a amostra então caracterizada como polidispersa.

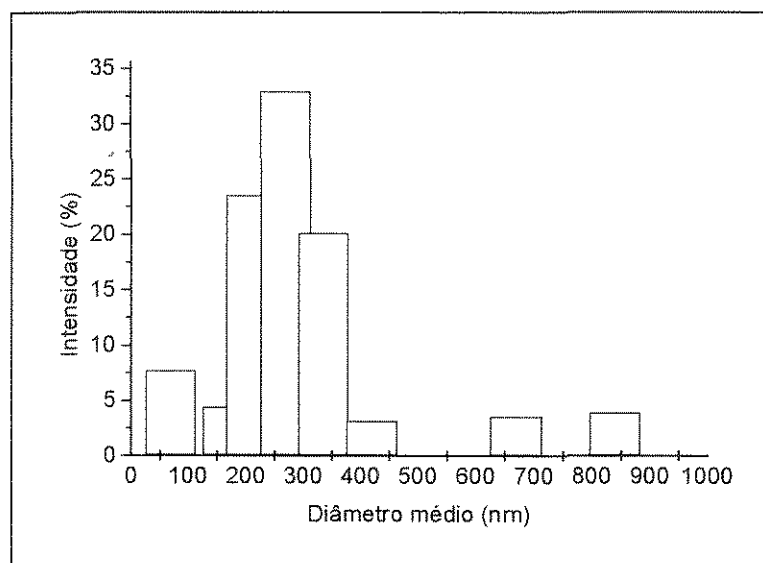


Figura 5.9- Distribuição de tamanhos dos lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol para o encapsulamento de Bleomicina.

Ensaio subsequentes foram, então, realizados explorando-se a incorporação ativa de BLE em lipossomas preparados por extrusão, de acordo com o planejamento fatorial descrito anteriormente para avaliar os efeitos das variáveis temperatura de incubação da

droga com os lipossomas e razão molar droga/lipídio inicial no comportamento do sistema. A Tabela 5.4 mostra os resultados obtidos.

Tabela 5.4 - Eficiência de encapsulamento ativo da droga bleomicina e diâmetro médio das vesículas. Concentração de lipídios inicial igual a 1,0 mM. Diâmetro médio das vesículas antes da incubação era igual a 160 nm. Concentração inicial de bleomicina igual a 0,2; 0,6 e 1,0 mM para as razões molares iniciais de 0,2; 0,6 e 1,0 mM respectivamente.

Ensaio	T (°C)	D/L _{inicial}	D/L _{final}	Eficiência de encapsulamento (%)	Diâmetro médio (nm)	Concentração interna de droga (mM)
1	25	0,2	0,002	1,00	153,2	0,6
2	25	1,0	0,000	0,00	153,8	0,0
3	37	0,2	0,006	2,80	185,4	2,1
4	37	1,0	0,004	0,38	164,0	1,5
5	31	0,6	0,001	0,10	164,0	0,2
6	31	0,6	0,002	0,32	153,4	0,7

Destaca-se que a concentração de bleomicina inicial nas amostras não foi empregada em maiores níveis devido ao elevado custo deste composto. Apesar da baixa eficiência de encapsulamento, a concentração interna de droga chega a 2,1 mM, valor razoável frente à concentração inicialmente em solução (0,2 mM) quando da incubação na presença dos lipossomas vazios.

Utilizando o programa Fatorial, desenvolvido por Bruns (1996), foram calculados os efeitos de interação de cada um dos fatores estudados: temperatura e a razão molar inicial droga/lipídio no diâmetro médio das partículas. Os efeitos calculados estão apresentados no Quadro 5.2.

Como pode ser observado pelos valores dos efeitos das variáveis, tanto a temperatura como a razão D/L_{inicial} são fatores importantes sob o ponto de vista dos diâmetros das vesículas obtidas pelo método de encapsulamento ativo. Porém, observa-se também que a temperatura apresenta maior efeito em relação ao diâmetro médio das

vesículas. A elevação da temperatura levou ao aumento do diâmetro médio dos lipossomas para ambas as razões D/L iniciais, sendo que este efeito foi mais pronunciado para a D/L_{inicial} menor. Já a elevação da D/L_{inicial} promoveu o aumento do diâmetro médio das vesículas à temperatura mais baixa, e o inverso foi observado para a temperatura mais elevada.

Quadro 5.2 – Efeitos das variáveis do planejamento experimental para encapsulamento de Bleomicina por incorporação ativa no diâmetro final das vesículas.

Efeitos principais

Efeito da temperatura = 21,2

Efeito da razão inicial D/L = -10,4

Efeitos de interação entre os dois fatores

Efeito de interação entre temperatura e razão inicial D/L = -11,0

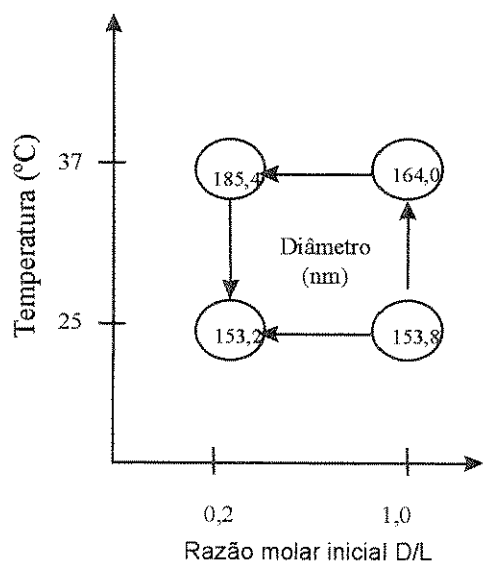


Figura 5.10 - Diagrama apresentando os resultados obtidos para a variação dos diâmetros médios das vesículas de acordo com os níveis de temperatura e razão molar droga/lipídio. Razão molar inicial droga/lipídio igual a 0,2 e 1,0. Temperaturas de incubação de 25 e 37°C.

Apesar dos lipossomas terem sido extrusados em membranas de policarbonato de poros bem definidos de 100 nm, observa-se que os seus tamanhos são significativamente maiores que este valor, o que possivelmente resulta da etapa de incubação dos lipossomas com a droga, na qual estes são submetidos à elevação de temperatura e agitação por trinta minutos. O diagrama apresentado na Figura 5.10 ilustra estas observações.

A superfície de resposta referente ao diâmetro médio das vesículas obtidas pode ser observada na Figura 5.11. Neste gráfico pode-se visualizar claramente que a temperatura é o fator que mais influencia o diâmetro das vesículas.

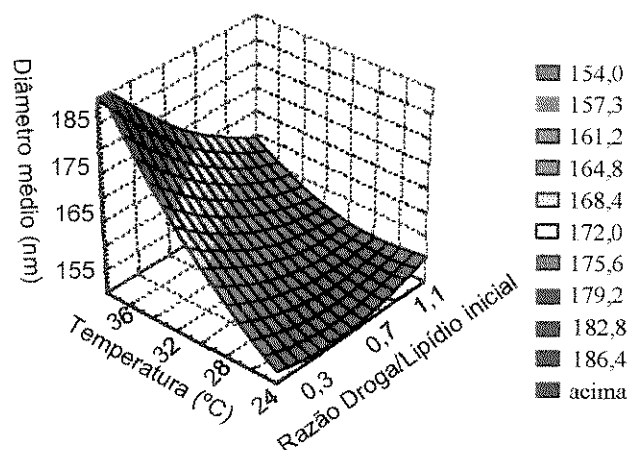


Figura 5.11 – Superfícies de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2^2 cujos fatores são: razão inicial droga/lípido e temperatura. Como resposta analisada tem-se o diâmetro médio das vesículas.

A Figura 5.12 apresenta uma distribuição de tamanho típica das amostras de lipossomas preparadas por extrusão na presença de bleomicina, indicando a obtenção de uma única população de vesículas.

Através de análise da Tabela 5.4, observa-se que as eficiências de encapsulamento de bleomicina nas vesículas foram extremamente baixas de uma forma geral, considerando-se que o método utilizado pode resultar em eficiências de encapsulamento próximas a 100% (Mayer et al., 1990). Os efeitos calculados em relação à variável resposta de eficiência de encapsulamento são apresentados no Quadro 5.3, onde se verifica que ambos os fatores devem ter a mesma influência nos resultados.

