

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

"ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA PARA APLICAÇÃO DERMATOLÓGICA"

TESE DE DOUTORADO

Milene Heloisa Martins

Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Campinas/SP Fevereiro/2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M366e	Martins, Milene Heloisa. Encapsulação e caracterização de lipossomas contendo isotretinoína para aplicação dermatológica Campinas, SP: [s.n], 2007.
	Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine.
	Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Isotretinoína. 2. Lipossomas. 3. Encapsulação. Pele I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Encapsulation and characterization of liposomes with isotretinoin for dermatological application.

Palavras-chaves em inglês: Isotretinoin, Liposome, Encapsulation, Skin.

Área de concentração: Físico-Química.

Titulação: Doutor em Ciências.

Banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (orientador), Profa. Dra. Maria Helena Bueno da Costa (Instituto Butantan), Profa. Dra. Eneida de Paula (IB-Unicamp), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Ricardo Aparício (IQ-Unicamp)

Data de defesa: 27/02/2007

A sabedoria é um paradoxo: o homem que mais sabe é aquele que mais reconhece a vastidão da sua ignorância.

(F. Nietzsche)

O valor das coisas não está no tempo que elas duram,

mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis

e pessoas incomparáveis.

(Fernando Sabino)

Dedico esta conquista à minha família, ao Eduardo e aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco B. T. Pessine, pela paciência em me orientar e dedicação. Obrigada pelo incentivo e amizade. Contar com seu apoio foi muito importante para chegar até aqui!

À minha família, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Sem vocês seria muito difícil...

Ao meu companheiro de todos os dias, Eduardo, pela paciência, força e apoio nos momentos difíceis e alegres.

Aos meus pais de coração Olívia e Joaquim, pelo carinho e apoio. Aos meus amigos Dr. Carlos, José Alencar e a todos os outros eternos companheiros pela ajuda e força.

Ao meu braço direito, fiel escudeiro de tantos anos, Walmir Corradini pelas risadas, desabafos, suporte, amizade. À minha irmã de coração Cláudia Martelli por toda ajuda e carinho. Ao meu amigo Ricardo (HPLC) sempre presente, prestativo e com grandes idéias. Ao meu amigo André Romero pelas trocas de idéias e incentivo.

Ao pessoal do laboratório e salinha Cláudio, Melissa, Kesley, Débora Nakai, Edeilza, Rita, Sílvia, Neife, Robson, Adriana, Ana Paula, Angélica, Déborah Simoni, Daniel, William, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Luiz Carlos Dias (IQ/UNICAMP) e seus alunos, pelo companheirismo e colaboração no laboratório, principalmente ao Leonardo e Paulo pelas grandes engenhocas.

Aos professores Fernando Galembeck, Pedro Volpe, Renato Atílio Jorge, Inés Joekes (IQ/UNICAMP), Eneida de Paula (IB/UNICAMP), Carlos Ramos (BFM/LNLS) pelo uso de equipamentos/ e ou reagentes.

Aos funcionários do IQ/Unicamp pelo apoio técnico e a agradável convivência de tantos anos.

À empresa Dosage pelo uso de equipamentos e reagentes.

Às empresas Oxiteno, Lipo do Brasil, Degussa BioActives e Croda pela doação de reagentes.

Ao CNPq e Faepex, pelo suporte financeiro.

À empresa Stiefel, pelo suporte financeiro. Em especial, agradeço à Meire, Sueli, Daniela, Mônica, Renato e Solange pelo apoio na realização deste projeto.

Ao Instituto de Química/Unicamp pela infra-estrutura, tornando possível a realização desta Tese.

CURRICULUM VITAE

■ Formação Acadêmica

Pós-Graduação

Mestrado: Ago95 a Nov99 - IQ/UNICAMP (Orientador: Prof. Dr. Marco-Aurélio de Paoli)

Planejamento experimental utilizando quimiometria. Preparação de *Masterbatch*. Extrusão e otimização de formulações de polipropileno reciclado com pigmentos e antioxidantes. Caracterizações por análises térmicas e reológicas, ensaios de tração, infravermelho, densidade e microscopia óptica. Análise de aditivos por técnicas de cromatografia.

Graduação: Bacharelado em Química (Dez94) - IQ-UNICAMP e Ciências Farmacêuticas (não concluído) - PUCCAMP

Ensino médio: Técnico em Bioquímica (Dez88) - ETECAP

Iniciação Científica

Mar91 a Mar95 - IQ/UNICAMP

Síntese de compostos e caracterização por análise elementar, ressonância magnética nuclear, infravermelho e cromatografia. Análise de substâncias e desenvolvimento de técnicas de preparação de fases estacionárias reversas para cromatografia líquida (HPLC).

Experiência Profissional

• Mai98 a Mai99 - Phapol Engenharia de Polímeros Ltda.

Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento

Coordenação do desenvolvimento de produtos de extrusão de polímeros: PET, PVC, PS, poliolefinas e compostos de poliamida com talco, fibra de vidro, etc.. Estruturação do laboratório de Qualidade.

Participação no Comitê de Qualidade e Redatora de Procedimentos na Implantação da Norma ISO 9000.

•Jan89 a Dez89 - Centro Tecnológico de Embalagens - ITAL

Estágio (nível técnico)

Responsável técnica pela organização do laboratório de embalagens metálicas e pelas análises: avaliação de cromo/estanho em latas metálicas por UV/VIS; identificação de vernizes por FTIR e determinação da composição de produtos embalados por cromatografia gasosa.

Programa de Estágio Docente

Ago a Dez97 (química orgânica); Ago a Dez03 (físico-química) e Mar a Jul05 (química analítica) - *IQ/UNICAMP*

■ Cursos e Congressos

- V Congress of Pharmaceutical Sciences FCFRP-USP
- III Encontro de Nanobiotecnologia Nanobiotec/MCT/CNPq
- IV Congress of Pharmaceutical Sciences FCFRP-USP
- Symposium of Frontiers of NanoEngineering Unicamp
- Permeação Cutânea in vitro II FUNDEFARP/USP
- Sistemas de Liberação Controlada e Direcionada de Genes, Vacinas e Drogas IQ/USP.
- Palestrante no IV Congresso Brasileiro de Polímeros ABPol (Salvador)
- Palestrante em Workshop de Caracterização e Reciclagem ABPol /FIESP
- Fundamentos, Instrumentação e Aplicações de SAXS LNLS

Artigos Científicos

• Martins, M.H., De Paoli, M.A. Polypropylene Compounding with Recycled Material I. Statistical Response Surface Analysis. *Polym. Degrad. Stab.* **71** (2001) 293.

• Martins, M.H., De Paoli, M.A. Polypropylene Compounding with post-consumer material II. Reprocessing. *Polym. Degrad. Stab.* **78** (2002) 491.

• Martins, M.H., De Paoli, M.A. Estudo Determina as Melhores Condições de Processamento do Polipropileno. *Plástico Industrial* **42** (2002) 24.

• Martins, M.H., Brescansin, E.G., Pessine, F.B.T. Photostability of drug in methanol and in Liposomes. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **39 s2** (2003) 76.

• Brescansin, E.G., Martins, M.H., Pessine, F.B.T. Encapsulation of Nystatin in Multilamellar Liposomes. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **39 s2** (2003) 304.

• Martins, M.H., Pessine, F.B.T. Ultrasonic frequency and power effects in liposome size. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **41 s1** (2005) 136.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos preparar, caracterizar, verificar a estabilidade e avaliar a permeação na pele e a irritação cutânea de formulações lipossomais contendo isotretinoína (ISOTN), destinadas ao tratamento dermatológico de casos severos de acne, com a finalidade de reduzir os efeitos adversos e a degradação do fármaco.

As formulações lipossomais foram obtidas através da técnica de hidratação do filme lipídico seco. Foi observado que nos lipossomas constituídos apenas de fosfatidilcolinas saturadas (HPC) houve vazamento do fármaco inicialmente encapsulado. O máximo de encapsulação (> 98%), com aumento da fluidez das bicamadas lipídicas, foi obtido com as seguintes suspensões lipossomais: (a) mistura de HPC com 40% mol de surfatante insaturado Lipopeg 4DO (DO) - Lipo_HPC/DO; (b) mistura de HPC com 40% mol de fosfatidilcolinas insaturadas (PC) - Lipo_HPC/PC; (c) lipossomas contendo apenas PC - Lipo_PC; (d) mistura de PC com 20% mol de colesterol (Col) - Lipo_PC/Col e (e) mistura de PC com 10% mol de fosfatidilserina (PS) - Lipo_PC/PS. Devido ao elevado teor de encapsulação da ISOTN nestes lipossomas, foi desnecessário separar o fármaco não encapsulado. A razão molar ISOTN/lipídios foi ~0,026:1.

Análises usando microscopia eletrônica de transmissão e de varredura das suspensões lipossomais confirmaram a estrutura lamelar e a geometria esférica dos lipossomas, respectivamente. A encapsulação da ISOTN nas bicamadas lipossomais foi monitorada por microscopia óptica, avaliando a presença de cristais do fármaco na suspensão. A comprovação da encapsulação da ISOTN nas bicamadas lipídicas foi verificada através da fluorescência de pireno (aumento do grau de anisotropia e diminuição da intensidade de fluorescência da sonda). As suspensões lipossomais mantiveram-se estáveis durante 3 meses de armazenamento a 8 °C, em relação ao diâmetro médio (~300 nm) e à porcentagem de ISOTN encapsulada.

A encapsulação lipossomal de ISOTN diminuiu sua fotodegradação em comparação com este fármaco dissolvido em etanol. Géis aquosos contendo ISOTN lipossomal apresentaram maior estabilidade fotoquímica que o gel alcoólico convencional contendo ISOTN.

xi

Os géis lipossomais apresentaram menor fluxo através da pele de orelha de porco, indicando menor absorção sistêmica *in vivo*. Géis contendo Lipo_PC/PS e Lipo_HPC/DO retiveram mais fármaco na pele em comparação ao fármaco permeado. Com exceção do gel contendo Lipo_HPC/DO, todos os demais géis lipossomais foram menos irritantes à pele de coelho em relação aos géis alcoólicos convencionais. Portanto, a encapsulação da ISOTN em lipossomas aumentou sua estabilidade e diminuiu efeitos adversos em relação aos produtos comerciais.

ABSTRACT

The mail goals of this work were the preparation, characterization, verification of the stability, skin permeation and cutaneous irritation of isotretinoína (ISOTN) liposomal formulations used in dermatological treatment and designed to reduce adverse effects and drug degradation.

The liposomal formulations were obtained by the technique of dry film hydration. Liposomes made of only saturated phosphatidylcholine (HPC) caused leakage of the encapsulated drug. The maximum encapsulation was obtained (> 98%) by increasing the fluidity of the lipidic bilayers, with the following liposomal suspensions: (a) a mixture of HPC with 40% mol of the unsaturated surfactant Lipopeg4DO (DO) - Lipo_HPC/DO; (b) a mixture of HPC with 40% mol of unsaturated phosphatidylcholine (PC) - Lipo_HPC/PC; (c) liposomes with only PC - Lipo_PC; (d) a mixture of PC with 20% mol of cholesterol (Col) - Lipo_PC/Col, and (e) a mixture of PC with 10% mol of phosphatidylserine (PS) - Lipo_PC/PS. Due to the high yield of encapsulation of ISOTN in these liposomes, the suspensions didn't require separation of non encapsulated drug. The molar ratio ISOTN/lipids was approximately 0,026: 1.

Transmission and scanning electron microscopy of the liposomal suspensions showed the lamellar structure and spherical geometry of the vesicles. ISOTN encapsulation in the lipid bilayers was monitored by optical microscopy, since this drug crystallizes outside the vesicles. This encapsulation was also confirmed by increase of the degree of anisotropy of the fluorescent probe pyrene and the decrease of its fluorescence intensity due to quenching processes. The liposomal suspensions were stable for 3 months at 8 °C, maintaining the diameter and the percentage of encapsulated drug.

The encapsulation in liposomes decreased ISOTN photodegradation in comparison to the drug dissolved in ethanol. Aqueous gels containing liposomal ISOTN were more protect after photolysis than ISOTN in the conventional alcoholic gel.

The liposomal gels presented a slower rate of permeation through the skin of a piglet ear, indicating a tendency of present a lower systemic absorption *in vivo*. Gels containing Lipo_PC/PS and Lipo_HPC/DO were able to retain more drug at the skin than the free drug.

With the exception of the gel containing Lipo_HPC/DO, the other liposomal gels were less irritating to the rabbit skin in relation to the conventional alcoholic gels. Therefore, the encapsulation of ISOTN in liposomes increased its stability and diminished its adverse effects in comparison to the commercial products.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xxi
Lista de Figuras	xxv
Lista de Tabelas	xxxi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Isotretinoína	1
1.2 Lipossomas	3
1.3 A pele	8
1.4 Sistemas lipossomais para aplicações na pele	14
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Reagentes e outros materiais	16
3.2 Equipamentos e acessórios	18
3.3 Ambiente de manipulação da ISOTN	19
3.4 Metodologias de preparação de lipossomas	20
3.4.1 Método da hidratação do filme lipídico seco	20
3.4.2 Método da injeção com etanol	21
3.4.3 Método da encapsulação passiva	22
3.5 Desenvolvimento de suspensões lipossomais pelo método da hidratação	do filme
lipídico seco	22
3.5.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina saturada HPC	22
3.5.1.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina HPC contendo diferent	es números
de moles de ISOTN	22
3.5.1.2 Avaliação da encapsulação de ISOTN em lipossomas de fosfatidile	colina HPC
em função de parâmetros experimentais da preparação lipossoma	ıl23

3.5.1.2.1 Efeito dos solventes na formação do filme lipídico	23
3.5.1.2.2 Efeito da posição do balão durante formação do filme lipídico	23
3.5.1.2.3 Efeito da concentração de antioxidante BHT	24
3.5.1.2.4 Efeito do tempo de hidratação e temperatura de armazenagem da s	uspensão
lipossomal	24
3.5.1.2.5 Efeito da solução de hidratação	25
3.5.1.3 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina HPC e outras	substâncias
lipofílicas	25
3.5.1.3.1 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com surfatante	25
3.5.1.3.2 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com PC ou colesterol	25
3.5.2 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina insaturada PC	26
3.5.2.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina PC contendo diferentes nú	imeros de
moles de ISOTN	26
3.5.2.2 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina PC e outras su	ubstâncias
lipofílicas	26
3.6 Metodologias para diminuição do tamanho de lipossomas	27
3.6.1 Extrusão	27
3.6.2 Ultra-som	27
3.7 Metodologias para separação do fármaco livre	29
3.7.1 Centrifugação	29
3.7.2 Filtração em colunas de Sephadex	29
3.7.3 Gradiente de densidade	29
3.8 Preparação de gel de hidroxipropilcelulose	
3.9 Caracterização dos lipossomas	31
3.9.1 Quantificação da ISOTN e lipídios	31
3.9.1.1 Determinação da concentração de ISOTN em soluções ou em liposso	mas por
espectroscopia UV/VIS	31
3.9.1.2 Determinação da concentração de ISOTN em soluções ou em liposso	mas por
cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	31
3.9.1.3 Determinação da concentração de lipídios (ensaio fosfato)	33
3.9.2 Determinação da eficiência de encapsulação, razão ISOTN/lipídios e co	oeficiente
de partição membrana/tampão	34
3.9.3 Determinação de tamanho de lipossomas	34

3.9.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	36
3.9.6 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	36
3.9.7 Análise das suspensões lipossomais em microcalorímetro diferencial de var	redura
(microDSC)	37
3.9.8 Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais em geladeira	37
3.9.9 Avaliação da fotodegradação das suspensões lipossomais e da solução de	ISOTN
sob luz de lâmpada fluorescente e luz UVA	
3.9.10 Análise da fluorescência das suspensões	38
3.9.10.1 Medidas sobre intensidades de fluorescência, no estado estacionário, de	:
pireno incorporado em lipossomas	38
3.9.10.2 Medidas do grau de anisotropia de sondas incorporados em lipossomas.	40
3.10 Determinação da solução receptora para teste de permeação	42
3.10.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) de surfatantes	42
3.10.2 Solubilidade da ISOTN em diferentes meios receptores	42
3.10.3 Determinação da capacidade de solubilização de lipossomas por surfatant	tes43
3.10.3.1 Preparação de suspensões lipossomais contendo calceína	43
3.10.3.2 Avaliação do tamanho e da fluorescência de lipossomas contendo calce	ína
após contato com soluções de surfatante	43
3.11 Ensaio sobre permeação cutânea	44
3.11.1 Preparação da pele	44
3.11.2 Teste sobre permeação em células de difusão de Franz	44
3.12 Ensaios sobre irritação dérmica	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Determinação de parâmetros cromatográficos para análise de ISOTN por cromato	grafia
líquida de alta eficiência (HPLC)	48
4.2 Desenvolvimento de suspensões lipossomais pelo método da hidratação do filme	
lipídico seco	49
4.2.1 Considerações Iniciais	49
4.2.2 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina saturada HPC	50
4.2.2.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina HPC contendo diferentes núme	eros
de males de ICOTN	
	50
ae moies de العن المنابعة 4.2.2.1.1 Avaliação das suspensões após preparação lipossomal	50 50

	4.2.2.2 Avaliação da encapsulação de ISOTN em lipossomas de fosfatidilcolina HPC	
	em função de parâmetros experimentais da preparação lipossomal	.60
	4.2.2.2.1 Efeito do solvente na formação do filme lipídico	.60
	4.2.2.2 Efeito da posição do balão durante formação do filme	.61
	4.2.2.3 Efeito do tempo de hidratação e temperatura de armazenagem da suspensã	io
	lipossomal	.63
	4.2.2.2.4 Efeito da concentração de antioxidante BHT	.64
	4.2.2.5 Efeito da solução de hidratação	.65
	4.2.2.3 Lipossomas constituídos de mistura de fosfolipídios HPC com outras substânce	cias
	lipofílicas	.67
	4.2.2.3.1 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com surfatantes	.67
	4.2.2.3.2 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com PC ou colesterol	.70
	4.2.3 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina insaturada PC	.73
	4.2.3.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina PC contendo diferentes números o	le
	moles de ISOTN	.73
	4.2.3.2 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina PC e outras substância	as
	lipofílicas	.74
4.3	Comparação entre métodos de preparação de lipossomas	.76
4.4	Diminuição do tamanho dos lipossomas	.77
	4.4.1 Sonicação dos lipossomas	.77
	4.4.2 Extrusão dos lipossomas	.82
4.5	Caracterização dos lipossomas com máxima encapsulação de ISOTN	.83
	4.5.1 Determinação da porcentagem de ISOTN encapsulada nos lipossomas	.84
	4.5.2 Determinação de diâmetro médio e polidispersidade das suspensões lipossomais	. 88
	4.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	.90
	4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	.92
	4.5.5 Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais a 8°C	.94
	4.5.6 Avaliação da fotodegradação das suspensões lipossomais e solução alcoólica	
	de ISOTN sob lâmpada fluorescente e UVA	.95
	4.5.7 Análise de fluorescência das suspensões lipossomais	. 101
4.6	Determinação da solução receptora para teste de permeação	. 116
	4.6.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) de surfatantes	. 117
	4.6.2 Solubilidade da ISOTN em diferentes meios receptores	. 122
	4.6.3 Determinação da capacidade de solubilização de lipossomas por surfatantes	. 124

4.7 Ensaios sobre permeação cutânea	131
4.8 Teste sobre irritação cutânea primária e acumulativa em coelhos	137
5 CONCLUSÕES	140
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	143
7 REFERÊNCIAS	145
8 ANEXO	160

LISTA DE ABREVIATURAS

%EE: eficiência de encapsulação ε:: absortividade molar λ_{em} : comprimento de onda de emissão λ_{exc} : comprimento de onda de excitação ΔH: entalpia da transição de fase λ_{max} : comprimento de onda de máxima absorção [ISOTN]: concentração de ISOTN BHT: butilhidroxitolueno CMC: concentração micelar crítica Col: colesterol **Cp:** capacidade calorífica a pressão constante **DO**: surfatante Lipopeg 4DO EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético EPR: "electron paramagnetic resonance" – ressonância paramagnética de elétrons f_a: fração da intensidade de fluorescência acessível ao supressor fi: força iônica HPC: fosfatidilcolina saturada HPLC: "high performance liquid chromatography" - cromatografia líquida de alta eficiência I: intensidade I₁/I₃ : razão entre as intensidades de fluorescência das componentes vibrônicas 1 e 3 de pireno I_E/I_M : razão entre as intensidade de fluorescência do excímero e do monômero de pireno **IP**: índice de polidispersidade **ISOTN:** isotretinoína K_b: constante de ligação ISOTN com lipossomas K_{fot}: constante de velocidade da fotodegradação K_{SV} : constante de Stern-Volmer

- **Lipo_HPC(ISOTN5μmol) ou Lipo_HPC**: lipossomas contendo 100% de fosfatidilcolina saturada (HPC) + 5μmol de ISOTN
- Lipo_HPC vazio: lipossomas contendo 100% de fosfatidilcolina saturada (HPC)
- **Lipo_HPC/DO(ISOTN5μmol) ou Lipo_HPC/DO**: lipossomas de fosfatidilcolina saturada (HPC) com 40% em mol de surfatante Lipopeg 4DO (DO) + 5μmol de ISOTN
- Lipo_HPC/DO vazio: lipossomas de de fosfatidilcolina saturada (HPC) com 40% em mol de surfatante Lipopeg 4DO (DO)
- **Lipo_HPC/PC(ISOTN5µmol) ou Lipo_HPC/PC** : lipossomas de fosfatidilcolina saturada (HPC) com 40% em mol de fosfatidilcolina insaturada (PC) + 5µmol de ISOTN
- Lipo_HPC/PC vazio: lipossomas de fosfatidilcolina saturada (HPC) com 40% em mol de fosfatidilcolina insaturada (PC)
- **Lipo_PC(ISOTN5μmol) ou Lipo_PC:** lipossomas contendo 100% de fosfatidilcolina insaturada (PC) + 5μmol de ISOTN
- Lipo_PC vazio: lipossomas contendo 100% de fosfatidilcolina insaturada (PC)
- **Lipo_PC/Col(ISOTN5µmol) ou Lipo_PC/Col:** lipossomas de fosfatidilcolina insaturada (PC) com 20% em mol de colesterol (Col) + 5µmol de ISOTN
- Lipo_PC/Col vazio: lipossomas de fosfatidilcolina insaturada (PC) com 20% em mol de colesterol (Col)
- **Lipo_PC/PS(ISOTN5μmol) ou Lipo_PC/PS**: lipossomas de fosfatidilcolina insaturada (PC) com 10% em mol de fosfatidilserina (PS) + 5μmol de ISOTN
- Lipo_PC/PS vazio: lipossomas de fosfatidilcolina insaturada (PC) com 10% em mol de fosfatidilserina (PS)
- LUV: "large unilamellar vesicle" vesicular unilamelar grande
- **m/m:** razão massa/massa
- m/mlipídios: razão massa/massa total dos lipídios presentes
- m/v: razão massa/volume
- **microDSC**: "micro differencial scanning calorimetry" microcalorimetria diferencial de varredura
- MLV: "multilamellar vesicle" vesícula multilamelar
- MVV: "multivesicular vesicle" vesícula multivesicular
- NMR: "nuclear magnetic resonance" ressonância nuclear magnética
- OE: unidades de óxido de etileno
- **OLV**: "oligolamellar vesicle" vesícula oligolamenlar

PC: fosfatidilcolina insaturada

PCS: "photon correlation spectroscopy" - espectroscopia de correlação de fóton

 $\mathbf{P}_{l/a}$: coeficiente de partição do fármaco entre a membrana e o tampão

PS: fosfatidilserina

rpm: rotações por minuto

SEM: "scanning electron microscopy" - microscopia eletrônica de varredura

SUV: "small unilamellar vesicle" - vesícula unilamelar pequena

T: temperatura

t: tempo

TEM: "transmission electron microscopy" – microscopia eletrônica de transmissão

TMA-DPH: 1-(4-trimetilamônio fenil)-6-fenil-,3,5-hexatrieno

TN: tretinoína

UV/VIS: uUltra-violeta/visível

v/v: razão volume/volume

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da ISOTN01

Figura 3: Fosfolipídios com diferentes cabeças polares (adaptado de New, 1990)......04

Figura 5: (a) Transição de fase gel para líquido-cristalino em membranas de fosfolipídios; (b) Rotação de ligações C-C das cadeias alifáticas dos lipídios abaixo da T_m (conformação *trans*) e acima da T_m (conformação *gauche*) (New, 1990)......06

Figura 6: Esquema simplificado da formação de vesículas (adaptado de www.avantilipids.com e, Santos e Castanho, 2002)......07

Figura 8: Representação das diferentes rotas de penetração de ativos na pele (Williams, 2003)......10

Figura 9: Esquema de pesagem na *glovebag*: (a) *glovebag* evacuada e (b) sob N₂.....20

Figura 12: Formação de cavitações pela presença de região de maior e menor	concentração
de ondas ultra-sônicas. Figura adaptada de Fuchs (2002)	
Figura 13: Centrifugação em Sephadex	30

Figura 17: Espectro de fluorescência do monômero e excímero do pireno (adaptada de Lakowicz, 1999)......40

Figura 20: Células de difusão de Franz......46

Figura 25: Representação esquemática da posição relativa proposta para: (A) retinol e (B) ácido retinóico (TN) em bicamadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (Wassall *et al.*,1988)......55

Figura 27: Quantidade de cristais e %EE da ISOTN nas suspensões lipossomais **Lipo_HPC(ISOTN2μmoI)** e **Lipo_HPC(ISOTN5μmoI)** em função do tempo.......57

Figura 30: (a) temperatura de transição de fase e largura a ½ altura, e (b) entalpia de transição obtidas das curvas de microDSC de suspensões lipossomais contendo HPC com diferentes números de moles de ISOTN, após 42 dias da preparação lipossomal60

Figura 35: Diâmetro médio e polidispersidade em função do número de extrusões para Lipo_HPC(ISOTN5µmol) e Lipo_PC(ISOTN5µmol); extrusão em membrana de 400 nm82

Figura 36: Gráfico de distribuição Lognormal do tamanho dos lipossomas contendo ISOTN encapsulada nas suspensões: (a) **Lipo_PC** e (b) **Lipo_HPC/DO**.......90

Figura 43: Gráfico de In([ISOTN]/[ISOTN]_{inicial}) x tempo para suspensão Lipo_PC contendo ISOTN encapsulada após irradiação sob lâmpada fluorescente, durante 24 h. [ISOTN] é a concentração do fármaco em um dado instante e [ISOTN]_{inicial} a inicial (0 min)97

Figura 46: Fotodegradação da ISOTN (~0,83 mmol/L) em gel etanólico, gel lipossomal **Lipo_PC**, etanol e suspensão **Lipo_PC** de ISOTN sob lâmpada fluorescente, durante 4 h...100

Figura 50: Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F)-1 versus [KI] em suspensões lipossomais contendo pireno: (a) lipossomas vazios (razão molar lipídio/pireno ~250:1) e (b) lipossomas encapsulados com ISOTN (razão molar lipídios/pireno ~250:1 e razão molar ISOTN/pireno ~6,5:1). A legenda, comum a todos, está no último gráfico e eles foram expandidos para melhor visualização.....105

Figura 55: Espectros de absorção de pireno (1µmol/L) e ISOTN (6,7µmol/L) em metanol112

Figura 59: Razão entre as intensidades de fluorescência dos picos 1 e 3 (I_1/I_3) do pireno $(1 \mu mol/L)$ em função do logaritmo natural da concentração de vários surfatantes (mol/L)118

 Figura 63: Quantidade de ISOTN permeada na epiderme de orelha de porco *in vitro* x tempo, durante 24h

 133

LISTA DAS TABELAS

Tabela 2: Sistema de graduação de irritação cutânea
 47

Tabela 8: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5μmol) em função da posição do balão em relação ao banho termostatizado na formação do filme lipídico. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1.....62

Tabela 13: Número de cristais de ISOTN presentes em suspensões lipossomais compostas de misturas de fosfatidilcolina HPC e surfatantes contendo ISOTN encapsulada, após 15 dias da preparação lipossomal. Razão molar ISOTN/(HPC+surfatantes) em 0,026:1......68

Tabela 14: Parâmetros termodinâmicos das soluções lipossomais contendo misturas de fosfatidilcolina HPC e 20 ou 40% mol de surfatante Lipopeg 4DO, contendo ou não ISOTN encapsulada (~5 μmol). Razão molar ISOTN/(HPC+surfatantes) em 0,026:169

Tabela 18: Número de cristais de ISOTN encontrados em suspensões lipossomais constituídasde misturas de fosfatidilcolina PC com colesterol (Col), 15 dias após a preparaçãolipossomal74

 Tabela 21: Razão molar ISOTN/lipídios das suspensões lipossomais
 85

 Tabela 26:
 Valores de CMC experimental (técnica de fluorescência) e da literatura para diferentes surfatantes

 120

 Tabela 27:
 Valores de solubilidade de ISOTN em soluções de surfatante (1,07 mmol/L), albumina humana e etanol, determinados por HPLC

 123

 Tabela 28: Porcentagem de calceína liberada de lipossomas Lipo_PC (165 e 333 nm) em diferentes soluções de surfatante (1,07 mmol/L) após 18 h

Tabela 29: Diâmetro médio e podispersidade das soluções de calceína lipossomal (Lipo_PC;333 nm) contendo surfatante (1,07 mmol/L) após 18 h130

Tabela 30: Testes de irritação dérmica primária e acumulativa dos géis aquosos e alcoólicos,contendo ou não ISOTN, em coelhos138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Isotretinoína

A isotretinoína (**ISOTN**), ácido 13-*cis*-retinóico ou ácido (2Z,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)nona-2,4,6,8-tetraenoico (IUPAC) é um retinóide sintético derivado da vitamina A (Figura 1). Este fármaco é um metabólito, isômero geométrico do ácido *all-trans*retinóico (tretinoína ou **TN**) de ocorrência natural, proveniente de oxidação da vitamina A (Blaner, 2001). Apresenta pequena solubilidade em água ~ 0,1 µg/mL (Nankervis *et al.*,1991) sendo carreado no organismo por proteínas como albumina (Sehgal *et al.*, 2006). A ISOTN se degrada facilmente quando exposta à luz, oxigênio e calor, sendo seu principal isômero a tretinoína (Liu e Asato, 1984).