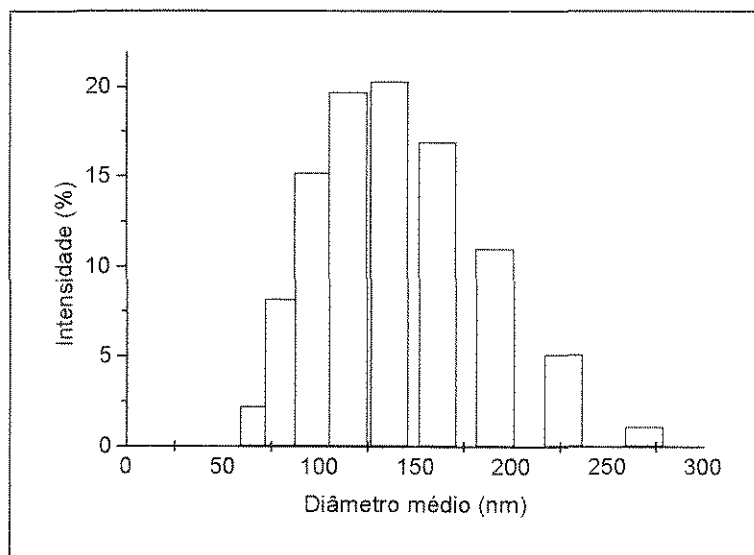


Figura 5.12- Distribuição de tamanhos de vesículas preparadas por incorporação ativa de Bleomicina. Na razão molar inicial droga/lipídio de 0,2 e temperatura de 25°C.

A Figura 5.13 apresenta a superfície de resposta do planejamento experimental em relação à variável resposta razão droga/lipídio final, onde nota-se que em valores intermediários de razão molar droga/lipídio inicial e de temperatura de incubação, obtém-se os melhores resultados em termos de encapsulamento. Uma possível causa para este comportamento seria a elevada massa molecular da droga (em torno de 1400 Da), que dificultaria sua permeação através da bicamada lipídica que, nas temperaturas dos ensaios, se apresentaria relativamente rígida. O aumento da temperatura de incubação BLE/lipossomas, se não resultasse em degradação da droga, poderia aumentar a eficiência de encapsulamento. Outra possível razão seria a presença de grupos hidroxila na estrutura da droga (em um total de 7), que podem reduzir a permeação da droga através da bicamada lipídica, conforme observado por Nichols e Deamer (1976) para o encapsulamento de catecolaminas e por Moraes et al. (1996) na incorporação de p-boronofenilalanina.

Assim, outras técnicas devem ser exploradas para se incorporar este composto em lipossomas em condições de maior eficiência.

Quadro 5.3 – Efeitos calculados do planejamento experimental para encapsulamento de bleomicina por incorporação ativa (para variável resposta, eficiência de encapsulamento).

Efeitos principais

Efeito da temperatura = 1,19

Efeito da razão inicial D/L = -1,6

Efeitos de interação entre os dois fatores

Efeito de interação entre temperatura e razão inicial D/L = -0,81

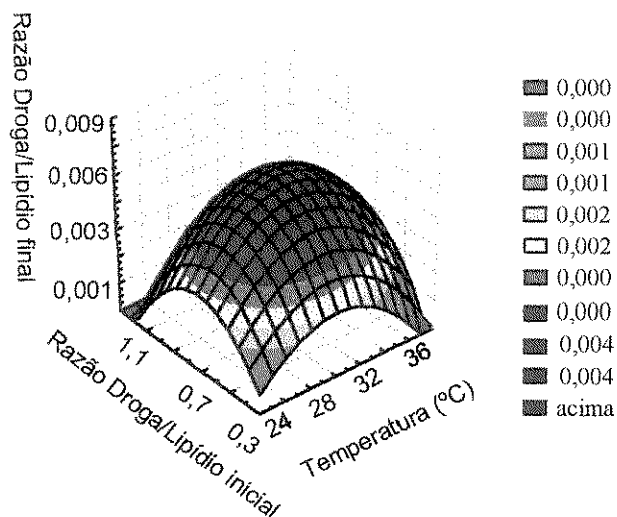


Figura 5.13 – Superfície de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2^2 cujos fatores são: razão inicial droga/lípido e temperatura. Como resposta analisada tem-se a razão final droga/lípido.

5.3. Preparação e caracterização dos lipossomas encapsulando 5-fluorouracil

5.3.1. Avaliação preliminar do comportamento da droga livre

Segundo o *Merck Index* (1996), a solubilidade máxima do 5-FU em água é de 7,7 mM. A solubilidade de 5-FU foi então testada nos tampões hepes e Tris-HCl e em etanol. Em tampão hepes a droga apresentou solubilidade máxima a 10 mM, já no tampão Tris-HCl a solubilidade máxima à temperatura ambiente foi de 50 mM, o que o indica para o encapsulamento passivo deste composto em lipossomas por hidratação do filme lipídico. Elorza et al. (1993) utilizaram uma solução de 5-FU em Tris-HCl a 200 mM, porém, os autores não mencionaram a temperatura de solubilização. Em etanol, a solubilidade máxima de 5-fluorouracil foi de 10 mM.

A medida do coeficiente de partição de 5-FU no sistema 1-octanol/hepes resultou em um valor igual a zero, o que indica que a droga, quando encapsulada em lipossomas, teria a tendência de se acumular no cerne aquoso.

O coeficiente de partição de 5-fluorouracil em 1-octanol/tampão Tris-Cl 10 mM a pH 7,4 sem a adição de sal e com 140 mM de NaCl está mostrado na Figura 5.14.

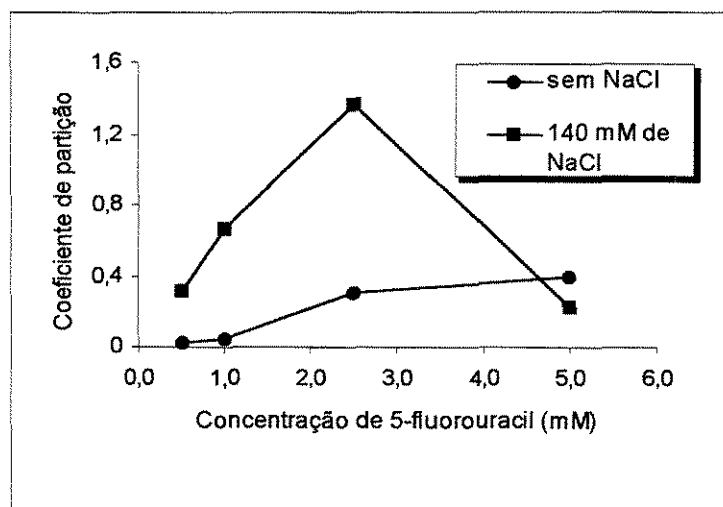


Figura 5.14- Coeficiente de partição de 5-Fluorouracil no sistema 1-octanol/tampão Tris-HCl a 10 mM sem a adição de NaCl e com 140 mM de NaCl. Temperatura ambiente igual a 25°C.

Também se utilizando tampão Tris-HCl verifica-se a tendência da droga em acumular-se na fase aquosa, conforme mostrado na Figura 5.14. No caso do tampão com alta força iônica, esta tendência é ainda mais pronunciada para a maior concentração de droga utilizada. De acordo com esses resultados pode-se supor que a droga acumular-se-ia preferencialmente no cerne aquoso das vesículas lipídicas, embora a concentrações mais elevadas tenha pequena afinidade pela bicamada lipídica. Estes dados são comparáveis aos citados por Tsukada et al., 1984, em Elorza et al., 1993 que determinaram o coeficiente de partição de 5-fluorouracil em sistemas 1-octanol/tampão citrato de 0,15 e 0,20 a 20 e 30°C respectivamente.

Devido às características estruturais da molécula de 5-FU e ao seu pKa de 8,04 (Krogsgaard et al., 1996), uma técnica de encapsulamento promissora seria a baseada na incorporação ativa. Seu encapsulamento em lipossomas por injeção de etanol poderia ser também recomendável, entretanto, sua incorporação passiva no cerne aquoso da vesícula poderia ser limitada pela baixa solubilidade da droga na solução de hidratação.

Como no processo de encapsulamento ativo submete-se o sistema contendo a droga e os lipossomas à elevação de temperatura, a droga livre foi submetida às temperaturas requeridas durante os ensaios de encapsulamento a fim de se observar sua estabilidade térmica em termos da variação de absorbância de uma solução de 5-FU em hepes a uma concentração de 0,4 mM de droga. A absorbância medida após o tratamento térmico foi comparada à absorbância da droga na mesma concentração sem passar por nenhum tratamento, ou seja, à temperatura ambiente. A Tabela 5.5 mostra os resultados obtidos.

Os dados apresentados mostram que os tratamentos térmicos causam um aumento na absorbância medida. Nota-se que este aumento é verificado mesmo para a temperatura de 37°C, ou seja, em condições onde se aplica a droga *in vivo*. Assim, para o cálculo da quantidade de droga encapsulada, as absorbâncias devem ser adequadamente corrigidas. Para cada temperatura e tempo de incubação das vesículas no encapsulamento ativo, o valor de absorbância medido foi corrigido de acordo com a percentagem de variação observada.