Figura 1: Fórmula estrutural da ISOTN

Os retinóides constituem um dos grupos mais promissores de fármacos para aplicação terapêutica em dermatologia e entre eles os mais utilizados são a isotretinoína e tretinoína (Peck e DiGiovanna, 1994). As formulações tópicas, comercialmente disponíveis, destes dois fármacos são, preferencialmente, cremes e géis como RETIN-A[®] contendo TN em concentrações de 0,025; 0,05 e 0,10% (m/m) e ISOTREX[®] contendo ISOTN em concentrações de 0,05% (m/m). Dependendo da gravidade de algumas doenças dermatológicas a ISOTN é administrada na forma oral (Amichai *et al.*, 2006).

A ISOTN por administração tópica ou oral tem sido utilizada no tratamento de acne (Taghipour e James, 2006; Thielitz, 2006), psoríase (Anstey e Hawk, 1997), câncer de pele (Campbell e DiGiovanna, 2006) e fotoenvelhecimento (Griffith *et al.*, 2005; Singh e Griffith,

2006). Artigos de revisão sobre as aplicações dermatológicas da ISOTN foram feitos por Akyol e Ozcelik (2005) e Amichai e Grunwald (2000).

O mecanismo de ação da isotretinoína ainda não está completamente esclarecido. De modo geral, dentro das células (por exemplo, epidérmicas), os retinóides são transportados por proteínas específicas até o núcleo celular, onde se ligam a receptores nucleares acoplados a determinadas regiões de genes que respondem à ativação pelos retinóides. Através da promoção ou supressão da expressão de determinadas proteínas, os retinóides podem modificar a oncogênese, produção de fatores de crescimento, matriz de colágeno, sebo e queratina, processos inflamatórios e, desta forma, exercer múltiplos efeitos no crescimento e diferenciação celular (Roos, *et al.*, 1998; Napoli, 1999; Sampaio e Rivitti, 2000)

Ambos os fármacos, ISOTN e TN, atuam sobre a unidade pilossebácea, reduzindo o tamanho e a produção de sebo das glândulas sebáceas e normalizando a queratinização do folículo pilossebáceo. Propriedades estas importantes para o tratamento da acne, porque através da ação dos retinóides há diminuição da produção de comedões (cravos) e da proliferação das bactérias *Propionibacterium acnes*, as quais produzem uma enzima que converte os ésteres lipídicos do seb*o* em ácidos graxos livres, irritantes, e que iniciam o processo de inflamação. Contudo, a ISOTN apresenta algumas vantagens em relação ao seu isômero TN: atividade comedolítica e ação antiinflamatória mais efetiva, além de ser um ativo mais específico na supressão do sebo, menos irritante à pele e menos tóxico ao organismo (Pawson, 1982, Kamm, 1982; Sampaio e Rivitti, 2000; Tadini *et al.*,2006).

Os efeitos colaterais mais comuns associados às doses múltiplas no uso tópico destes retinóides são eritema, ressecamento e ardência da pele, coceira, sensibilidade à luz e descamação, fazendo com que muitos pacientes desistam do tratamento antes de seu término. Estes efeitos parecem estar relacionados à desorganização da barreira da pele, aumento da absorção percutânea e, normalmente, dependem da posologia e dos adjuvantes (como etanol e surfatantes) presentes na formulação, os quais podem intensificar os efeitos adversos. Como a eficácia está frequentemente relacionada à dose, muitos pacientes não conseguem utilizar a dosagem apropriada devido à intolerância ao produto (Effendy *et al.*, 1996; Leyden, 1998; Gollnick e Schramm, 1998).

Formulações contendo estes retinóides são fotodegradadas e oxidadas e têm estabilidade limitada. Por isso, as mesmas devem ser utilizadas à noite e, após abertura da embalagem, sua validade se reduz para três meses (de acordo com a Bula do Isotrex[®]).

Vários estudos estão sendo feitos para obter novas formulações destes retinóides com o objetivo de minimizar a irritação causada por eles e, ao mesmo tempo, preservar ou aumentar

suas ações terapêuticas. Outro objetivo destas pesquisas é aumentar a estabilidade química destes retinóides e, para isto, uma das propostas é a encapsulação destas moléculas em lipossomas (Meybeck *et al.*, 1991; Patel *et al.*, 2000).

Optou-se por trabalhar com ISOTN porque, além das propriedades acima citadas em relação às da TN, existe um número menor de artigos científicos e patentes envolvendo sua encapsulação em lipossomas.

1.2 Lipossomas

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela posologia, retenção ou degradação do ativo, pequena solubilidade e, principalmente, pelos efeitos adversos provenientes da dosagem necessária para se atingir a ação terapêutica desejada. Estas dificuldades impulsionaram pesquisas no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar o ativo terapêutico até o alvo específico para diminuir os efeitos indesejáveis e aumentar a eficiência, com decréscimo da dose administrada.

O primeiro grande passo nesta área ocorreu nos anos 60 com a publicação por Alec Bangham *et al.* (1965), dos resultados sobre a hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de frascos de vidro. Observaram que moléculas de lipídios se organizavam em bicamadas, formando estruturas vesiculares, microscópicas, cujo interior encerrava um compartimento aquoso, denominadas posteriormente de lipossomas (Figura 2). Entretanto, apenas em 1971, Gregoriadis *et al.* mencionaram o potencial de lipossomas como sistemas carreadores de agentes terapêuticos (Lasic, 1992; Santos e Castanho, 2002).



Figura 2: Esquema do corte transversal de um lipossoma, indicando a organização dos fosfolipídios em bicamada lipídica e os possíveis locais para encapsulação de substâncias (adaptado de Lasic, 1992)

Lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, principalmente fosfolipídios de origem natural e sintética. Estas moléculas são constituídas em sua parte apolar por duas cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos que podem ter diferentes comprimentos e insaturações. A parte polar consiste do grupo fosfato ligado a outros grupos polares contendo ou não cargas. As partes são unidas mediante uma molécula de glicerol, através de uma esterificação (New, 1990) (Figura 3). Lipossomas podem conter outros lipídios como colesterol e também surfatantes, antioxidantes, etc.



Figura 3: Fosfolipídios com diferentes cabeças polares (adaptado de New, 1990)

Fosfolipídios, quando dispersos em solução aquosa, organizam-se espontaneamente em bicamadas de modo a não exporem as regiões hidrofóbicas à água, sendo a estrutura mantida mediante interações hidrofóbicas (Lasic, 1993). Os lipossomas apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, nas quais podem ser inseridas outras moléculas (Figura 2). Moléculas solúveis em água podem ser alojadas na região aquosa central, enquanto que moléculas hidrofóbicas são localizadas no interior da bicamada lipídica. Dependendo da complexidade da molécula, ela pode estar parcialmente intercalada na região entre a cabeça polar e a bicamada lipídica. Moléculas também podem estar quimicamente ligadas ao exterior ou interior da superfície lipossomal (Lasic, 1992, Torchilin, 2005). Os lipossomas podem ser morfologicamente classificados de acordo com o tamanho e o número de bicamadas lipídicas em sua constituição (Figura 4). Lipossomas compostos por diversas bicamadas sucessivamente separadas por compartimentos aquosos são chamados de vesículas multilamelares. Lipossomas que apresentam outras vesículas, de tamanhos variados, em seu interior são chamados de multivesiculares. Por último, vesículas que apresentam apenas uma bicamada e uma região central aquosa são denominadas unilamelares, e estas podem ser pequenas ou grandes (New, 1990).



Figura 4: Classificações de lipossomas: (a) vesícula unilamelar pequena (SUV-small unilamellar vesicle); (b) vesícula unilamelar grande (LUV-large unilamellar vesicle); (c) vesícula multilamelar (MLV-multilamellar vesicle); (d) vesícula oligolamelar (OLV-oligolamellar vesicle); (e) vesícula multivesicular (MVV-multivesicular vesicle)

As propriedades dos lipossomas incluem (Storm e Crommelin, 1998; Torchilin, 2005):

- fornecimento simultâneo, num mesmo sistema, de um meio lipofílico e um meio aquoso, possibilitando a incorporação de praticamente qualquer tipo de substância;
- variação das suas propriedades através da composição e método de preparação;
- biocompatibilidade devido à sua biodegradabilidade, toxicidade nula e ausência de imunogenicidade;
- possibilidade de liberação sustentada do seu conteúdo no local de ação;
- possibilidade de diminuição da dosagem terapêutica e concentração do fármaco;
- direcionamento para o local de ação de forma passiva ou através de marcadores específicos colocados em sua superfície;
- proteção do material encapsulado contra degradação;
- aumento da solubilidade de fármacos lipofílicos e anfifílicos;
- redução da toxicidade do agente encapsulado e da ocorrência de efeitos adversos;
- possibilidade de administração *in vivo* por várias vias: intravenosa, ocular, pulmonar, nasal, intramuscular, subcutânea e tópica.

A ação e a capacidade de incorporação de substâncias nos lipossomas dependem de vários fatores, entre os quais podem ser citados: a composição lipídica (diferentes fosfolipídios ligados ou não a polietilenoglicol ou a anticorpos), presença de colesterol, surfatantes e antioxidantes, número de lamelas, tamanho e carga superficial das vesículas, estado termodinâmico das bicamadas (fase gel ou líquido-cristalina), método de preparação e de encapsulação ao ativo, pH e força iônica (New, 1995).

Uma importante característica da configuração lamelar dos fosfolipídios é a existência de temperaturas de transição de fase (T_m), Figura 5, cujo valor depende do comprimento da cadeia hidrofóbica e do grau de insaturação, do grupo da cabeça polar, da hidratação e do efeito de solutos. A transição de fase mais importante ocorre na mudança de um estado mais organizado, dito fase gel (que corresponde a cadeias hidrofóbicas ordenadas e com as ligações C-C em conformação *trans*) para um estado mais fluído, chamado fase líquido-cristalina (no qual as cadeias estão menos organizadas com presença de ligações C-C em conformação *trans*).



Figura 5: (a) Transição de fase gel para líquido-cristalino em membranas de fosfolipídios; (b) Rotação de ligações C-C das cadeias alifáticas dos lipídios abaixo da T_m (conformação *trans*) e acima da T_m (conformação *gauche*) (New, 1990)

Lipossomas são considerados modelos de membranas biológicas por compartilharem propriedades comuns, como a presença de T_m. A fase líquido-cristalina é predominante em membranas biológicas, na qual há necessidade de mudanças conformacionais e de movimentos das proteínas, permeabilidade a determinados solutos e íons. Membranas celulares também contêm entre outros lipídios, o colesterol (normalmente inserido em

lipossomas) que atua como agente estrutural e regulador da fluidez da membrana, alterando sua T_m (New, 1990, Lasic, 1993).

Vários métodos estão disponíveis na literatura para preparar suspensões lipossomais. A escolha depende da aplicação, envolvendo principalmente uma seleção inicial do tipo de lipossoma (MLV, LUV ou SUV) que se deseja, da composição lipídica e das características físico-químicas do fármaco a ser encapsulado. Para isto utilizam-se métodos como a hidratação de filme lipídico seco, injeção em água da solução contendo os lipídios dissolvidos em solventes, evaporação de fase reversa, etc. (New, 1990; Lasic, 1993).

A Figura 6 mostra um esquema simplificado da formação de lipossomas. No caso da metodologia de hidratação do filme lipídico seco, após evaporação do solvente, os lipídios, contendo ou não as moléculas hidrofóbicas a serem encapsuladas, formam um filme na parede do recipiente. A este é adicionado tampão (contendo ou não fármacos hidrofílicos) e através da hidratação e agitação, há desprendimento de fragmentos das bicamadas lipídicas que se fecham formando vesículas multilamelares (MLV). Processos posteriores como extrusão, sonicação e microfluidização podem diminuir o tamanho das vesículas. A escolha do método deve levar em conta a escala de produção (New, 1990; Lasic, 1993). Literaturas básicas para a preparação e análise de lipossomas, além das duas citadas incluem: Torchilin e Weissig (2003) e a série de livros editados por Gregoriadis (1983, 1993, 2006).



Figura 6: Esquema simplificado da formação de vesículas (adaptado de www.avantilipids.com e, Santos e Castanho, 2002)

Devido às propriedades dos lipossomas, vários estudos recentes com estes sistemas como carreadores foram realizados em diversas áreas de aplicação. Como exemplo, pode-se citar aplicações em genética (Zhang *et al.*, 2007), em vacinas (Ogue *et al.*, 2006), no tratamento de neoplasias (Anabousi *et al.*, 2006), em cosméticos (Betz *et al.*, 2005), em dermatologia (Wen *et al.*, 2006), em alimentos (Thompson *et al.*, 2006) e em diagnósticos médicos (Fortin-Ripoche *et al.*, 2006). Existem várias revisões gerais e recentes sobre o tema lipossomas (Torchilin, 2005), sendo duas nacionais (Villanova e Consigliere, 2000; Santos e Castanho, 2002).

O projeto que constituiu esta Tese, envolvendo isotretinoína encapsulada em lipossomas, foi desenvolvido para uso na área dermatológica.

1.3 A pele

A pele (cuja estrutura está esquematizada na Figura 7) é considerada o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 10% de sua massa total e cobrindo uma área aproximada de 1,7 m². Protege o organismo contra microorganismos, agentes químicos externos, choques mecânicos, algumas formas de radiação; ajuda a regular a temperatura corpórea; previne a perda excessiva de eletrólitos e água, e serve como órgão de percepção (tato) (Mezei, 1993; Williams, 2003). A extensão e a facilidade de acesso tornam este órgão um sítio ideal para administração de agentes terapêuticos para ação local ou sistêmica. Porém, a pele é uma barreira altamente eficiente controlando muito bem a entrada e saída de substâncias (Mezei, 1993).

É formada pelas camadas epiderme (e suas subdivisões), derme, subcutânea e os anexos (glândulas sudoríparas, folículos pilosos, glândulas sebáceas, melanócitos e outros) (Sampaio e Rivitti, 2000; Williams, 2003), como mostrado na Figura 7.

A hipoderme ou camada subcutânea corresponde ao tecido adiposo, atua como reservatório, isolante térmico e na proteção mecânica. A derme (que possui espessura de 3 a 5 mm) é um tecido conectivo-elástico, composto predominantemente de fibrilas de colágeno. Possui várias estruturas inseridas em seu interior, como vasos sangüíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas (unidades pilossebáceas) e sudoríparas. Pode ser considerada como água geleificada, a qual representa uma barreira mínima para penetração de muitos fármacos polares e uma barreira significante para moléculas muito lipofílicas. Um fluxo de 0,05 mL/min por mg de pele é muito eficiente na remoção de moléculas que tenham atravessado suas camadas mais externas. Capilares alcançam a

epiderme viável, próximo da junção dermo-epidérmica, assegurando, *in vivo,* que a concentração de muitos permeantes seja pequena na derme (Williams, 2003).



Figura 7: Esquema de uma corte transversal de pele humana. Representação superior corresponde aos queratinócitos diferenciados em cada uma das camadas da epiderme. (adaptado de Williams, 2003)

A epiderme tem espessura variável de 0,06 mm (nas pálpebras) a 0,8 mm na planta dos pés. Contém quatro camadas diferentes, a mais externa denominada o estrato córneo, seguido pelo estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo (basal). Na junção entre o estrato germinativo e a derme são formadas as novas células de queratinas (queratinócitos), as quais passam por várias etapas de diferenciação celular até atingir o estrato córneo e se desprenderem (Figura 7). O estrato córneo (camada cornificada) é composto de 10 a 15 camadas de células queratinizadas, anucleadas e alongadas (corneócitos), ligadas umas às outras por desmossomos e rodeadas por uma matriz lipídica de múltiplas bicamadas, complexa, formada por ceramidas, colesterol, ácido palmítico, sulfato de colesterol e outras substâncias
(Williams, 2003). O estrato córneo serve para regular a perda de água corpórea, previne a entrada de microorganismos, sendo a camada principal na regulação do fluxo de permeantes através da pele (Williams, 2003). O estrato córneo atua como barreira e reservatório, estocando fármacos e outras substâncias químicas por um período de tempo (Zatz, 1993).

O ponto isoelétrico da pele é ~4, portanto, sob condições fisiológicas, a pele pode ser considerada como uma membrana carregada com carga elétrica negativa (Wilkerson, 1935). O pH médio da pele, dependendo da região, varia de 5,4 a 5,6. Esta acidez ocorre em virtude da presença de aminoácidos, ácido lático, ácidos graxos e sais provenientes de secreções das glândulas sebáceas e sudoríparas (Sampaio e Rivitti, 2000).

As rotas difusionais para um ativo penetrar na pele compreendem: 1) caminhos intercelulares (através das bicamadas lipídicas); 2) caminhos intracelulares ou transcelulares (através de corneócitos e lipídios intercelulares) e 3) mediante apêndices cutâneos (Figura 8). Muitas substâncias permeiam por todas estas rotas. Os apêndices são depósitos de formulações, atalhos nos quais o ativo pode difundir diretamente dentro da epiderme viável e da derme. Todavia, esta rota é limitada, pois os apêndices correspondem a 1% apenas da superfície total da pele. A rota via apêndices torna-se importante quando o ativo atua em alguma disfunção destas estruturas e para moléculas com massa molar elevada, cuja difusão é difícil. Na rota intracelular, os corneócitos apresentam uma estrutura de queratinas e proteínas densamente entrelaçadas que dificultam a absorção de ativos dentro das células; permitindo a penetração de algumas moléculas polares, com pequena massa molar. Apesar do caminho tortuoso intercelular, a difusão ao longo das lamelas lipídicas é considerada a principal rota e a maior barreira à permeação de fármacos (Barry, 1983; Bouwstra e Honeywell-Nguyen, 2002).



Figura 8: Representação das diferentes rotas de penetração de ativos na pele (Williams, 2003)

A permeação cutânea é um processo complexo. Inicialmente o fármaco deve sofrer partição do veículo para dentro do estrato córneo, em seguida difundir através da várias camadas da epiderme viável e na derme, local onde o fármaco será retirado pela microcirculação local (Barry, 1983; Zatz, 1993).

Métodos para estudos *in vitro* utilizam pele humana, de animais ou membranas sintéticas, com o objetivo de avaliar procedimentos *screening* e estimar parâmetros físicoquímicos relacionados à permeação. A desvantagem disto é que o método não reproduz a situação real de tecidos vivos, particularmente com respeito à presença de vasos sangüíneos e metabolismo. Contudo, desde que a etapa limitante da velocidade da absorção percutânea de um composto *in vivo* é a difusão através do estrato córneo, uma metodologia *in vitro* pode produzir resultados que mostrem tendências que poderiam ser obtidas se os estudos fossem realizados *in vivo* (Franz, 1975; Lopes, 2000; Walters, 2002).

O transporte de ativos através da pele depende de fatores como parâmetros físicoquímicos do permeante (massa molar, lipofilicidade e carga), condições e tipo da pele, tipo de veículo, presença de outras substâncias (como agentes de penetração) na formulação e condições do experimento como oclusão ou não. Para obter maiores concentrações de fármaco nas primeiras camadas do estrato córneo, o permeante deve ter tendência a migrar do veículo para dentro da pele, impulsionado pela sua maior solubilidade em lipídios (Mezei, 1993; Naik *et al.*, 2000; Walters, 2002).

Sendo o estrato córneo a principal barreira à penetração da maioria dos fármacos na pele, normalmente aplica-se a primeira Lei de Fick (Equação 1) para descrever o processo de difusão do permeante nesta camada (Barry, 1983; Walters, 2002):

$$J = \frac{1}{A} \left(\frac{dQ}{dt} \right) = \frac{DKC}{h} = PC$$
 Equação 1

onde **J** é o fluxo de permeação do fármaco no estado estacionário ($\mu g/(cm^2. h)$); **A** a área da pele exposta ao teste (cm²); **dQ**/**dt** a quantidade de fármaco permeando pela pele por unidade de tempo no estado estacionário ($\mu g/h$); **C** a concentração do fármaco no veículo ($\mu g/mL$); **K** o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e o veículo; **h** o comprimento do caminho efetivo através do estrato córneo (cm); **P** o coeficiente de permeabilidade do fármaco no estrato córneo (cm/h) e **D** o coeficiente de difusão aparente do fármaco (cm²/h).

O ajuste linear na curva obtida da quantidade do fármaco acumulada por área em função do tempo fornece o valor do *lag time* (dado pelo coeficiente linear da porção reta da

curva de permeação) que corresponde ao tempo necessário para o ativo alcançar o estado de equilíbrio e o valor de fluxo (dado pelo coeficiente angular da porção reta da curva de permeação) (Barry, 1983; Walters, 2002).

1.4 Sistemas lipossomais para aplicações na pele

A rota tópica para administrar fármacos pode ter dois objetivos: produzir efeito local para tratamento de desordens da pele ou produzir efeitos sistêmicos. No primeiro caso é desejável que o fármaco penetre no interior da pele e se localize no sítio de ação, com mínima absorção na circulação sanguínea. Por outro lado, para efeito sistêmico o fármaco deve penetrar através da pele e ser retirado adequadamente pela circulação sanguínea para fornecer concentração terapêutica no sítio de ação dentro do organismo (Mezei, 1993).

Em aplicações tópicas, os fármacos são incorporados a pomadas, cremes e géis para que estas preparações transportem e aumentem sua absorção na pele para alcançar locais na epiderme viável e derme. Normalmente estes veículos são pouco eficientes na liberação dos ativos no local da doença ou causam absorção sistêmica indesejada podendo aumentar a intensidade de efeitos adversos. Estudos indicam que uma das maneiras de superar estas dificuldades é utilizar sistemas lipossomais, nos quais o fármaco encontra-se encapsulado (Sharata e Katz, 1996; Redelmeier e Kitson, 1999; Fang, *et al.*, 2006).

Pelas características já mencionadas desses sistemas, os produtos lipossomais aplicados topicamente, em comparação aos convencionais, têm o potencial de eliminar a irritação local, melhorar o efeito local, reduzir (ou aumentar os efeitos sistêmicos se for o objetivo), otimizar a dose terapêutica, fornecer liberação sustentada e, por dissolver substâncias lipofílicas, pode, cosmeticamente, ser mais aceitável que cremes ou géis alcoólicos (Mezei, 1993; El Maghraby *et al.*, 2006).

A interação de lipossomas com a pele, depende de suas características (como lamelaridade, composição e concentração lipídica, carga na superfície e tamanho), do fármaco e de outros ingredientes presentes no produto lipossomal (Kirjavainen *et al.*, 1996; van Kuijk-Meuwissen *et al.*, 1998; van den Bergh, 1998; Šentjurc *et al.*, 1999). Outros estudos indicaram a importância do estado termodinâmico das bicamadas dos lipossomas na permeação do ativo (Hofland *et al.*, 1995; Ogiso *et al.*, 1995). Knepp *et al.* (1988) mostraram que progesterora encapsulada em lipossomas no estado gel apresentou menor fluxo que o fármaco encapsulado em lipossomas no estado líquido-cristalino.

12

Dependendo dos fatores citados, os lipossomas podem agir como promotores (também chamados de agentes) de penetração (Jacobs *et al.* 1988); como microrreservatórios (ou microdepósitos) de fármacos na pele. Tratamentos com lipossomas forneceram maior concentração de fármaco na pele que formulações convencionais, sem aumentar a liberação para a circulação sistêmica (Patel, 1985; du Plessis *et al.*, 1994a; Verma e Fahr, 2004). Cevc e Blume (1992) e Cevc *et al.* (1996) têm referido que vesículas ultradeformáveis (chamadas transfersomas), compostas por fosfolipídios e surfatantes, penetram intactas no estrato córneo, em resposta ao gradiente osmótico.

Outros estudos indicam que ocorre liberação direcionada ou facilitada de ativos encapsulados em lipossomas nos folículos pilosos ou em outros apêndices (Lauer *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 2006), sendo interessante a consulta da revisão feita por Singh, 2000.

O mecanismo de interação lipossomas-pele ainda não está esclarecido. Mezei e Gulaksekharam (1982) sugeriram que as vesículas passam intactas através das camadas superiores da pele em direção à derme, onde ficam localizadas. Outras pesquisas mostram que lipossomas convencionais não penetram intactos na pele. Segundo Hofland *et al.* (1995), Zellmer *et al.* (1995), van der Bergh *et al.* (1998) ocorre adsorção de lipossomas na superfície da pele e mudanças estruturais em camadas mais profundas do estrato córneo causadas pela troca e mistura de constituintes lipossomais e lipídios intercelulares do estrato córneo, facilitando a permeação ou o depósito do ativo na pele. Porém, é possível que lipossomas ultradeformáveis passem intactos pelo estrato córneo (van den Bergh *et al.* 1999; Cevc *et al.* 2002). As interações entre vesículas lipossomais e a pele foram revisadas por Bouwstra e Honeywell-Nguyen (2002) e El maghraby *et al.* (2006).

Sistemas lipossomais também estão sendo investigados para encapsulação de ISOTN, com o objetivo de minimizar seus efeitos adversos (especialmente irritação) através da liberação sustentada do fármaco (pois os lipossomas atuam como microrreservatórios do ativo na epiderme) e aumentar sua estabilidade química.

Cabanas *et al.* (1992) demonstraram que na reparação do foto-envelhecimento de pele de ratos, a formulação lipossomal apresentou melhores resultados, utilizando uma concentração de ácido retinóico 2,5 vezes menor que a convencional. Este estudo demonstrou que a incorporação de TN em lipossomas permite melhor difusão do produto e diminuição da dose. A formulação lipossomal diminuiu o número de comedões em coelhos, além de reduzir a irritação e descamação da pele.

Masini *et al.* (1993), Naeff *et al.* (1998) e Sinico *et al.* (2005) determinaram que as concentrações de TN na pele são maiores utilizando lipossomas do que formulações

13

convencionais. Valores pequenos de fluxo percutâneo e a presença de um reservatório do fármaco no estrato córneo (e também nos folículos pilosos) podem melhorar a eficiência no tratamento da doença. Meybeck *et al.* (1991) e Patel *et al.* (2000), além de verificarem o efeito de depósitos da TN na pele pelo uso do fármaco encapsulado em lipossomas, também observaram que a formulação lipossomal contendo TN foi menos irritante.

Pacientes portadores de *acne vulgaris*, em estudos de Schafer-Korting *et al.* (1994), foram tratados com diferentes géis contendo TN. Os resultados indicaram aumento na tolerabilidade e maior redução dos comedões utilizando o gel lipossomal de tretinoína 0,01% em relação aos géis convencionais com 0,025% e 0,05%. Portanto, utilizou-se uma dose menor da tretinoína sem que houvesse redução da eficácia no tratamento.

Outros estudos mostraram que a unidade pilossebácea é um importante "sítio alvo" para ISOTN (Nelson *et al.*, 2006; Zouboulis, 2006) aplicada na pele. Tschan *et al.*, (1997) notaram que foi liberada uma quantidade significativa de ISOTN lipossomal nas glândulas sebáceas, via rota folicular, em relação aos controles. Este resultado é importante, porque o efeito terapêutico no tratamento da acne possivelmente pode ser alcançado com o emprego de menores quantidades do ativo, desde que este se encontre encapsulado em lipossomas.

Em outros estudos, TN e ISOTN apresentaram maior fotoestabilidade quando encapsuladas em lipossomas (Brisaert *et al.*, 2001; loele *et al.*, 2005)

A revisão bibliográfica mostra que os trabalhos com ISOTN concentram-se mais no tratamento tópico convencional (géis alcoólicos e cremes) (Maddin *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2005) e oral (Orfanos e Zouboulis, 1998, Amichai *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo primordial o desenvolvimento de formulações lipossomais contendo isotretinoína para administração tópica, visando à redução dos efeitos adversos (especialmente irritações cutâneas) e da degradação do fármaco, para o tratamento dermatológico de casos severos de acne e constou das seguintes etapas:

- Preparação de suspensões lipossomais contendo isotretinoína encapsulada;

- Caracterização das formulações desenvolvidas com relação à determinação de tamanho e polidispersidade das vesículas, eficácia de encapsulação do fármaco nos lipossomas, comprovação da presença de ISOTN na bicamada lipídica, etc.