Tabela 5.5 - Alterações na absorbância de solução de 5-FU a 0,4 mM por exposição a diferentes temperaturas por distintos períodos, iguais aos tempos de incubação da solução de droga com os lipossomas vazios por ocasião do encapsulamento ativo.

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)	Absorbância a 254 nm	Variação da absorbância (%)
Ambiente	---	0,1550	---
37	10	0,1862	20,1
37	60	0,1845	19,0
60	10	0,1825	17,7
60	60	0,1804	16,4
48	35	0,2178	40,5

5.3.2. Encapsulamento ativo de 5-FU em lipossomas extrusados

Foi testado primeiramente o encapsulamento ativo de 5-FU em lipossomas extrudados compostos de DPPC/Col usando-se um planejamento fatorial de experimentos. As razões molares iniciais 5-FU/lipídio foram de 0,4; 1,2 e 2. Estes valores foram estabelecidos através de análise dos resultados obtidos por Mayer et al. (1990). Os intervalos de tempo de incubação foram de 10, 35 e 60 minutos e as temperaturas de incubação de 37, 48 e 60°C.

As amostras, após a cromatografia de permeação em gel, apresentaram as concentrações de lipídios e os diâmetros médios listados na Tabela 5.6. A variação da concentração lipídica deve-se à mistura de números distintos de frações coletadas na cromatografia. A quantificação do 5-FU encapsulado nas vesículas foi realizada utilizando uma microemulsão para o rompimento das vesículas. As concentrações de droga foram calculadas considerando-se a correção das absorbâncias medidas devido aos efeitos de tempo e temperatura de incubação droga/lipossomas. Os resultados obtidos indicam que,

para todas as amostras, a concentração final de 5-FU foi menor que o limite mínimo de detecção de 0,1 mM.

A partir de tais resultados observa-se que o método de encapsulamento ativo não se mostrou eficiente para a incorporação de 5-fluorouracil em lipossomas. Esta técnica proporciona ótimos índices de encapsulamento de acordo com Mayer et al. (1990), porém a eficiência de encapsulamento varia consideravelmente entre diferentes drogas (Madden et al., 1990).

Utilizando o programa fatorial desenvolvido por Bruns (1996), foram calculados os efeitos de interação de cada um dos fatores estudados (tempo, temperatura e a razão inicial droga/lipídio) no diâmetro médio das vesículas. Os efeitos calculados estão apresentados no Quadro 5.4.

Quadro 5.4 – Efeitos calculados do planejamento experimental sobre o diâmetro médio das vesículas obtidas no encapsulamento ativo de 5-fluorouracil.

Efeitos principais

Efeito do tempo = 78,25

Efeito da temperatura = 78,25

Efeito da razão inicial D/L = 104,25

Efeitos de interação entre dois fatores

Efeito de interação entre tempo e temperatura = 104,25

Efeito de interação entre tempo e razão inicial D/L = 105,75

Efeito de interação entre temperatura e razão inicial D/L = 102,75

Efeito de interação entre os três fatores = 76,75

Como se pode observar, todos os fatores exercem influência significativa sobre o tamanho dos lipossomas obtidos. Conforme mencionado anteriormente, a temperatura de

transição do DPPC é de 41°C, mas a transição de fases de gel para líquido cristalino de um lipídio já pode ser iniciada em temperaturas inferiores a esta, nas quais já existe alteração no empacotamento das moléculas de fosfolipídio (New, 1990). Com isso, mesmo a temperatura mais baixa empregada nos ensaios pelos distintos intervalos de tempo poderia induzir a ocorrência de alterações estruturais nas vesículas durante o encapsulamento, daí a obtenção de lipossomas de tamanhos superiores a 100 nm.

Tabela 5.6 - Concentração final de lipídios e diâmetros médios das vesículas obtidas por encapsulamento ativo de 5-FU. Concentração inicial de lipídios de 1,0 mM.

Ensaio	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	D/L inicial	Concentração de lipídios (mM)	Diâmetro médio (nm)
1	10	37	0,4	0,47	184
2	60	37	0,4	0,66	129
3	10	60	0,4	0,73	132
4	60	60	0,4	0,37	132
5	10	37	2,0	0,55	130
6	60	37	2,0	0,50	133
7	10	60	2,0	0,63	130
8	60	60	2,0	0,56	495
9	48,5	35	1,2	0,51	224
10	48,5	35	1,2	0,65	220

Com relação à razão molar inicial droga/lipídio, deve-se destacar que mesmo o menor valor empregado poderia ser considerado como relativamente elevado, podendo afetar o empacotamento dos lipídios na bicamada se a droga lá se acumulasse.

Propriedades físicas da droga como seu pKa são de grande importância para o sucesso do encapsulamento ativo. Como mencionado anteriormente, o 5-FU tem pKa igual a 8,04. Este foi um dado que a apontou como candidata em potencial para o uso desta técnica, pois desta forma uma fração das moléculas poderia estar neutra a pH 7,5

(pH externo às vesículas), podendo então permear a membrana lipídica dos lipossomas e, então, acumular-se no seu interior, uma vez que no cerne aquoso, apresentaria carga positiva.

Na Figura 5.15 pode ser observada a superfície de resposta do planejamento de experimentos para a incorporação de 5-fluorouracil em lipossomas por encapsulamento ativo. Como se verifica nas superfícies de resposta, quanto maiores forem os valores de temperatura, tempo e razão inicial droga/lipídio, maiores serão as vesículas obtidas.

Outro fator importante é que a droga, quando incubada com as vesículas, pode levar à diminuição do gradiente de pH previamente estabelecido (Madden et al., 1990), o que levaria ao não encapsulamento da droga ou ao fato de que uma pequena quantidade poderia ser encapsulada e num curto período de tempo ser liberada das vesículas.

O coeficiente de partição é ainda outro fator a ser considerado, pois baixos valores indicam uma dificuldade da droga em atravessar membranas biológicas. Porém, baixos coeficientes de partição isoladamente não podem explicar o encapsulamento ativo ou não de drogas em lipossomas (Madden et al, 1990).

Segundo mencionado por Elorza et al.(1993), em pH 7,4 a forma neutra da 5-fluorouracil apresenta atividade superficial, com uma concentração micelar crítica estimada de 8×10^{-10} M. Assim, se uma fração desta droga efetivamente se apresentasse organizada em micelas, sua permeação através das bicamadas lipídicas seria mais difícil pelo aumento da massa molecular da espécie na forma agregada, o que se traduziria em uma limitação à transferência de massa. Em consequência, a obtenção de uma baixa incorporação da droga.

Embora a altas temperaturas a bicamada estivesse mais fluida e, portanto, mais permeável, as interações hidrofóbicas que mantêm as moléculas de 5-fluorouracil agregadas em micelas poderiam estar sendo favorecidas, impedindo sua incorporação pelas vesículas. A combinação de alguns destes fatores ou até mesmo a ocorrência de interações entre 5-FU e os lipossomas podem ter conduzido aos resultados obtidos. Desta forma, outras técnicas de encapsulamento da droga foram empregadas para sua incorporação mais eficiente em lipossomas, como de injeção de etanol utilizando solução aquosa de 5-FU e de incorporação passiva no cerne aquoso da vesícula, empregando soluções da droga em tampão Tris-HCl.