- Verificação da estabilidade física e química das suspensões em função do tempo;

- Avaliação da fotodegradação do fármaco em sistemas lipossomais;

- Análises de permeação cutânea do fármaco encapsulado em lipossomas;

- Realização de testes de irritação primária e cumulativa das formulações lipossomais em coelhos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e outros materiais

Os fármacos utilizados foram isotretinoína e tretinoína (pureza de 99,9%), da Roche.

Os fosfolipídios estruturais usados foram: fosfatidilcolina hidrogenada de soja (Epikuron 200SH, > 95%), fosfatidilcolina não hidrogenada de soja (Epikuron 200, > 93%) e fosfatidilserina (Leci PS85, > 92%), da Degussa Bio Actives.

Os outros reagentes e materiais utilizados foram:

- 1-(4-trimetilamônio fenil)-6-fenil-,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), para espectroscopia de fluorescência, Fluka
- Acetonitrila, grau HPLC, Tedia
- Ácido acético glacial, P.A., Synth
- Ácido ascórbico, P.A., Synth
- Ácido cítrico, P.A., Reagen
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), P. A., Merck
- Ácido fosfotúngstico (H₃PO₄.12WO₃.24H₂O), Sigma
- Ácido perclórico 70%, Merck
- Água desionizada em sistema de purificação Milli-Q, Millipore
- Albumina humana, fração V, 99%, Sigma
- Brij 700, Beraca
- Brij 78, Oxiteno
- Butilhidroxitolueno (BHT), Quiminvest
- Calceína, para espectroscopia de fluorescência, Sigma
- Cloreto de sódio, P.A., Chemco
- Clorofórmio, P.A., Merck
- Colato de sódio, P.A., Acros
- Colesterol, grau farmacêutico, Croda

- Conserve C (mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona), IPEL
- Cremophor RH 40, BASF
- Dimetilformamida, P.A., Fisher
- Etanol grau HPLC, Tedia
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado, P.A., Ecibra
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, P.A., Nuclear
- Glutaraldeído 25%, para microscopia, SEM
- Hidróxido de sódio, P.A., Nuclear
- Hidroxipropilcelulose, Klucel
- lodeto de potássio, P.A., Vetec
- Lipopeg 4S; Lipopeg 4DS e Lipopeg 4DO, Lipo do Brasil
- Metanol, P.A, Merck e Metanol, grau HPLC, Tedia
- Molibdato de amônia, P.A., Synth
- Papel de filtro quantitativo no.5, Whatman
- Pireno, para espectroscopia, Aldrich
- Renex 100, Renex 400, Renex 1000, Oxiteno
- Sacarose, P.A., Synth
- Sephadex G50 grossa, Sigma
- Seringa de vidro de 1 mL e agulha de insulina, BD
- Tetróxido de ósmio 2%, para microscopia, EMS
- Tiossulfato pentahidratado, P.A, Ecibra
- Triton X100, Union Carbide
- Tween 80 e Tween 327, Oxiteno
- Verde de malaquita, para microscopia, Merck
- Volpo N20 (Oleth 20), Croda

No procedimento de extrusão foram utilizadas membranas de policarbonato com diâmetro de poros 100, 400 e 1000 nm, e membranas de poliéster, diâmetro de 47 mm, Osmonics.

A filtração das amostras para análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi realizada em unidades filtrantes Millex HV, diâmetro de poros: 0,22 e 0,45 μ m, Millipore. Os solventes foram filtrados em membranas PTFE (politetrafluoretileno), poros de 0,45 μ m, diâmetro de 47 mm, Millipore.

A estrutura química dos surfatantes e de outras substâncias químicas utilizadas no trabalho estão no Anexo 1.

3.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético com aquecimento, 752A, Fisatom
- Agitador mecânico, adaptado tipo Turrax, haste de 1 cm de diâmetro, Dremel
- Agitador mecânico, haste denteada de 6 cm, 713, Fisatom
- Analisador de tamanho de partículas, Zeta Plus, BI-MAS, Brookhaven INC.
- Balança, AB2045, Mettler Toledo
- Banho termostatizado, 521, Nova Ética
- Banho termostatizado, RTE 111, Neslab
- Bloco de aquecimento/digestor, Q327M242, Quimis
- Bomba de vácuo, Edwards
- Câmara de Neubauer, espelhada, Labor Optik
- Centrífuga Excelsa II, 206-BL, Fanem
- Espectrofotômetro, 8453 e acessório de controle de temperatura, 89090A, HP
- Estufa de secagem, 315SE, Fanem
- Extrusora, LiposoFast-100, Avestin
- Fluorímetro, LS-50, Perkin-Elmer
- Fluorímetro, SPS-500C, SLM Aminco
- Incubadora refrigerada orbital, MA830, Marconi
- Lâmpada fluorescente, 20 W/ 75 RS, Phillips
- Lâmpada UVA, 320 400 nm, 100 W, COMOLUX PLUS
- Medidor de pH, B474, Micronal
- Microcalorímetro, VP-DSC, MicroCal
- Micrômetro, Mitutoyo
- Microscópio eletrônico de transmissão, CEM902, Carl Zeiss, com câmera CCD-Proscan
- Microscópio eletrônico de varredura, JSM-T300, JEOL
- Microscópio óptico, E800 e câmera fotográfica FDX-35 com acessório H-III, Nikon
- Radiômetro, VLX3W, sensor para 365 nm (UVA), Cole-Parmer
- Rota-evaporador, RE111, Büchi

- Sistema de permeação: células de difusão de Franz, banho termostatizado e agitador magnético, Hanson Research
- Ultracentrífuga, Ti80, Beckman
- Ultrasom, Branson 2210 (240 W e 47 kHz) e Unique (240 W e 25 kHz; 100 W e 25 kHz)
- Vortex, Q220, Quimis

Foram utilizados três sistemas de HPLC: (1) uso geral: bomba LC-10AT, sistema controlador SCL-10A e detector UV/VIS SDD-10A, Shimadzu; (2) usado somente no teste de fotodegradação: bomba 600, sistema controlador 600E e detector UV/VIS 484, Waters e (3) usado somente nas análises sobre permeação, bomba 525, controlador e injeção automática 717 plus, detector UV/VIS 2487, Waters. Todos os sistemas utilizaram a mesma coluna cromatográfica de fase reversa: Microsorb-MV C18, 4,6x250 mm, porosidade 5 μ m, Varian.

3.3 Ambiente de manipulação da ISOTN

Para evitar fotodegradação e oxidação do fármaco padrão, foram tomados cuidados durante o seu manuseio, como pesagem sob luz vermelha em *glovebag* contendo N₂ (Figura 9b) após retirada do ar com bomba de vácuo (Figura 9a) e injeção de nitrogênio gasoso.



(a)



(b)



As várias etapas da preparação e manuseio da suspensão lipossomal (colocadas em vidraria de cor âmbar) foram realizadas em ambiente com pouca luz.

3.4 Metodologias para preparação de lipossomas

3.4.1 Método da hidratação do filme lipídico seco

A metodologia, descrita a seguir, foi estabelecida como padrão para preparar lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico seco, após análises das primeiras suspensões lipossomais (item 3.5.1.1) e avaliações de alguns parâmetros experimentais (item 3.5.1.2).

<u>Preparação do filme lipídico</u>: em um balão (100 ou 250 mL) de fundo redondo, foram colocados fosfolipídios, colesterol, surfatantes, antioxidante BHT e isotretinoína. As substâncias foram dissolvidas em 8 mL de clorofórmio e metanol na razão 1:1 (v/v). O balão foi colocado no rota-evaporador, mergulhado até o nível do solvente no banho termostatizado a 35 ou 65±1 °C (dependendo do fosfolipídio) durante 30 min/50 rpm, seguido por 1,5 h em sistema de vácuo Edwards (1 mmHg) para retirada de resíduos de solventes.

<u>Hidratação do filme</u>: o balão contendo o filme foi purgado com N₂ durante 10 min para diminuir a concentração de oxigênio. Adicionou-se, em seguida, 5 mL de solução de tampão citrato 10 mmol/L pH 5,6, previamente purgada com N₂ ou Ar (15 min) e termostatizada na temperatura do banho (35 ou 65 °C). Foram usadas pérolas de vidro para facilitar a remoção do filme lipídico. O balão foi colocado no rota-evaporador e a hidratação foi feita em banho termostatizado a 35 ou 65±1 °C (dependendo do fosfolipídio), durante 30 min/140 rpm. Durante a hidratação, o sistema foi mantido sob purga de N₂ para minimizar a oxidação do fármaco. A suspensão foi deixada em repouso no escuro, em temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 min. A razão molar ISOTN/lipídios obtida foi ~0,0260:1. A concentração final de ISOTN foi em torno de 1 mmol/L.

Foram preparadas algumas suspensões lipossomais sem o fármaco (lipossomas vazios), utilizando este mesmo procedimento.

A Tabela 1 apresenta as quantidades (em massa e mol) dos lipídios e surfatante utilizadas nas preparações das principais suspensões lipossomais (suspensões escolhidas pela maior porcentagem de encapsulação do fármaco), como também, as nomeclaturas destas suspensões. Cada uma destas suspensões foi preparada pelo menos três vezes para confirmação de alguns resultados.

20

Tabela 1: Quantidade em massa e mol dos constituintes lipofílicos das principais suspensões lipossomais

suspensões	suspensões	quantidade de lipídios	
lipossomais <u>sem</u>	lipossomais <u>com</u>	e surfatante	
ISOTN encapsulada	ISOTN encapsulada *	massa (mg)	mol (μmol)
Lipo_PC vazio	Lipo_PC ou Lipo_PC(ISOTN5µmol)	149	192,2
Lipo_PC/Col vazio	Lipo_PC/Col ou Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN5µmol)	119 e [14,9]**	153,8 e [38,4]
Lipo_PC/PS vazio	Lipo_PC/PS ou Lipo_PC/PS(90/10)(ISOTN5µmol)	134 e [15,3]	173,0 e [19,2]
Lipo_HPC/PC vazio	Lipo_HPC/PC ou Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5µmol)	90 e [59,5]	115,1 e [76,7]
Lipo_HPC/DO vazio	Lipo_HPC/DO ou Lipo_HPC/DO(60/40)(ISOTN5µmol)	90 e [68,9]	115,1 e [76,7]
Lipo_HPC vazio	Lipo_HPC ou Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	150	191,8

Fosfatidilcolina saturada = HPC; fosfatidilcolina insaturada = PC; fosfatidilserina = PS; colesterol = Col e surfatante Lipopeg 4DO = DO.

(*) Suspensões lipossomais (5 mL) com ISOTN encapsulada, contém ~1,5 mg (ou 5,0 μmol) do fármaco. (**) O número entre chaves corresponde aos valores, em massa ou mol, do segundo componente lipofílico estrutural dos lipossomas (ex: colesterol em Lipo PC/Col).

3.4.2 Método da injeção com etanol

Em um recipiente contendo 0,375 mL de solução de ISOTN em etanol (13,3 mmol/L) e 0,2% (m/m lipídios) de BHT, foram adicionadas fosfatidilcolina HPC ou PC (~150 mg). A solução foi aquecida a 55 °C. Utilizando seringa de vidro de 1 mL e agulha de insulina, injetouse rapidamente esta mistura em 4,7 mL de solução tampão citrato 10 mmol/L pH 5,6 contida em uma camisa de vidro termostatizada a 35 ou 65 ± 2 °C (dependendo do fosfolipídio), sob agitação mecânica durante 10 min/5000 rpm e fluxo de N₂. A suspensão ficou sob fluxo de N₂ durante 20 min na camisa termostatizada e foi mantida em repouso, no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min. A concentração final esperada de ISOTN foi ~1 mmol/L e a razão molar ISOTN/lipídio foi ~0,0260:1.

3.4.3 Método da encapsulação passiva

Inicialmente foi preparada uma suspensão de lipossomas vazios de fosfatidilcolina HPC ou PC (48,1 mmol/L) em solução de tampão citrato 10 mmol/L pH 5,6, pelo método da hidratação do filme lipídico seco (item 3.4.1), seguido de extrusão em membranas com porosidade de 100 nm (item 3.6.1). Em balão (50 mL) de fundo redondo, foram adicionados 4 mL desta suspensão de lipossomas vazios extrudados, 500 μL de ISOTN dissolvida em etanol (10 mmol/L) e 0,5 mL de tampão citrato, obtendo-se uma concentração final ~1 mmol/L de ISOTN e razão molar ISOTN/lipídio foi ~0,0260:1. O balão foi agitado no rotaevaporador (sem vácuo) a 140 rpm, aquecido a 35 ou 65±1 °C (dependendo do fosfolipídio) durante 30 min. A suspensão permaneceu em repouso no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min.

3.5 Desenvolvimento de suspensões lipossomais pelo método da hidratação do filme lipídico seco

3.5.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina saturada HPC

3.5.1.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina HPC contendo diferentes números de moles de ISOTN

Foram preparadas suspensões lipossomais fixando-se a concentração de fosfatidilcolina HPC em ~150 mg (192 μmol) e variando-se o número de moles de ISOTN. Foram obtidas diferentes razões molares totais de ISOTN/HPC: 0,0104:1 (2 μmol de ISOTN); 0,0260:1 (5 μmol de ISOTN); 0,0654:1 (12,5 μmol de ISOTN) e 0,1639:1 (31,5 μmol de ISOTN). As suspensões foram denominadas respectivamente de **Lipo_HPC(ISOTN2µmol)**, **Lipo_HPC(ISOTN5µmol)**, **Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol)** e **Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol)**. A concentração de BHT foi estabelecida em 0,1% (m/m lipídio) e a mistura de clorofórmio/metanol usada foi de 2:1 (v/v), com o balão mergulhado no nível do solvente para formação do filme lipídico. A hidratação foi feita com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6 durante 30 min. Estas suspensões foram avaliadas em relação à eficiência de encapsulação (%EE), utilizando-se os métodos de centrifugação e gradiente de densidade. A presença de cristais de ISOTN foi também detectada por microscopia óptica e analisados parâmetros termodinâmicos por microcalorimetria. As suspensões foram avaliadas logo após a preparação (0 dias) e após 42 dias de repouso em geladeira (8 °C).

3.5.1.2 Avaliação da encapsulação de ISOTN em lipossomas de fosfatidilcolina HPC em função de parâmetros experimentais da preparação lipossomal

Nestes testes foram utilizados150 mg de fosfatidilcolina HPC e ~1,5 mg de ISOTN, correspondendo à formulação **Lipo_HPC(ISOTN5μmol)** do item 3.5.1.1.

3.5.1.2.1 Efeito do solvente na formação do filme lipídico

Foram testados diferentes solventes: metanol, clorofórmio ou mistura de metanol/clorofórmio 1:1 (v/v). Os outros parâmetros foram fixados conforme esquema a seguir. Após a hidratação foi analisada, por HPLC, a possível degradação da ISOTN. Quinze dias após terem sido preparadas, as amostras foram visualizadas ao microscópio óptico para verificar a presença de cristais de ISOTN.

Filme Filme Solvente: TESTE Posição: balão mergulhado no nível do solvente BHT: 0,1% (m/m lipídio)	
Hidratação → com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6 por 30 min	

3.5.1.2.2 Efeito da posição do balão durante formação do filme lipídico

Foi testada a posição do balão durante evaporação do solvente: acima do banho do rotaevaporador (T~40 °C) (Figura 10a); mergulhado até o nível do solvente (T~65 °C) (Figura 10b) e mergulhado totalmente no banho (T ~65 °C) (Figura 10c).



Figura 10: Posição do balão de fundo redondo em relação ao banho do rotaevaporador na obtenção do filme lipídico: (a) balão acima do banho, (b) balão mergulhado até o nível do solvente e (c) balão mergulhado totalmente no banho

As outras condições estão fixadas conforme indicado a seguir. Foram avaliados os aspectos visuais dos filmes obtidos. Após hidratação, as amostras foram analisadas, mediante

HPLC, em relação à possível degradação da ISOTN e 15 dias após terem sido produzidas foram visualizadas ao microscópio óptico para verificar a presença de cristais de ISOTN.

Filme Solvente: metanol/clorofórmio 1:1 (v/v) Posição: TESTE BHT: 0.1% (m/m lipídio)

Hidratação → com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6 por 30 min

3.5.1.2.3 Efeito da concentração de antioxidante BHT

Variou-se a concentração de BHT: 0; 0,05; 0,1 e 0,2% (m/m lipídio), fixando-se as outras condições conforme esquema seguinte. As amostras foram analisadas por HPLC e microscopia óptica no dia da preparação e após 15 dias.

Filme Filme Solvente: metanol/clorofórmio 1:1 (v/v) Posição: balão mergulhado no nível do solvente BHT: TESTE
Hidratação → com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6 por 30 min

3.5.1.2.4 Efeito do tempo de hidratação e temperatura de armazenagem da suspensão lipossomal

Foram retiradas amostras de suspensão lipossomal após 30, 60 e 120 min de hidratação com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6. A amostra obtida após 30 min de hidratação foi dividida: uma parte foi armazenada a 8 °C e a outra em 25 °C. As amostras coletadas após 60 e 120 min de hidratação foram mantidas a 8 °C. Em outro teste, o filme foi hidratado lentamente com pequenas porções da solução de hidratação (adicionando 300 μ L a cada 3,5 min) durante 60 min. As outras condições foram fixadas e estão esquematizadas a seguir. As suspensões foram analisadas mediante HPLC e microscopia óptica 15 dias após terem sido preparadas.

Filme Solvente : metanol/clorofórmio 1:1 (v/v) Posição: balão mergulhado no nível do solvente BHT: 0,2% (m/m lipídio)	
Hidratação → TESTE (tempo)	

3.5.1.2.5 Efeito da solução de hidratação

Foram avaliadas diferentes soluções de hidratação: tampão citrato 10 mmol/L pH 5,6, força iônica (**fi**) de 28 mmol/L; tampão citrato 50 mmol/L, pH 5,6 (fi=158mmol/L); solução 0,9% (m/v) de NaCl (fi=154 mmol/L) e 2% (m/v) de NaCl (fi=342 mmol/L), pH 6. A hidratação foi realizada durante 30 min e os outros parâmetros foram fixados conforme indicado a seguir. As suspensões foram analisadas por HPLC e microscopia óptica 15 dias após terem sido preparadas.

Filme {	Solvente: metanol/clorofórmio 1:1 (v/v) Posição: balão mergulhado no nível do solvente BHT: 0,2% (m/m lipídio)
Hidratação → TESTE (solução)	

3.5.1.3 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina HPC e outras substâncias lipofílicas

3.5.1.3.1 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com surfatantes

Foram preparadas suspensões, seguindo o procedimento indicado no item 3.4.1, contendo misturas de fosfatidilcolina HPC com colato de sódio (5, 10 e 20% mol), Volpo 20 (10 a 20% mol), Lipopeg 4S (20 e 40% mol), Lipopeg 4DS (20 e 40% mol) e Lipopeg 4DO (20, 30 e 40% mol). Foram obtidas razões molares de ISOTN/(substâncias lipofílicas) ~0,026:1, fixando-se a quantidade de fosfatidilcolina HPC + surfatante em ~192 µmol e ISOTN em 5 µmol. As amostras foram analisadas por microscopia óptica 15 dias após a preparação. As suspensões de HPC e algumas misturas com surfatantes, contendo ou não ISOTN, foram avaliadas por microcalorimetria (conforme descrito no item 3.9.7).

3.5.1.3.2 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com PC ou colesterol

Foram preparadas também suspensões, seguindo o procedimento indicado no item 3.4.1, contendo misturas de fosfatidilcolina saturada HPC e fosfatidilcolina insaturada PC. As suspensões foram constituídas por 25, 30, 40, 50, 75 e 100% mol de PC; denominadas Lipo_HPC/PC(75/25)(ISOTN5µmol), Lipo_HPC/PC(70/30)(ISOTN5µmol), etc.. Foi também preparada a suspensão lipossomal de HPC contendo 20% mol de colesterol. Foram obtidas razões molares de ISOTN/(substâncias lipofílicas) ~0,026:1, fixando-se a quantidade de

fosfatidilcolina HPC + PC (ou colesterol) em ~192 μ mol. As suspensões foram avaliadas por microscopia óptica 15 dias após a preparação. Algumas destas suspensões foram analisadas por microcalorimetria (item 3.9.7).

3.5.2 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina insaturada PC

3.5.2.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina PC contendo diferentes números de moles de ISOTN

Foram preparadas suspensões lipossomais (procedimento descrito no item 3.4.1), fixando-se a concentração de fosfatidilcolina PC em ~149 mg (192 μmol) e variando-se a concentração de ISOTN. As suspensões lipossomais apresentaram as seguintes razões molares de ISOTN/PC: 0,0207:1 (4 μmol de ISOTN); 0,0260:1 (5 μmol de ISOTN); 0,0352:1 (6,8 μmol de ISOTN) e 0,0543:1 (10,4 μmol de ISOTN), sendo denominadas de Lipo_PC(ISOTN4μmol); Lipo_PC(ISOTN5μmol); Lipo_PC(ISOTN6,8μmol) e Lipo_PC (ISOTN10,4μmol), respectivamente. Todas elas foram analisadas por microscopia óptica 15 dias após a preparação.

3.5.2.2 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina PC e outras substâncias lipofílicas

Foram preparadas suspensões lipossomais (segundo procedimento indicado no item 3.4.1) contendo misturas de fosfatidilcolina PC e colesterol (15, 20 e 30% mol) e diferentes concentrações de ISOTN. As razões molares ISOTN/lipídios foram: 0,0207:1 (4 μmol de ISOTN); 0,0260:1 (5 μmol de ISOTN); 0,0352:1 (6,8 μmol de ISOTN), sendo utilizado no total 192 μmol de lipídios. As suspensões foram chamadas de Lipo_PC/Col(85/15)(ISOTN4μmol); Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN4μmol); Lipo_PC/Col (70/30)(ISOTN4μmol); Lipo_PC/Col(85/15) (ISOTN5μmol), etc.. Preparou-se, também, uma suspensão de fosfatidilcolina insaturada PC com fosfatidilserina PS (10% mol – razão molar ISOTN/(PC+PS): 0,026:1), denominada Lipo_PC/PS(90/10)(ITN5μmol). Todas elas foram analisadas por microscopia óptica 15 dias após serem preparadas.

3.6 Metodologias para diminuição do tamanho de lipossomas

3.6.1 Extrusão

As suspensões lipossomais foram transferidas para o cilindro da extrusora (Figura 11a) mantido a 20 ou 65±1 °C, dependendo dos fosfolipídios presentes. Após termostatização, os lipossomas foram forçados por gás argônio (pressão <10 kgf/cm²) contra duas membranas de policarbonato com tamanho definido de poros (100, 400 ou 1000 nm). Na Figura 11b pode-se visualizar as membranas dentro do suporte. A suspensão lipossomal extrudada foi recolhida e transferida novamente para dentro do cilindro de extrusão, termostatizada e novamente passou pelo processo de extrusão, sendo empregados ao todo 10 ciclos. Após 0, 1, 3, 5, 7 e 10 ciclos de extrusão, as amostras dos lipossomas extrudados foram coletadas para análise do tamanho das vesículas (procedimento descrito no item 3.9.3) e para verificar, por HPLC, a possível degradação da ISOTN. Quinze dias após serem preparadas, mediante microscopia óptica, foi avaliada a presença de cristais de ISOTN.



Figura 11: (a) Extrusora utilizada para diminuição do tamanho dos lipossomas; (b) suporte e membranas para extrusão

3.6.2 Ultra-som

O banho de ultra-som é constituído por um gerador que converte a energia elétrica da rede (corrente alternada de 50-60 Hz) em energia elétrica na freqüência de ultra-som desejada e por um transdutor que converte esta energia do gerador em vibração mecânica. O transdutor (produzido com cerâmica piezoelétrica) apresenta a propriedade de alterar seu tamanho quando sobre ele é aplicada uma corrente elétrica. A freqüência ressonante do transdutor é determinada por sua geometria e composição. Vibrações dessa natureza, quando aplicadas a

um meio líquido, provocam um fenômeno físico denominado cavitação (Manson, 1989; Suslick, 1989).

Durante a propagação das ondas ultra-sônicas no líquido, criam-se zonas de maior e menor concentração destas ondas devido à compressão e expansão de moléculas adjacentes. As regiões de maior concentração de ondas caracterizam-se pela compressão do líquido e pressão positiva. As regiões de menor concentração correspondem à rarefação ou expansão e pressão negativa. Durante a fase de rarefação, a pressão negativa da onda sonora cria cavidades (bolhas) no meio líquido. A bolha ao atingir seu tamanho máximo (na metade do ciclo de rarefação), começa a colapsar resultando em completa implosão com liberação de energia local (Figura 12). A temperatura de implosão no interior da cavidade pode alcançar valores de 5500 °C, enquanto que ao redor da cavidade ~ 2100 °C, e pressão ~ 500 atm. São as cavitações e as implosões das microbolhas com liberação de calor e pressão, as responsáveis pelo efeito ultra-sônico desejado (Manson, 1989; Martines *et al.*, 2000; Fuchs, 2002).



Figura 12: Formação de cavitações pela presença de região de maior e menor concentração de ondas ultra-sônicas. Figura adaptada de Fuchs (2002)

Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina HPC (192 µmol) contendo ou não o fármaco encapsulado (5 µmol) foram processadas 10 vezes na extrusora utilizando membranas de policarbonato (tamanho de poros igual a 200 ou 1000 nm) a 65±1 °C. As suspensões (3 mL), extrudadas ou não, foram colocadas em tubos de ensaio, e estes foram arranjados na região central nos banhos de ultra-som (240 W/25 kHz; 1000 W/25 kHz; 240 W/47 kHZ). A sonicação (processo que utiliza o ultra-som) foi feita à 65±2 °C, sendo retiradas amostras 15; 30; 45; 60 e 90 min depois de iniciada a sonicação. Para cada amostra coletada foi medido o tamanho dos lipossomas após 2 h de repouso e verificada a degradação da ISOTN mediante HPLC.

3.7 Metodologias para separação do fármaco livre

3.7.1 Centrifugação

A suspensão lipossomal foi centrifugada a 1200 xg durante 1 h (centrífuga Fanem) ou 145600 xg durante 2 h a 4 °C (ultracentrífuga Beckman). O sobrenadante foi recolhido e o precipitado amarelado foi ressuspenso em balão volumétrico contendo solução de tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6. As concentrações de ISOTN na suspensão inicial (não centrifugada), no precipitado ressuspenso e no sobrenadante, foram quantificadas por espectroscopia UV/VIS ou por HPLC.

3.7.2 Filtração em colunas de Sephadex



Figura 13 : Coluna de Sephadex

Foi utilizado o método descrito em New (1990). Fixou-se uma porção de lã de vidro em uma seringa de plástico (1 mL), adicionando em seguida água desionizada e, lentamente, a suspensão de Sephadex hidratada até a marca de 5 mL (Figura 13). O sistema foi centrifugado a 1200 xg durante 1 min (centrífuga Fanem) e lavado 10 vezes com água desionizada, 2 vezes com tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6, uma vez com suspensão de lipossomas vazios (para saturar a coluna com lipídios) e 6 vezes com tampão. Adicionou-se à coluna 1 mL da suspensão lipossomal e centrifugou-se a 1200 xg durante 1 min. O

líquido recolhido no tubo foi transferido para outra coluna de Sephadex e novamente centrifugado. O filtrado foi guardado. As colunas foram lavadas 10 vezes com água desionizada. O filtrado contendo a maior parte dos lipossomas e as águas de lavagem foram analisadas por espectroscopia UV/VIS, microscopia óptica e, também, foi verificada a distribuição de tamanho dos lipossomas.

3.7.3 Gradiente de densidade

O gradiente foi construído em um tubo Eppendorf com 1,5 mL ou em tubo de vidro de igual diâmetro. Transferiu-se para o tubo 0,2 μ L de sacarose 50% (m/v), seguida pela adição bem lenta de 1 mL de solução de sacarose 15% (m/v) e, por último, foram adicionados 100 μ L de suspensão lipossomal (Figura 14a). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os tubos foram tampados e centrifugados por 1,5 h a 1200 xg (centrífuga Fanem) em 25 °C. Em

seguida a fração superior (contendo os lipossomas) foi retirada e transferida para balão volumétrico, cujo volume foi completado com metanol para quantificar a ISOTN por espectroscopia UV/VIS. A presença de halo amarelo na interface das soluções de sacarose 50/15% (m/v) revela os cristais de ISOTN (Figura 14b).

Para determinar o gradiente mais eficiente para separar lipossomas e cristais, foram utilizados lipossomas vazios produzidos com fosfatidilcolina HPC (192 μmol), mistura de suspensão de lipossomas vazios e cristais de ISOTN e suspensão de lipossomas com ISOTN encapsulada (razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1). A melhor separação ocorreu utilizando as soluções 50 e 15% (m/v) de sacarose em tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6.



Figura 14: Esquema da separação do fármaco livre do encapsulado pelo método de gradiente de densidade de sacarose: (a) antes da centrifugação e (b) após centrifugação a 1200 xg/1,5 h

3.8 Preparação de gel de hidroxipropilcelulose

Nos testes sobre fotodegradação e permeação cutânea, as suspensões lipossomais contendo ISOTN encapsulada foram incorporadas em gel aquoso de hidroxipropilcelulose e comparadas com ISOTN dissolvida em gel alcoólico de hidroxipropilcelulose.