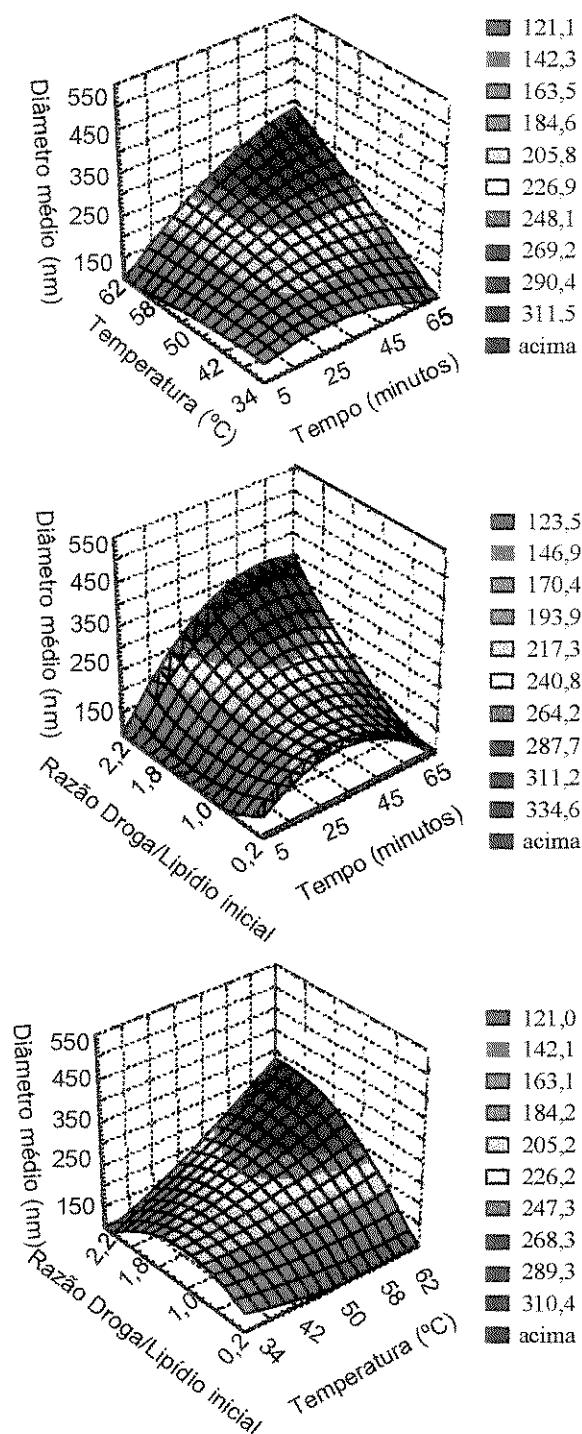


Figura 5.15 – Superfície de resposta do planejamento de experimentos do tipo 2^3 cujos fatores são: razão inicial droga/lípido, tempo e temperatura de incubação da solução de droga e lipossomas. Como resposta analisada tem-se o diâmetro médio das vesículas.

5.3.3. Encapsulamento passivo de 5-FU em lipossomas

A tentativa de aumento da eficiência de encapsulamento e de captura da solução de 5-fluorouracil em lipossomas foi efetuada explorando-se três diferentes enfoques: a incorporação da droga durante a formação das vesículas por injeção de etanol, por hidratação do filme lipídico seco e por evaporação de fase orgânica em presença de solução aquosa da droga.

O método de injeção de etanol com a injeção dos lipídios na solução aquosa em tampão Tris-HCl, apesar da alta razão molar inicial droga/lipídio (igual a 25), praticamente não levou ao encapsulamento da droga (eficiência de encapsulamento de 0,4 %). Esta baixa eficiência pode ser devido ao fato da droga ter sido solubilizada na fase aquosa, o que leva a baixas eficiências de encapsulamento através desta técnica. Contudo, a concentração interna de droga para esta amostra é estimada em 24 mM, ou seja, 48% da droga inicialmente disponível em solução foi capturada durante a formação das vesículas. O diâmetro médio das vesículas obtidas foi de 253 nm.

A Tabela 5.7 apresenta os resultados obtidos para as amostras encapsulando 5-FU pelo método de hidratação do filme, seguido de extrusão, com incorporação passiva da droga.

A eficiência de captura é definida como a razão percentual entre a concentração de droga no cerne aquoso da vesícula e a concentração de droga na solução inicial.

Como pode ser observado, o aumento da concentração de droga não levou ao aumento do diâmetro das vesículas, não se verificando uma relação entre esta variável e os diâmetros obtidos. Verifica-se também que as eficiências de encapsulamento e de captura da solução de droga não sofreram grandes variações com o aumento da concentração, exceto para a concentração superior que apresentou a menor eficiência de encapsulamento. Apesar da baixa eficiência de encapsulamento da droga, sua concentração no interior das vesículas apresentou valores razoáveis, com uma tendência à estabilização talvez por saturação. De acordo com Ozer e Talsma (1989), a dose de 5-fluorouracil para fins quimioterapêuticos é de 20-30 mg/Kg/dia por cinco dias, quando injetada por via intravenosa.

Tabela 5.7- Caracterização dos lipossomas encapsulando 5-FU solubilizada em Tris-HCl a pH 7,4 com 140 mM de NaCl preparados por incorporação passiva durante o processo de hidratação do filme lipídico. Concentração lipídica inicial: 7,5 mM.

C _{inicial} de 5-FU (mM)	C _{final} de lipídios (mM)	C _{final} de 5-FU (μM)	Diâmetro médio (nm)	Eficiência de encapsulamento (%)	Concentração interna de droga (mM)	Eficiência de captura (%)
10	4,32	70,00	155,20	1,22	6,3	63
20	4,87	149,00	176,20	1,15	10,6	53
30	4,97	246,00	160,30	1,24	18,8	63
50	5,94	237,00	151,90	0,60	16,0	32

C - concentração

A fim de alcançar resultados melhores que os obtidos com as técnicas utilizadas, o encapsulamento da droga foi testado também pela técnica de evaporação em fase reversa.

A implementação da técnica de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa foi uma etapa que exigiu bastante esforço, além de demandar tempo prolongado em laboratório. Como descrito anteriormente, este método é constituído de várias etapas, e diversos fatores devem ser selecionados, dentre eles: tamanho do recipiente empregado, ajuste do vácuo para que não houvesse arraste da amostra, períodos de evaporação nas etapas de formação da emulsão em banho de ultrassom, eliminação dos solventes orgânicos, tempo de agitação sob vórtex e temperatura de evaporação. Além destes fatores, devem ser consideradas também a determinação da concentração lipídica, a razão volumétrica entre a fase aquosa e orgânica e a razão molar inicial droga/lipídio. Nos ensaios iniciais, os lipossomas não foram submetidos à etapa de extrusão. Contudo, não foi possível a obtenção de vesículas estáveis, sendo observada a precipitação e formação de agregados quando a suspensão era mantida em repouso. Outro problema associado a este à não extrusão foi a remoção da droga livre que não pôde ser realizada através de cromatografia de permeação em gel, devido à retenção das vesículas com grandes diâmetros no topo da coluna. A remoção da droga por diálise tem o inconveniente de poder provocar a liberação prematura

da droga, uma vez que grandes volumes de solução tampão são empregados no processo (400 mL para 2 mL de amostra), que é lento, 48 horas.

Isto poderia atuar como força motriz, em termos de maiores gradientes de concentração entre a droga no compartimento aquoso interno e externo às vesículas, resultando na redução da eficiência de encapsulamento.

Uma vez estabelecidas faixas para as variáveis físicas mencionadas anteriormente, as vesículas foram submetidas à extrusão, facilitando então, o processo de remoção da droga livre por cromatografia de permeação em gel, além da obtenção de suspensões de lipossomas bastante estáveis sob o ponto de vista de agregação.

Três preparações obtidas por esta técnica variando-se a força iônica da fase aquosa, a razão fase aquosa/fase orgânica, a concentração inicial de lipídios e a razão molar inicial droga/lipídio estão apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Preparações de lipossomas obtidos pela técnica de evaporação em fase reversa. Fase aquosa: tampão Tris-HCl a 10 mM e pH 7,4 com 140 mM NaCl e sem a adição de NaCl.

Fase aquosa	*C _{inicial} de 5-FU (mM)	*C _{inicial} de lipídios (mM)	Razão fase aquosa/fase orgânica	Diâmetro médio (nm)	C _{interna} 5-FU (mM)	Efic. de encaps. (%)	Efic. de captura (%)
140 mM de NaCl	4,54	3,0	1:10	**2000	1,2	2,7	2,4
Sem NaCl	12,5	1,5	1:3	137	66,6	1,8	135,2
Sem NaCl	3,75	1,5	1:3	137	63,2	5,7	400,2

* Concentração inicial de droga ou lipídio no volume total (fase aquosa + fase orgânica)

** Lipossomas não extrudados

Nos dois primeiros ensaios, a concentração da droga na fase aquosa foi de 50 mM, e no último ensaio, de 15 mM.

Utilizando-se a fase aquosa com alta força iônica, a eficiência de encapsulamento da droga foi de 2,7%. Este valor, maior que os obtidos nos ensaios anteriores, ainda pode ser considerado como relativamente pequeno para esta técnica, possivelmente devido à elevada concentração de sal presente no tampão o que favoreceria a formação de micelas de 5-FU, dificultando o encapsulamento da droga pelos lipossomas. De acordo com Szoka e Papahadjopoulos (1980) a eficiência de encapsulamento pode alcançar até 65% se a fase aquosa apresentar baixa força iônica (em torno de 10 mM de NaCl), e a incorporação da droga pode diminuir com o aumento da força iônica da fase aquosa. As amostras preparadas com tampão sem a adição de NaCl e com razão fase aquosa/orgânica igual a 1:3 (v/v) para as concentrações de droga de 50 e 15 mM apresentaram praticamente a mesma concentração final de droga encapsulada. Conseqüentemente, a eficiência de encapsulamento utilizando a menor concentração inicial de droga foi superior. Eficiências de captura acima de 100 % podem ter sido obtidas devido à capacidade da droga de ser adsorvida na interface lipídio/meio aquoso externo devido à sua atividade superficial.

As vesículas não extrudadas apresentaram diâmetro médio em torno de 2.000 nm. Este valor é superior ao esperado, de 500 nm, de acordo com New (1990), porém, Taylor et al. (1990) obtiveram lipossomas, preparados também pelo método de evaporação em fase reversa, constituídos de DPPC e colesterol (1:1) com diâmetro médio de 3400 nm. Diversos fatores podem ser responsáveis pelo tamanho das vesículas obtidas por este método. Dams et al. (1999) estudaram a influência de variáveis como tempo de sonicação para homogeneização da emulsão, tempo de evaporação do solvente em evaporador rotatório e tempo de agitação em vórtex nos tamanhos das vesículas obtidas. Estes pesquisadores verificaram que todos estes fatores afetam o diâmetro das vesículas obtidas. O tempo de sonicação foi estudado num intervalo de tempo de 15 minutos. Observou-se que nos primeiros 3 minutos o diâmetro das vesículas aumentou, atingindo o valor máximo de 600 nm. Este valor manteve-se constante por dois minutos e, após este período, sofreu uma diminuição significativa (300 nm). A influência da evaporação do solvente no tamanho das vesículas foi avaliada no intervalo de 10 a 30 minutos. O aumento do tamanho das vesículas foi diretamente proporcional ao tempo empregado, sendo obtidas vesículas de 1000 nm ou mais para 30 minutos de evaporação. O tempo de agitação em vórtex por 15 a 60 segundos

foi avaliado. Aumento gradual dos diâmetros foi observado com maiores tempos de agitação. E ainda, foi observada a formação de vesículas do tipo multilamelares após tempo prolongado de agitação em vórtex.

Outra razão para as variações no diâmetro das vesículas e na baixa eficiência de incorporação da droga seria a emulsificação incompleta durante a sonicação ou a remoção mais rápida do éter dietílico que do clorofórmio, que resultaria em alterações estruturais na bicamada lipídica (Elorza et al., 1993), e a própria presença do sal em alta concentração pode ser associada à variação no tamanho das vesículas obtidas. Devido a tais fatores, foram testadas as formulações com reduzida força iônica, razão fase aquosa/orgânica de 1:3, menor concentração de lipídio e extrusão das vesículas a fim de aumentar a eficiência de encapsulamento e obter preparações mais estáveis.

A extrusão das vesículas através de membranas de policarbonato foi também efetuada para que outras rotas além da transdérmica, pudessem ser utilizadas na administração da droga encapsulada em lipossomas. As partículas obtidas apresentaram diâmetros médios superiores aos poros da membrana de policarbonato, 137 nm, para ambas as concentrações de droga fato este que pode estar relacionado à composição dos lipossomas. Szoka e colaboradores (1980) também observaram diâmetros de 140 nm em vesículas compostas por fosfatidilcolina e colesterol (1:1), enquanto que os lipossomas compostos de fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina (1:4) apresentaram diâmetro de 80 nm, ambos extrudados em membrana de policarbonato de poros de 100 nm.

Estes mesmos autores verificaram também que a eficiência de encapsulamento do composto ativo, citosina β -D-arabinosídeo foi reduzida de 48 para 12% após a etapa de extrusão de lipossomas constituídos de fosfatidilcolina e colesterol, o que poderia estar associado às reduzidas eficiências de encapsulamento obtidas de 5-fluorouracil.

5.3.4. Estabilidade das vesículas contendo 5-fluorouracil preparadas pelo método de evaporação em fase reversa

Com o objetivo de verificar o efeito líquido das etapas de preparação de lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa na estabilidade da droga, o procedimento de

preparação das vesículas foi aplicado em uma solução de droga livre. As etapas equivalentes à evaporação do solvente orgânico em rotavapor e à extrusão das vesículas multilamelares foram realizadas a 65°C, por um período de 75 minutos. A cada 15 minutos retirou-se uma alíquota da solução, e monitorou-se sua absorbância a 254 nm. O ensaio colorimétrico para a determinação de 5-fluorouracil não degradada foi realizado para a solução de droga submetida ao processo após 60 e 75 minutos a 65°C e para uma solução de droga sem passar por tal tratamento.

Não foi observado um aumento na absorbância da solução de droga em função do tempo de imersão no banho. O ensaio colorimétrico, como pode ser observado na Tabela 5.9, revelou a mesma concentração de droga ativa nas soluções não tratada e tratadas. Desta forma, assegurou-se que a droga encapsulada nos lipossomas preparados pela técnica de evaporação em fase reversa encontrava-se na sua forma ativa.

Tabela 5.9 - Determinação da atividade de 5-fluorouracil após submetido ao tratamento térmico. Temperatura de 65°C e concentração de droga igual a 0,5 mM.

Tempo de tratamento (min)	Absorbância a 555 nm
Sem tratamento	0,135
60	0,132
75	0,130

Com estes resultados observa-se que o processo de degradação da droga sofre influência do meio empregado. Neste caso, o meio era rico em solvente orgânico e não foi observada a degradação da droga em função de sua exposição à temperatura de 65°C por tempos de 60 e 75 minutos. Quando em excesso de água, foi observada a degradação da 5-fluorouracil mesmo em temperaturas inferiores, de acordo com resultados apresentados anteriormente por ocasião do encapsulamento ativo da droga.

5.3.4.1. Estabilidade na presença do tensoativo $C_{12}E_5$

A estabilidade das vesículas preparadas pelo método de evaporação em fase reversa encapsulando ou não a droga, suspensas em tampão hepes a pH 7,4, foi avaliada na presença do tensoativo $C_{12}E_5$, conforme descrito na seção de materiais e métodos. O perfil dos lipossomas vazios (com tampão Tris-HCl no interior) e dos lipossomas encapsulando 5-fluorouracil, ambos suspensos em tampão hepes estão apresentados na Figura 5.16. Com a adição da droga ocorre uma certa estabilização das vesículas em relação aos lipossomas apenas com o tampão encapsulado, não se verificando aumento apreciável da absorbância até a concentração de tensoativo de 90%. Após este valor de concentração, observa-se um pico de absorbância característico da solubilização das vesículas e com formação de micelas mistas de lipídios e tensoativo.

De acordo com Elorza et al. (1993), o 5-fluorouracil apresenta uma tendência em permanecer adsorvido na interface lipídio/fase aquosa externa devido à atividade superficial apresentada por esta substância. Desta forma, as moléculas de droga poderiam estar estabilizando a bicamada lipídica. Destaca-se que a presença da droga livre não afeta o comportamento de amostras consistindo apenas do tensoativo.

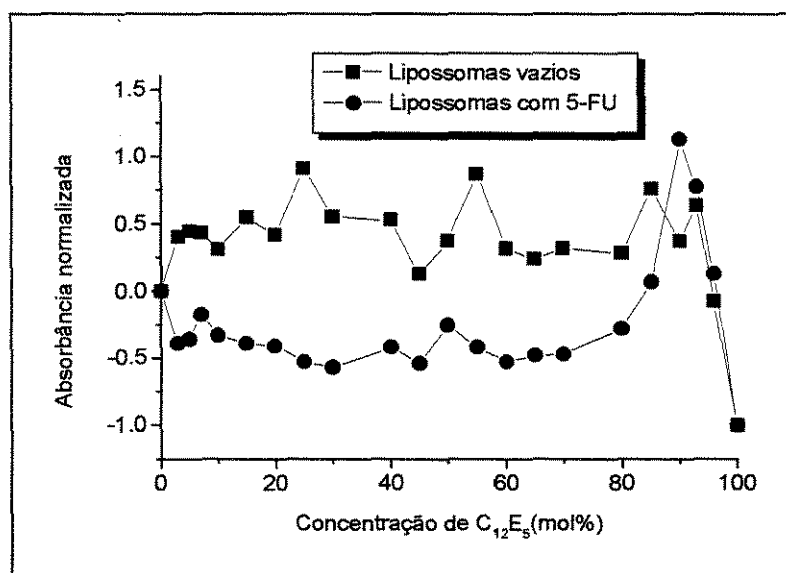


Figura 5.16- Perfil de estabilidade dos lipossomas vazios (com tampão Tris-HCl no interior) e com 5-fluorouracil encapsulado a 0,1 mM. Concentração de lipídio igual a 1 mM.

5.3.4.2. Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem das vesículas encapsulando 5-fluorouracil com 5,7% de eficiência foi avaliada quanto ao diâmetro médio e à capacidade de reter o material encapsulado no seu interior. Como pode ser observado na Figura 5.17, a variação de diâmetro foi pequena durante os 28 dias de monitoramento, atingindo máximos de 22 e 6% para os lipossomas vazios e com 5-FU respectivamente, o que permite concluir que não houve agregação ou fusão das vesículas, podendo o sistema ser considerado estável do ponto de vista físico.