<u>Gel aquoso</u>: em um recipiente contendo tampão citrato 10 mM, pH 5,6, adicionou-se lentamente hidroxipropilcelulose em pó (2,2% (m/m)), sob constante agitação mecânica a 680 rpm até desaparecerem todos os grumos do espessante. Adicionou-se, então, a solução de EDTA 0,05% (m/v) e 0,1% (v/v) de solução de conservante Conserve C. Manteve-se a agitação até completa homogeneização.

<u>Gel aquoso lipossomal contendo ISOTN</u>: as suspensões lipossomais (960 μ mol de lipídios, razão ISOTN/lipídios ~0,026:1) foram misturadas com gel aquoso de hidroxipropilcelulose, na proporção em massa de ~1:4 (suspensão/gel), obtendo-se uma concentração final de 0,025% (m/m) de ISOTN e 2,5% (m/m) de lipídios. A mistura foi homogeneizada no escuro e sob fluxo de N₂. A integridade das vesículas e presença de cristais

de ITN no gel foram acompanhados por microscopia durante 6 meses, não apresentando variações significativas neste período.

<u>Gel alcoólico</u>: em um recipiente contendo etanol (grau HPLC) e BHT, adicionou-se lentamente o pó de hidroxipropilcelulose (2,2% (m/m)), sob constante agitação mecânica a 680 rpm, até desaparecerem todos os grumos do espessante.

<u>Gel alcoólico contendo ISOTN</u>: ISOTN foi dissolvida em álcool, antes de ser adicionada ao gel alcoólico. A concentração final de ISOTN foi 0,025 ou 0,05% (m/m).

Os géis foram mantidos em frasco âmbar e a 8 °C, em geladeira. A quantificação da ISOTN por HPLC foi realizada após dispersão do gel em metanol e filtração em unidades Millipore (0,45 μm).

3.9 Caracterização dos lipossomas

3.9.1 Quantificação da ISOTN e lipídios

3.9.1.1 Determinação da concentração de ISOTN em soluções ou em lipossomas por espectroscopia UV/VIS

Foi adicionada, em balão volumétrico, uma alíquota de suspensão lipossomal ou de solução alcoólica contendo ISOTN e o volume foi completado com metanol ou etanol para obter uma concentração de ~20 μ mol/L. Foram preparadas, no mínimo, duplicatas das soluções. Foram obtidas curvas de calibração utilizando-se soluções com diferentes concentrações do fármaco. As medidas da absorbância das soluções foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS a temperatura ambiente. O λ_{max} (comprimentos de onda de máxima absorção) da ISOTN, dependendo do álcool utilizado, variou de 340 a 344 nm.

3.9.1.2 Determinação da concentração de ISOTN em soluções ou em lipossomas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para injeção de amostras no cromatógrafo líquido, alíquotas de suspensões lipossomais ou géis contendo ISOTN foram diluídas em metanol grau HPLC e depois filtradas em unidades Millipore (0,22 ou 0,45 μm). As soluções de surfatantes contendo ISOTN e as soluções dos padrões de ISOTN e TN também foram filtradas.

Foram utilizados três cromatógrafos, mencionados no item 3.2. A fase móvel isocrática foi constituída por acetonitrila, água e ácido acético glacial na proporção de 85:14,5:0,5 (v/v), de

31

acordo com a Farmacopéia Européia (1997) e Bun *et al.* (1990). A fase móvel foi filtrada em membrana Millipore PTFE e o ar retirado sob vácuo e ultra-som. A coluna de fase reversa C18 foi deixada em equilíbrio com a fase móvel durante, pelo menos, 1 h a 25 °C. Foram utilizados fluxo de 1 mL/min e detector UV/VIS em 358 nm. O volume injetado de amostra foi de 20 μL.

Como os ensaios sobre permeação envolveram concentrações pequenas de ISOTN e TN (< µmol/L), foi necessário avaliar alguns parâmetros importantes do sistema cromatográfico:

Precisão da análise de HPLC é a habilidade do método de reproduzir o mesmo resultado (Skoog *et al.*, 2002). As soluções padrão de ISOTN e TN (20 μmol/L), como também, a solução alcoólica de ISOTN lipossomal (20 μmol/L) foram injetadas 6 vezes no cromatógrafo.

Pureza ou presença de isômeros: a solução padrão de ISOTN (20 μmol/L) foi injetada no sistema HPLC em triplicata. A área dos isômeros, principalmente TN, deve ser menor que 2% da área da ISOTN (Farmacopéia Européia, 1997).

Resolução: é a eficiência de separação de compostos que eluem em tempos semelhantes. Soluções padrões contendo de ISOTN e TN (20 μmol/L) foram injetadas no cromatógrafo. Se o valor do parâmetro "Re" (Equação 2) for maior que 1,5, ocorre adequada separação dos picos cromatográficos (Skoog *et al.*, 2002).

$$Re = \frac{2(t_{r_2} - t_{r_1})}{w_2 + w_1}$$
 Equação 2

onde *tr* corresponde ao tempo de retenção (período entre a injeção da amostra e a detecção da substância) e w à largura da base do pico de cada componente na solução. Os índices 1 e 2 estão relacionados à ISOTN e TN, respectivamente.

Intervalo de linearidade: verificou-se a proporcionalidade entre a área versus a concentração do fármaco no intervalo analítico de trabalho. Foram injetadas, em triplicata, soluções em metanol contendo 7,0 nmol/L a 104,5 μmol/L de ISOTN e 7,0 nmol/L a 20,0 μmol/L de TN. Foi injetado apenas o metanol como referência. A curva de calibração foi obtida através do gráfico da área do pico cromatográfico x concentração. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r) obtido via regressão linear. Sendo a concentração proporcional à área, a concentração de ISOTN na amostra pode ser obtida utilizando um padrão de referência simples (Equação 3) ao invés da equação da curva de calibração (Skoog *et al.*, 2002):

$$C_a = \frac{C_p A_a}{A_p} x100 \,(\%) \qquad \qquad \text{Equação 3}$$

onde C_a e A_a correspondem à concentração e área da amostra, respectivamente, e C_p e A_p referem-se ao padrão.

Limite de detecção (LD) é a menor concentração de fármaco que pode ser detectada acima do ruído da linha de base, em um nível confiável (preciso e exato), sendo obtido pela Equação 4 (Skoog *et al.*, 2002):

$$LD = \frac{3.\delta_{br}}{coef.ang.}$$

Equação 4

onde δ_{br} corresponde ao desvio padrão da referência (metanol, injetado 6 vezes) e *coef.ang.* é o coeficiente angular da curva de calibração, obtido por regressão linear.

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de ISOTN que pode ser reproduzida quantitativamente acima do ruído da linha de base, em um nível confiável (preciso e exato), sendo fornecido pela Equação 5 (Skoog *et al.*, 2002):

$$LQ = \frac{10.\delta_{br}}{coef.ang.}$$

Equação 5

3.9.1.3 Determinação da concentração de lipídios (ensaio fosfato)

Utilizou-se o procedimento descrito por Rouse *et al.* (1966), o qual se baseia na formação de um complexo azulado do fósforo com molibdato de amônio. Foram adicionadas determinadas alíquotas, em triplicata, de suspensão lipossomal ou da solução padrão em tubos de ensaio previamente lavados com solução sulfonítrica. O solvente foi evaporado em estufa a 70±2 °C e a cada tubo foram adicionados 0,65 mL de ácido perclórico 70% sendo a digestão feita em bloco de aquecimento a 180 °C durante 30 min. Após resfriamento dos tubos, foram adicionados 3,3 mL de água, 0,5 mL de solução de molibdato de amônio 2,5% (m/v) e 0,5 mL de solução de ácido ascórbico 10% (m/v). Os tubos foram agitados 4 vezes em vortex e deixados por 7 min em banho-maria. Foi preparada uma referência (branco), isto é, tubo contendo os mesmos reagentes com exceção da amostra. As absorbâncias das soluções resfriadas foram medidas em 815 nm.

3.9.2 Determinação da eficiência de encapsulação, razão ISOTN/lipídios e coeficiente de partição membrana/tampão

Foi quantificada a concentração de lipídios (item 3.9.1.3) e de ISOTN (item 3.9.1.1 e 3.9.1.2) nas suspensões lipossomais iniciais, nas suspensões após separação do fármaco livre e também nos sobrenadantes (quando foi realizada a centrifugação).

A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada pela Equação 6:

$$\% EE = \frac{[ISOTN]_{as}}{[ISOTN]_{inicial}} x100$$
 Equação 6

onde **[ISOTN]**_{as} corresponde à concentração da ISOTN nos lipossomas após separação do fármaco livre do encapsulado (por centrifugação ou gradiente de densidade) e **[ISOTN]**_{inicial} a concentração de ISOTN adicionada ao balão. Após centrifugação, também foi verificada a porcentagem de lipídios na suspensão em relação à quantidade de lipídios adicionados no balão.

A **razão molar ISOTN/lipídios**, após separação do fármaco livre, foi também utilizada para verificar a encapsulação do fármaco e comparada como valor teórico (mols de ISOTN e lipídios adicionados ao balão para preparar os lipossomas).

Para algumas suspensões lipossomais foi determinado o **coeficiente de partição** ($P_{l/a}$) do fármaco entre as fases (lipossomas e tampão) de acordo com a Equação 7:

$$P_{l/a} = \frac{n_l / V_l}{n_a / V_a}$$
 Equação 7

onde *n* é o número de mols de ISOTN e *V* corresponde ao volume; os subscritos *I* e *a* referemse às fases lipossomal e água (tampão), respectivamente. Após separação do fármaco livre por centrifugação, *n*_l correspondeu à quantidade de ISOTN ligada à fase lipídica (precipitado) e *n*_a a quantidade de ISOTN não encapsulada (residual) que permaneceu no sobrenadante. Considerou-se nos cálculos a densidade dos lipídios em 1 g/mL (de Paula e Schreier, 1996).

3.9.3 Determinação de tamanho de lipossomas

A distribuição de tamanhos dos lipossomas foi analisada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também denominada espalhamento dinâmico ou quase elástico de luz.

O movimento Browniano de partículas pequenas em um líquido causa flutuações na intensidade da luz espalhada (dependente do tempo), gerada em um laser He-Ne, que incide sobre as partículas e que é detectada em um ângulo de 90° em relação à radiação incidente. Partículas pequenas se movimentam mais rapidamente que partículas grandes, causando diferentes flutuações da radiação espalhada que chegam ao detector. Estas flutuações estão relacionadas ao coeficiente de difusão translacional (D_t), que por sua vez, permite determinar o raio hidrodinâmico médio (R_h) das partículas, através da relação $D_t=kT/6\pi\eta R_h$, onde k é a constante de Boltzmann; T a temperatura absoluta e η a viscosidade do líquido (New, 1990; Ostrowsky, 1993).

Em uma cubeta de policarbonato, contendo água desionizada, foram adicionadas gotas da suspensão lipossomal. Após homogeneização do meio, o diâmetro médio e o índice de polidispersidade (IP) foram medidos. IP reflete a distribuição de tamanho das partículas e varia de 0 a 1. Esta determinação foi feita em triplicata.

3.9.4 Microscopia óptica com luz polarizada.

Considerando que a ISOTN não foi encapsulada totalmente nos lipossomas, provavelmente estará presente na suspensão na forma de cristais devido à sua pequena solubilidade em água. Para verificar a presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais, estas foram visualizadas (em triplicata) em microscópio óptico provido de polarizador (Manosroi *et al.*, 2003). Foram colocados 5 μ L do material sob uma lâmina de vidro coberta com lamínula. Os cristais de fármaco foram contados manualmente em uma câmara de Neubauer (Figura 15a).



(a)

Figura 15: Câmara de Neubauer usada para contagem de cristais. (a) visualização externa da câmara; (b) área de contagem sob luz polarizada e objetiva de 4x (barra de 0,3 mm)

Esta câmara consiste de uma lâmina de microscopia cuja parte central apresenta duas regiões com marcações de dimensões bem definidas (9 quadrantes de 1 x 1 mm), Figura 15b. Os cristais foram contados nos quatro quadrantes externos, utilizando objetiva de 20x (aumento nas fotografias de 694,5x). Na Figura 15b, os vários pontos coloridos correspondem aos cristais de ISOTN. A objetiva de 4x corresponde a um aumento real nas fotografias de 138,9x.

3.9.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Os lipossomas extrudados (em membranas com poros de 400 nm de diâmetro) foram corados com ácido fosfotúngstico 1% (m/v) em água (New, 1990). Foi colocada 1 gota da suspensão lipossomal (1 mmol/L) em uma grade de cobre coberta com filme polimérico (parlódio) e carbono, permanecendo assim durante 3 min para fixação das vesículas no filme. Um pedaço de papel de filtro foi encostado levemente na amostra para retirar seu excesso. Adicionou-se 1 gota de ácido fosfotúngstico e esperou-se 3 min. Após este tempo, a amostra foi cuidadosamente seca com papel de filtro e, após 20 min, a amostra seca foi visualizada ao microscópio eletrônico de transmissão, operando a 80 kV.

3.9.6 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

O método de fixação dos lipossomas para uso em SEM foi baseado no procedimento de Ishii *et al.* (1996). Foram utilizados lipossomas extrudados (em membranas com poros de 400 nm de diâmetro). Pedaços de papel de filtro quantitativo foram imersos nas suspensões de lipossomas (2 mmol/L) e rapidamente transferidos para outros frascos para fixação. As vesículas lipídicas adsorvidas no papel de filtro foram fixadas durante 24 h a 4 °C em solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo glutaraldeído 1% (v/v) e verde de malaquita 1% (m/v). Após fixação, os papéis de filtro contendo as vesículas foram mergulhados, 2 vezes, em solução tampão durante 15 min cada vez. A seguir, foram deixados em contato com a solução tamponada de tetróxido de ósmio 1% (m/v) durante 8 h a 4 °C. As amostras foram lavadas 2 vezes (15 min cada vez) com tampão e desidratadas com etanol (grau HPLC) 30, 50, 70 e 100% (v/v), durante 10 a 15 min com cada solução. Após secagem, os papéis de filtro foram montados em suportes contendo fita de carbono e metalizados com ouro para serem visualizados ao microscópio eletrônico de varredura.

3.9.7 Análise das suspensões lipossomais em microcalorímetro diferencial de varredura (microDSC)

Foram registradas curvas de microDSC da solução tampão 10 mmol/L, pH 5,6 (solução de referência) e das suspensões contendo lipossomas vazios ou lipossomas com ISOTN encapsulada. Foram feitas diluições para obter suspensões com concentração de lipídios ~7,7 mmol/L. Para cada amostra foram feitas, pelo menos, 3 medidas consecutivas entre 25 e 80 °C, com isotermas iniciais de 10 min e rampa de aquecimento de 1 °C/min. A temperatura da transição de fase (T_m), a entalpia de transição (Δ H) e a largura do pico à meia altura foram determinadas utilizando o programa específico Origin versão 5.0 SR2 (Microcal), fornecido pelo fabricante.