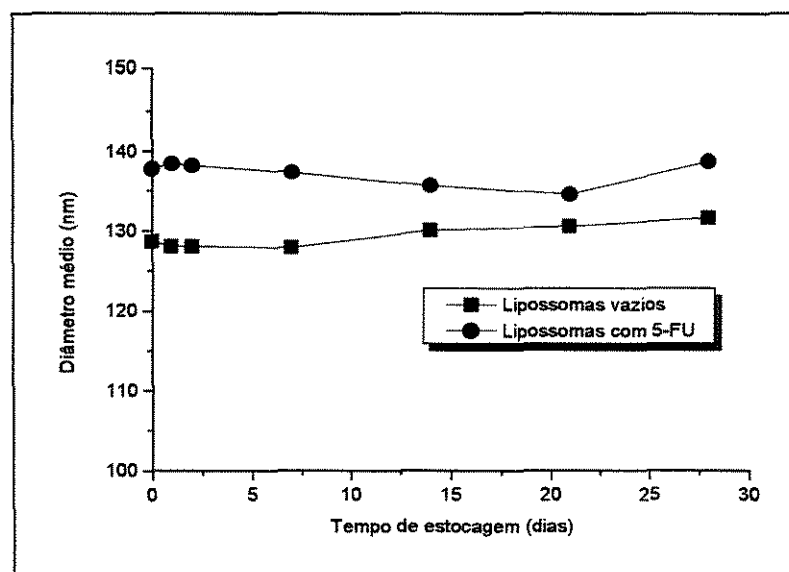


Figura 5.17- Variação do diâmetro dos lipossomas vazios e encapsulando 5-fluorouracil em função do tempo de estocagem sob refrigeração à 4°C. Lipossomas vazios: concentração lipídica de 6,0 mM e diâmetro médio inicial de 128,6 nm. Lipossomas com 5-FU: concentração de lipídios de 6,0 mM e diâmetro médio inicial de 137,8 nm.

Quanto à capacidade de retenção da droga, não foi verificado um comportamento similar ao do diâmetro das vesículas. Conforme pode ser observado na Figura 5.18, após 48 horas, praticamente 30% da droga havia sido liberada das vesículas, após duas semanas mais

de 50% do material encapsulado já havia sido liberado e ao final de três semanas praticamente não havia 5-fluorouracil no interior dos lipossomas. De maneira equivalente, Elorza et al. (1993) observaram a liberação de cerca de 20 a 30% de 5-fluorouracil encapsulada em lipossomas compostos por DSPC em apenas uma hora a 37°C.

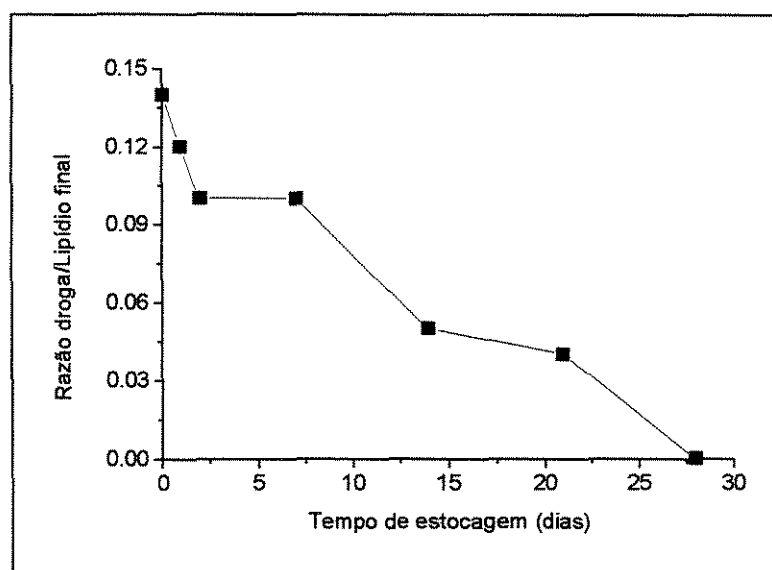


Figura 5.18- Liberação do 5-Fluorouracil encapsulado nos lipossomas em função do tempo de estocagem sob refrigeração à 4°C.

De acordo com Ozer e Talsma (1989), que estudaram a estabilidade de lipossomas também encapsulando 5-fluorouracil, o comportamento destes sistemas depende da composição do meio aquoso e da bicamada, da interação entre a droga e a bicamada lipídica e das condições de estocagem. Os autores verificaram que o principal parâmetro responsável pela retenção da droga nas vesículas foi a composição lipídica. Lipossomas compostos de lecitina de soja, colesterol hemissuccinato e colesterol (10:1:4, em base molar) estocados sob refrigeração tiveram 84 % da droga encapsulada liberada do seu interior em duas semanas. Já os lipossomas compostos por DPPC, colesterol hemissuccinato e colesterol (10:1:4), composição similar, mas não idêntica, à das vesículas preparadas neste trabalho, apresentaram liberação da droga até 30 %, atingindo este patamar em 4 semanas. Tal

comportamento poderia ser atribuído à presença do colesteril hemissuccinato, que confere uma carga líquida negativa para os lipossomas.

Outro fator relevante é que quando a estocagem é conduzida em condições iso-osmóticas e isotônicas, a liberação da droga pode ser reduzida. Para tal, a concentração de sais no tampão, por exemplo, deveria ser aumentada, uma vez que a concentração de droga no interior das vesículas é estimada em cerca de 60 mM, enquanto que a do tampão Tris-HCl foi de 10mM.

De acordo com a estabilidade de estocagem destes lipossomas pode-se dizer que os mesmos só poderiam ser administrados imediatamente após o seu preparo. Isto porque no período de 24 horas aproximadamente 15% da droga encapsulada já seria liberada das vesículas.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi a obtenção de preparações farmacêuticas de lipossomas para administração tópica, as vesículas foram incorporadas em gel utilizado comercialmente como veículo de substâncias ativas para finalidades cosmeceúticas. A incorporação destes lipossomas no veículo mencionado foi realizada apenas em caráter preliminar. Foi utilizado um gel de Carbopol 940 a 0,8% e foram incorporados lipossomas com concentração lipídica de 2,0 mM e de droga igual a 0,27 mM, em uma proporção de 60% em massa de dispersão de lipossomas para 40% de gel.

Observou-se visualmente se os lipossomas promoveriam uma desestabilização do gel no decorrer de um mês. Não foi verificada nenhuma alteração na mistura neste período. Contudo, a verificação da estabilidade dos lipossomas quando incorporados neste veículo deve ser realizada empregando técnicas capazes de identificar a presença ou não de lipossomas em um meio como este. Tais ensaios demandariam longo tempo, requerendo, inclusive, o desenvolvimento de metodologias de caracterização distintas das utilizadas na realização deste trabalho, como a microscopia eletrônica de transmissão, o que estaria além do escopo deste trabalho.

Desta forma, observa-se que o método de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa que resultou nas amostras com maior eficiência de encapsulamento de 5-FU, apresenta diversas variáveis que podem ainda ser otimizadas para a obtenção de sistemas

com maiores eficiências de encapsulamento e capacidade de retenção da droga, que resultariam em aplicabilidade mais ampla na área médico-farmacêutica.

VI- Conclusões e Sugestões

6.1. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com a preparação e caracterização de lipossomas encapsulando Ácido azelaico, 5-Fluorouracil e Bleomicina pode-se concluir que:

1. O ensaio de partição de ácido azelaico no sistema 1-octanol/hepes mostrou uma tendência de acúmulo desta droga na bicamada lipídica. Somando-se tal observação ao fato deste composto apresentar boa solubilidade em etanol, a técnica injeção de etanol foi considerada como indicada para seu encapsulamento em lipossomas.
2. O efeito do diâmetro da agulha foi o fator mais significativo em relação aos diâmetros das vesículas obtidas pelo método de injeção de etanol em presença de ácido azelaico, sendo que as amostras preparadas com a agulha de maior diâmetro apresentaram faixas de distribuição de tamanhos mais amplas. As vesículas apresentaram considerável aumento de diâmetro após 30 dias de estocagem, indicando limitada estabilidade das amostras.
3. O método de incorporação ativa da bleomicina levou à eficiência de encapsulamento máxima de 2,8%, valor este considerado como baixo para esta metodologia.
4. A temperatura de incubação bleomicina/lipossomas foi a variável que resultou em maior influência no tamanho das vesículas obtidas por incorporação ativa. Apesar das vesículas terem sido submetidas à extrusão em membranas de poros de 100 nm, os diâmetros apresentaram-se significativamente superiores a este valor, possivelmente devido à incubação da droga com os lipossomas.
5. O método de injeção de etanol praticamente não levou ao encapsulamento de bleomicina em lipossomas, resultando na formação de populações de vesículas polidispersas com relação aos diâmetros.
6. A incorporação de 5-FU em lipossomas pelos métodos de encapsulamento ativo e de injeção de etanol, com a droga solubilizada na fase aquosa, não conduziram a eficiências de encapsulamento apreciáveis.

7. A incorporação passiva de 5-FU durante a hidratação das bicamadas lipídicas resultou em eficiências de encapsulamento de até 1,2%, valor este aceitável para esta metodologia, resultando em concentração de droga de até 18,8 mM no cerne aquoso das vesículas com diâmetros médios de 155 nm.
8. A técnica de evaporação em fase reversa levou à maior eficiência de encapsulamento de 5-FU (5,7%) quando comparada às demais técnicas testadas, embora este valor seja baixo em comparação aos citados na literatura. O diâmetro médio final das vesículas teve valor bastante elevado (2000 nm), implicando na necessidade de realização de extrusão das vesículas, que apresentaram então diâmetros médios de 137 nm.
9. Os lipossomas encapsulando 5-fluorouracil preparados pelo método de evaporação em fase reversa apresentaram boa estabilidade de estocagem sob o ponto de vista de agregação ou fusão das vesículas, não se verificando alterações substanciais no diâmetro das vesículas durante 28 dias de estocagem sob refrigeração a 4 °C. Quanto à capacidade de retenção da droga, observou-se sua acentuada liberação durante todo o período de estocagem, o que recomendaria, para aplicações terapêuticas, sua administração imediatamente após o preparo.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

De acordo com os resultados obtidos neste estudo do encapsulamento de ácido azelaico, 5-fluorouracil e bleomicina em lipossomas, seriam interessantes os seguintes trabalhos futuros:

1. Dar continuidade à incorporação do ácido azelaico em lipossomas, uma vez que os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se promissores. Enfocar principalmente a caracterização das vesículas em termos de eficiência de encapsulamento, que não pôde ser concluída neste trabalho devido a problemas mecânicos no equipamento de detecção.
2. Avaliar o processo de incorporação passiva de bleomicina por evaporação em fase reversa.

-
3. Otimizar a técnica de encapsulamento de 5-fluorouracil por evaporação em fase reversa, que apresentou melhores resultados.
 4. Avaliar outras composições lipídicas para a incorporação de 5-fluorouracil, uma vez que este é um fator importante em relação à estabilidade das vesículas.
 5. Quanto à estabilidade dos lipossomas encapsulando 5-fluorouracil, seria interessante avaliar sua estocagem na forma liofilizada, pois o meio aquoso em excesso associado ao processo de diálise pode implicar no aumento da força motriz para a saída da droga do interior das vesículas.
 6. Avaliar a factibilidade do uso de veículos capazes de incorporar as vesículas visando a administração tópica dos lipossomas empregando técnicas mais sofisticadas, como a microscopia eletrônica de transmissão, para verificar a integridade ou não das vesículas quando incorporadas nas vesículas.
 7. Incorporação das drogas pelo método de desidratação e reidratação.

VII- Referências Bibliográficas

1. AHFS (American Hospital Formulary Service) - *Drug Information* - American Society of Hospital Pharmacists, Inc., Bethesda, 1992.
2. Altria, D. K., "Highly efficient and Selective Separations of a Wide Range of Analytes Obtained by an Optimised Microemulsion Electrokinetic Chromatography Method", *Chromatographia*, 1999, vol. 49, pp. 457-464.
3. Amer M. M., Hassan S. S. M., Abd El-Fatah S. A. e El-Kosasy A. M., "Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Determination of Fluorouracil in the Presence of its Degradation Products", *Journal of Pharm. Pharmacol.*, 1998, vol. 50, pp. 133-138.
4. Asbill S. C. e Michniak B. B., Percutaneous enhancers: local versus transdermal activity, *PSTT*, 2000, vol. 3, pp. 36-41.
5. Barenholz, Y. e Crommelin, D. A., Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms, in: Swarbrick, J. e Boylan, J. C. - *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1994, vol. 9, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-39.
6. Batzri, S. e Korn, E. D., "Single Bilayer Liposomes Prepared Without Sonication", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, vol. 298, pp. 1015-1019.
7. Bruns, E. R., Scarminio, S. I. e Neto, B.B. - *Planejamento e Otimização de Experimentos* - 2ª Edição - Editora da Unicamp - 1996.
8. Carter K. S. e Crooke S. T., "Bleomycin: Current Status and New Developments", London: Academic Press, 1978.
9. Cevc G., "Rationale for the Production and Dermal Application of Lipid Vesicles", in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, 1992, pp. 82-90.
10. Cevc G. e Blume G., "Lipid Vesicles Penetrate into Intact Skin owing to the Transdermal Osmotic Gradients and Hydration Force", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1104, pp. 226-232.
11. Chen Jr., PP. S.; Toribara, T. Y. e Warner, H., "Microdetermination of Phosphorus", *Analytical Chemistry*, 1956, vol. 28, pp. 1756-1758.

12. Chon, A. e Cullis, P. R., *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, vol. 6, pp. 698-708.
13. Crommelin, D. J. A. e Schreier, H., "Liposomes" in Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, pp. 73-191, 1994.
14. Dams R., Lambert W. E., Comhaire F. e De Leenheer P., " Production and Characterization of Sulforrhodamine B Containing Large Unilamellar Vesicles Labeled with Atrazine", *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 399, pp. 185-191.
15. Egbaria, K. e Weiner, N., " Topical Delivery of Lipossomally Encapsulated Ingredients and Evaluated by In Vitro Diffusional Studies", in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, 1992, pp. 172-184.
16. Elorza B., Elorza M. A., Frutos G. e Chantres J. R., " Characterization of 5-Fluorouracil Loaded Liposomes Prepared by Reverse-phase Evaporation or Freezing-thawing Extrusion Methods: Study of Drug Release", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1153, pp. 135-142.
17. Fitton A., Goa K. L., " Azelaic Acid. A review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Acne and Hyperpigmentary Skin Disorder", *Drugs*, 1991, vol. 41, pp. 780-98.
18. Gaines, Jr., G. L. - *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces* - John Wiley e Sons, Inc., 1966, pp. 253.
19. Goodman. L. S. - *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* – 1996, Editora Mc Graw- Hill, New York.
20. Harry L. A., Odom R. B. e James W. D. - *Doenças da Pele de Andrews: Dermatologia Clínica*, 8ª ed. São Paulo: Editora Mande Ltda, 1994.
21. Israelachvili, J. e Mitchell, D. J., " A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, pp. 13-19.
22. Jarugula, R. V. e Boudinot, D. F., " High-Performance liquid chromatography Determination of 5- Fluorouracil and its Prodrugs, Tegafur and 4-Deoxy-5-fluorouracil, in Rat Plasma", *Journal of Chromatography B*, 1996, pp. 199-203.
23. Justo, O. R. – *Preparação e Caracterização de Lipossomas para a Administração de Compostos Terapêuticos Utilizados na Terapia da Tuberculose* – Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1999.

-
24. Kirjavainen M. Urtti A., Jääskeläinen I., Suhonen T. M., Paronen P., Valjakka-Koskela R., Kiesvaara J. e Mönkkönen J., “ Intraction of Liposomes with human Skin in Vitro: The Influence of Lipid Composition and Structure”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, pp. 179-189.
 25. Korting H. C., “ Increased Activity and Tolerability of a Conventional Glucocorticoid in a Liposomas Form”, in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, 1992, pp. 91-100.
 26. Kriftner, R. W., “ Liposome Production: The Ethanol Injection Technique and the Development of the First Approved Liposome Dermatic”, in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, 1992, pp. 91-100.
 27. Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T. e Madsen, U. - *Drug Design and Development* - 2^a ed., Copenhagen, Denmark: Harwood Academic publishers, 1996.
 28. Lasch, J.; Hoffman, J.; Omelyanenko, W. G.; Klivanov, A. A.; torchillin, V. P.; Binder, H. e Gawrisch, K., “ Interaction of Triton X-100 and Octy Glucoside with Liposomal Membranes at Sblytic and Lytic Concentrations, Spectroscopic Studies”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, vol. 1022, pp. 171-180.
 29. Lasic D. D., “The Mechanism of Vesicle Formation”, *Biochem. J.*, 1988, pp. 1-11.
 30. Lasic, D. D. - *Liposomes* - American Scientist, vol. 80, pp. 20-31, 1992.
 31. Lasic, D. D. e Martin, F. – *Stealth Liposomes* – CRC Press Inc., Boca Raton, 1995.
 32. Lasic, D. D., “ Novel Applications of Liposomes”, *TIBTECH*, 1998, vol. 16, pp. 307-321.
 33. Lieb, L. M.; Ramachandran, C. e Weiner, N., “ Lipossomally Encapsulated Active ingredients Penetrate Through the Fillicle”, in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 200-205, 1992.
 34. Lima, D. R., Manual de Farmacologia Clínica, terapêutica e toxicologia, pp. 845, Editora Guanabara Koogran, Rio de Janeiro, 1993.
 35. Madden, T. D.; Harrigan, PP. R.; Tai, L. C. L.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Redelmeier, T. E.; Loughrey, H. C.; Tilcock, C. P. S.; Reinish, L. W. e Cullis, P. R., “ The Accumulation of Drugs within Large Unilamellar Vesicles Exhibiting a Proton Gradient: a Survey”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1990, vol. 53, pp. 37-46.