3.9.8 Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais a 8 °C

Suspensões lipossomais contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO, razão molar ISOTN/lipídios ~ 0,026:1 (5 μ mol de ISOTN), preparadas conforme item 3.4.1, sofreram extrusão (em membranas com poros de diâmetro igual a 400 nm) e foram transferidas para ampolas âmbar, purgadas com N₂ e fechadas ao fogo. Estas amostras, em triplicata, foram mantidas em geladeira a 8 °C durante 3 meses e analisadas após 0, 30 e 90 dias, por HPLC e microscopia óptica. Foi determinada a distribuição de tamanhos dos lipossomas.

3.9.9 Avaliação da fotodegradação das suspensões lipossomais e da solução alcoólica de ISOTN sob luz de lâmpada fluorescente e luz UVA

Cubeta de quartzo contendo 3 mL de uma das seguintes suspensões lipossomais extrudadas em membranas com diâmetro de poro igual a 400 nm contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC ou de uma solução etanólica de isotretinoína (todas com ~0,83 mmol/L de ISOTN) foi posicionada a 6 cm de uma lâmpada de UVA (densidade local de potência igual a 185 mW/cm²) ou de uma lâmpada fluorescente (potência total igual a 20 W). As lâmpadas foram instaladas dentro de caixas pretas (Figura 16) e as suspensões/soluções foram mantidas durante todo o tempo sob agitação magnética e sem purga com gases inertes. Em determinados períodos, foram coletadas alíquotas da suspensão, em duplicata, as quais foram diluídas em metanol, obtendo-se uma concentração de ISOTN ~20 μmol/L, as quais foram

analisadas por HPLC. As suspensões contendo ISOTN encapsulada foram preparadas conforme descrito no item 3.4.1.

Foram feitos testes de fotodegradação dos géis de hidroxipropilcelulose contendo suspensão de ISOTN lipossomal **Lipo_PC** (gel lipossomal aquoso) ou ISOTN dissolvida em etanol (gel alcoólico). A concentração inicial do fármaco foi ~0,83 mmol/L.

O espectro de emissão da lâmpada fluorescente foi obtido com uma fibra óptica de quartzo colocada na frente da lâmpada e a saída da fibra foi conectada ao monocromador de emissão do fluorímetro Aminco.



Figura 16: Fotodegradação sob luz de lâmpada fluorescente

3.9.10 Análise da fluorescência das suspensões lipossomais

3.9.10.1 Medidas sobre intensidades de fluorescência, no estado estacionário, de pireno incorporado em lipossomas

Foram testadas suspensões lipossomais com e sem ISOTN encapsulada (~5 μ mol) e extrudadas (em membranas com poros de 400 nm de diâmetro): Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC, preparadas conforme descrito no item 3.4.1, usando adaptação do método descrito por *Socaciu et al.* (1999). Uma alíquota de 20 μ L de suspensão lipossomal (~38 mmol/L) foi diluída em 3 mL de tampão, obtendo 2,56 mmol/L de lipídios. O pireno dissolvido em etanol foi adicionado às suspensões lipossomais ou ao tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6, a fim de se obter uma concentração de 1,0 μ mol/L de pireno. As soluções foram incubadas durante 30 min a 35 ou 65±2 °C (dependendo do fosfolipídio), sob agitação magnética. As suspensões finais apresentaram razões molares lipídio/pireno igual a 250:1 e ISOTN/pireno igual a 6,5:1. A fluorescência do

pireno em cada suspensão e no tampão foi registrada no fluorímero Perkin-Elmer, com fendas de emissão e excitação iguais a 2,5 nm, λ_{exc} de 336 nm, varredura de 350 a 650 nm, velocidade de varredura 1200 nm/s, a 25±1 °C.

O valor I_E/I_M foi calculado como a razão da área do espectro de fluorescência do excímero (com máximo em 473 nm) em relação à do monômero do pireno. A razão I_1/I_3 foi determinada a partir da estrutura vibrônica do espectro de fluorescência do monômero de pireno monitorando a razão da intensidade da componente 1 (máximo em 373 nm) em relação a da componente 3 (máximo em 384 nm) (Lakowicz, 1999) (Figura 17).



Figura 17: Espectro de fluorescência do monômero e excímero do pireno (adaptada de Lakowicz, 1999)

As suspensões lipossomais e a solução tampão contendo pireno foram estudadas quanto à supressão de fluorescência, adicionando-se alíquotas de 0,025; 0,050; 0,10; 0,15 e 0,20 mL de solução 5 mol/L de supressor iodeto de potássio (KI), contendo 5 mmol/L de tiossulfato de sódio para evitar a transformação de íons iodeto a iodo (Lakowicz, 1999). As suspensões contendo íons iodeto foram agitadas a 25±1 °C e a supressão de fluorescência do pireno foi acompanhada durante 30 min. Os espectros de fluorescência foram registrados 1 min após a adição do supressor, porque não houve mudança significativa da intensidade de fluorescência com o tempo, desta forma foi excluído o efeito de uma cinética lenta.

A ação supressora da ISOTN na fluorescência do pireno foi comprovada pela adição de alíquotas de solução de ISOTN (dissolvida em metanol) na cubeta contendo solução de 1 μmol/L de pireno (dissolvido em metanol ou em tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6). A concentração do fármaco na cubeta foi 5 e 10 μmol/L. Avaliações das supressões de fluorescência foram obtidas com o emprego da equação de Stern-Volmer (Equação 8), após devidas correções de volume (Lakowicz, 1999).

$$\frac{F_o}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$
 Equação 8

onde F_0 e F correspondem às intensidades da fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente; **[Q]** é a concentração do supressor e K_{sv} é a constante de supressão (Stern-Volmer). A inclinação da reta F_0/F versus **[Q]** corresponde a K_{sv} .

Ocorrem desvios da linearidade prevista nessa equação quando parte dos fluoróforos não está acessível ao supressor. Neste caso é necessário utilizar a equação modificada de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) (Equação 9):

$$\frac{F_o}{F_o - F} = \frac{1}{f_a K_{SV}[Q]} + \frac{1}{f_a}$$
 Equação 9

onde f_a é a fração da intensidade de fluorescência acessível ao supressor, e os demais parâmetros têm o mesmo significado já descrito na Equação 8. Do gráfico $F_o/(F_o-F)$ versus 1/[Q], obtém-se o valor de f_a^{-1} pelo intercepto da reta com o eixo y e $(f_a K_{SV})^{-1}$ a partir da inclinação da reta.

3.9.10.2 Medidas do grau de anisotropia de sondas incorporadas em lipossomas

A luz polarizada preferencialmente excita os fluoróforos cujo momento de transição de absorção esteja orientado paralelamente ao vetor campo elétrico da onda de luz. Se a molécula de fluoróforo executar movimentos de rotação livres durante o tempo em que permanece no estado excitado, a fluorescência emitida será despolarizada. Os valores de intensidade de fluorescência, dependendo da posição do polarizador de emissão, em relação à amostra excitada com luz verticalmente polarizada (Figura 18), são usados para calcular o grau de anisotropia (r) de fluorescência das espécies (Lakowicz, 1999), conforme Equação 10.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$
 Equação 10

onde I_{II} a intensidade de fluorescência da sonda quando o polarizador da emissão está paralelo ao de excitação e I_{\perp} tem o mesmo significado mas quando o polarizador de emissão está perpendicular ao de excitação.

40

Medidas de grau de anisotropia revelam o deslocamento angular médio do fluoróforo que ocorre entre a absorção e subseqüente emissão de fóton. Dependem da viscosidade do solvente ou do ambiente onde fluoróforo está inserido, do tamanho e forma da molécula rodando. Se a sonda está inserida em lipossomas, mudanças na polarização da fluorescência da sonda podem indicar a microviscosidade ou fluidez da região da membrana na qual a sonda está inserida (Lakowicz, 1999).



Figura 18: Diagrama esquemático para medidas do grau de anisotropia de fluorescência (adaptado de New, 1990)

Foram usadas as sondas fluorescentes: pireno e TMA-DPH (1-(4-trimetilamônio fenil)-6fenil-,3,5-hexatrieno) segundo adaptação do procedimento relatado por Engelke *et al.* (2001). As estruturas químicas das sondas estão no Anexo 1. Uma alíquota de 3 μL de TMA-DPH dissolvida em dimetilformamida (~0,5 mmol/L) foi adicionada às suspensões lipossomais (2,56 mmol/L): Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC contendo ou não ISOTN encapsulada (~5 μmol). As misturas foram incubadas, sob agitação magnética, durante 30 min a 35 ou 65±2 °C (dependendo do fosfolipídio usado). A razão molar lipídio/TMA-DPH foi ~500:1 e razão molar ISOTN/TMA-DPH foi ~13:1. As suspensões lipossomais contendo pireno foram as mesmas mencionadas no item 3.9.10.1.

Nas medidas do grau de anisotropia com TMA-DPH foram usadas fendas de emissão e excitação em 10 nm, λ_{exc} de 360 nm e λ_{em} de 430 nm. Quando empregado o pireno, as fendas de emissão e excitação foram fixadas em 10 nm, λ_{exc} e λ_{em} em 336 e 373 nm, respectivamente. Cada medida do grau de anisotropia, realizada à 25±1 °C, correspondeu à média e ao desvio padrão de leituras realizadas durante 1 min (± 7 medidas).

3.10 Determinação da solução receptora para teste de permeação

3.10.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) de surfatantes

Em uma cubeta contendo pireno (1 μ mol/L) em solução de tampão fosfato 50 mM (fi=0,154 mol/L), pH 7,4 foram adicionadas alíquotas de soluções diluídas de surfatante (1 a 10 mmol/L). Após cada adição de solução de surfatante, a cubeta foi agitada e a medida de fluorescência foi realizada após 2 min. A CMC foi obtida monitorando-se a razão (I₁/I₃) entre as intensidade das bandas vibrônicas 1 e 3 do espectro de fluorescência de pireno (Figura 17) em função da concentração do surfatante. Todas as medidas foram feitas a 37±1 °C.

As intensidades de fluorescência foram obtidas com as fendas de excitação e emissão em 2,5 nm, λ_{exc} em 335 nm, varredura entre 350 e 600 nm sob velocidade de 600 nm/min. Para o cálculo da CMC foram feitas as correções de volume. A estrutura química dos surfatantes utilizados está no Anexo 1.

3.10.2 Solubilidade da ISOTN em diferentes meios receptores

Foram preparadas soluções de surfatantes em tampão fosfato-salina 0,05 mol/L (fi=0,154 mol/L), pH 7,4 na concentração 1,07 mmol/L. Para o surfatante Renex 1000 foram testadas também as concentrações de 3,21 e 6,42 mmol/L. Estas concentrações foram utilizadas considerando-se a massa molar média dos surfatantes. Foram preparadas soluções contendo 25% (v/v) de etanol em água e 3% (m/v) de albumina humana. Foi determinada, pelo menos, em duplicata, a solubilidade da ISOTN em cada uma destas soluções solubilizantes e em solução de tampão fosfato-salina.

Em erlenmeyer âmbar de 125 mL, foram adicionados 50 mL da solução solubilizante a ser testada e 15 mg de ISOTN. O frasco foi fechado e permaneceu sob agitação mecânica a 30 rpm, 37 ± 1 °C durante 24 h, em incubadora orbital, procedimento este baseado em Agarwal *et al.* (2001). Em seguida, cada solução foi filtrada rapidamente em unidade filtrante de 0,22 µm e de cada filtrado, mantido a 37 °C, foram retiradas alíquotas, diluídas com metanol e analisadas por HPLC.

3.10.3 Determinação da capacidade de solubilização de lipossomas por surfatantes

3.10.3.1 Preparação de suspensões lipossomais contendo calceína

Foram preparadas suspensões de lipossomas **Lipo_PC** vazio e com calceína encapsulada (descrito no item 3.4.1), conforme trabalhos de Memoli *et al.* (1999) e Yokouchi *et. al.* (2001). O filme lipídico composto por fosfatidilcolina PC (192 μ mol) foi hidratado com calceína (50 mmol/L) dissolvida em tampão fosfato-salina 0,05 mol/L (fi=0,154 mol/L), pH 7,4. Os lipossomas obtidos foram expostos ao procedimento de congelamento em N₂ líquido *e* descongelamento no banho a 60 °C, por 5 vezes. Os lipossomas passaram pelo processo de extrusão em membranas de 100 nm ou 400 nm por 10 vezes. A separação da calceína livre da encapsulada foi feita por filtração em coluna de Sephadex G50 (item 3.7.2).

3.10.3.2 Avaliação do tamanho e da fluorescência de lipossomas contendo calceína após contato com soluções de surfatante

Em cubeta de quartzo contendo solução tampão fosfato-salina 50 mmol/L, pH 7,4, foram adicionados 20 µL de solução de EDTA (50 mg/mL) e 10 µL de solução lipossomal de calceína, Registrou-se o espectro de fluorescência da calceína. Em seguida adicionou-se alíquota de solução concentrada de surfatante para obter a concentração final de 1,07; 3,21 ou 6,42 mmol/L de surfatante, na cubeta. Esta foi agitada e monitorou-se a intensidade de fluorescência da calceína em função do tempo. Suspensões que foram analisadas até 18 h, foram mantidas em estufa a 37 °C. A calceína total foi liberada adicionando-se 10 µL de Triton X100 10% (m/v) (Yokouchi *et. al.*, 2001).

A fluorescência da calceína foi monitorada com as fendas de excitação e emissão em 2,5 nm, λ_{exc} em 490 nm, intervalo de varredura de 500-800 nm, velocidade de varredura de 600 nm/min, a 37±1 °C. Foi feita uma curva de calibração de calceína plotando-se a intensidade de fluorescência da sonda (em tampão fosfato) em função da concentração (0,35 a 2,50 µmol/L).

As suspensões lipossomais em contato com estas soluções de surfatante foram mantidas em banho termostatizado (Neslab) a 37±1 °C durante 18 h e, em seguida, foram analisadas as variações do tamanho dos lipossomas.

43

3.11 Ensaios sobre permeação cutânea

3.11.1 Preparação da pele

As peles foram obtidas de orelhas de porcos brancos, com poucos pêlos e sem manchas (ou machucados); retiradas antes de serem escaldadas. As orelhas, fixadas com a parte dorsal para cima (Figura 19a), foram dissecadas para obtenção da membrana (derme + epiderme) com diâmetro ~1 μ m. Para separação da derme e epiderme, a pele foi mergulhada em água à 60 °C durante 1 min. Em seguida, rápida e cuidadosamente, a epiderme foi descolada da derme, com a ajuda de pinças (Figura 19b). As peles foram lavadas, envolvidas em filme de policloreto de vinila (PVC) e papel alumínio e armazenadas em freezer (-20 °C) durante, no máximo, 1 mês.



(