36. Mainka, A.; Ebert, P.; Kibler, M.; Prokop, T.; Tenberken, B. e Bächmann, K., “ Developments of New Methods for the Analysis of Carboxylic Acids and Carbonyl compounds in Size Classified Raindrops by CE for Application in Modelling Atmospheric Process”, *Chromatographia*, vol. 45, pp. 158-162, 1997.
37. Martin, G. PP. e Lloyd, A. W., “ Basic Principles of Liposomes for Drug Use” in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 20-28, 1992.
38. Martindale W. - *Extra Pharmacopoeia* - 30^a ed., Londres: The Pharmaceutical Press, pp. 480-482, 1993.
39. Mayer, L. D.; Bally, M. B.; Hope, M. J. e Cullis, PP. R., “ Techniques for Encapsulating Bioactive Agents into Liposomes”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1986, vol. 40, pp. 333-345.
40. Mayer D. L., Tai L. C. L., Bally M. B., Mitilenes G. N., Ginsberg R. S. e Cullis P. R., “ Characterization of Liposomal Systems Containing Doxorubicin Entrapped in Response to pH Gradients”, 1990, vol. 1025, pp. 143-151.
41. Merck Index, The, 12^a ed., NJ: Whitehouse station, 1996.
42. Meybeck, A., “ Comedolitic Activity of Liposomal Antiacne Drug in an Experimental Model”, in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 235-241, 1992.
43. Mezei, M. e Gulasekharam, V., “ Liposomes: A Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration”, *Life Science*, 1980, vol. 26, pp. 1473-1477.
44. Moraes, A. M. - Preparação, Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Lipossomas contendo O-carboranilpropilamina, L-P-boronofenilalanina e Doxorubicina - Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.
45. Moraes, A. M.; Santana, M. H. A e Carbonell, R. G., “ Characterization of Liposomal Systems Entrapping Boron-Containing Compounds in Response to pH Gradients” in Biofunctional Membranes, D. A. Butterfield, Plenum Press, New York, 1996.
46. Nazzaro-Porro, M; Zina, G.; Breathnach, A.; Passi, S.; Bernengo, A. e Gallagher, S., “ Effect of Azelaic Acid on Human Malignant Melanoma”, *The Lancet*, 1980, vol. 24, pp. 1109-111.

-
47. Nazzaro-Porro, M., "Azelaic Acid", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1987, vol. 17, pp. 1033-1041.
 48. New R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach*, USA: Editora da Universidade de Oxford, 1990.
 49. Nguyen, H. Q., "Azelaic Acid: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties and its Therapeutic role in Hyperpigmentary Disorders and Acne", *International Journal of Pharmacology*, 1993, vol. 34, pp. 75-84.
 50. Nichols, J. W. e Deamer, D. W., "Catecholamine Uptake and Concentration by Liposomes Maintaining pH Gradients", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, vol. 455, pp. 269-271.
 51. Ostro, M. J. - *Liposomes* - Scientific American, 1987, vol. 256, n. 1, pp. 90-99.
 52. Ozer A. Y. e Talsma H., "Preparation and Stability of Liposomes Containing 5-Fluorouracil", *International Journal of Pharmaceutics*, 1989, vol. 55, pp. 185-191.
 53. Passi S., Nazzaro-Porro M., Picardo M. Mingrone G. e Fasella Paolo, "Metabolism of Straight Saturated Medium Chain Length (C9 to C12) Dicarboxylic Acids", *Journal of Lipid Research*, 1983, vol. 24, pp. 1140-1147.
 54. Powers, J. D.; Kilpatrick, P. K. e Carbonell, R. G., "Trypsin Purification by Affinity Binding to Small Unilamellar Liposomes", *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, vol. 36, pp. 506-519.
 55. Prieto, R. A. M. e Lopez. L. M. PP., "Treatment of Lentigo Maligna with Azelaic Acid", *International Journal of Dermatology*, 1993, vol. 32, pp. 363-364.
 56. Ribas, A. M., Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de Tensoativos - Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.
 57. Röding, J. e Artmann, C., "The Fate of Liposomes in Animal Skin", in Korting, H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 185-194, 1992.
 58. Roy M. e Kim S., "Multivesicular Liposomes Containing Bleomycin for Subcutaneous Administration", *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 1991, vol. 28, pp. 105-108.
 59. Ryan, F. R.; Krementz, T. E. e Litwin, S. M., "A Role for Topical 5-Fluorouracil Therapy in Melanoma", *Journal of Surgical Oncology*, 1988, vol. 38, pp. 250-256.

60. Schmid, M. H., "The Fate of Liposomes for Topical Use in Skin Tissue Culture", Korting, in H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 195-199, 1992.
61. Sharata, H. H. e Katz K. H. - *Liposomes* - International Journal of Dermatology, 1996, vol. 35, pp. 761-769.
62. Simmons, T. S.; Sherwood. B. M.; Nichols, a. D.; Penne, B. R.; Sery, T. e Spaeth. L. G., "Pharmacokinetics of a 5- Fluorouracil Liposoma Delivery System", *British Journal of Ophtalmology*, 1988, vol. 72, pp. 688-691.
63. Slominski A., J. Ross e M. C. Mihm, "Cutaneous Melanoma: Pathology, Relevant Prognostic Indicators and Progression", *British Medical Bulletin*, 1995, vol. 51, pp. 548-569.
64. Szoka F. e Papahadjopoulos D., "Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-phase Evaporation", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1978, vol. 75, pp. 4194-4198.
65. Szoka F. e Papahadjopoulos D., "Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)", *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1980, vol. 9, pp. 467-508.
66. Taylor K. M. G., Taylor G., Kellaway I. W. e Stevens J., "Drug Entrapment and Release from Multilamellar and Reverse-Phase Evaporation Liposomes", *International Journal of Pharmaceutics*, 1990, vol. 58, pp. 49-55.
67. Thoma K. e Jocham U. E., "Liposome Dermatics: Assessment of Long-Term Stability", in H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 150-166, 1992.
68. Vicente R. J., Ortga V. V. e Jordana M. C., "The Effects of Different Antineoplastic Agents and of Pretreatment by Modulators on Three Melanoma Lines", *Cancer*, 1998, vol. 82, pp. 495-502.
69. Watarai, H., *Chemical Letters*, 1991, vol. 391 apud Altria, D. K. "Highly Efficient and Selective Separation of a Wide Range of Analytes Obtained by an Optimized Microemulsion Electrokinetic Chromatography Method", *Chromatographia*, 1999, vol. 49, pp. 457-464.
70. Weiner N., Egbaria K. e Ramachandran C., "Topical Delivery of Lipossomally Encapsulated Interferon Evaluated by In Vitro Diffusion Studies and in a Cutaneous

- Herpes Guinea Pig Model”, in H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 242-250, 1992.
71. Wertz P. W., “ Liposome Dermatics: Chemical Aspects of the Skin Lipid Approach”, in H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 38-43, 1992.
72. Wohlrab W. e Lasch J., “ Penetration Kinetics of Liposomal Hydrocortisone in Human Skin”, *Dermatologica*, 1987, vol. 174, pp. 18-22.
73. Wohlrab W., Lasch J., Laub R., Taube C. M. e Wellner K., “ Distribution of Liposome-Encapsulated Ingredients in Human Skin Ex Vivo”, in H. C. F.; Braun, O. e Maibach, H. I. - *Liposome Dermatics* - Munique, pp. 215-225, 1992.
74. Zambonin C. G., Guerrieri A. e Palmisano F., “ Simultaneous Determination of 5-Deoxy-5-fluoridine, 5-fluorouracil e 5,6-Dihydro-5-fluorouracil in Plasma by Gas Chromatography-mass Spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 1996, vol. 329, pp. 143-152.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE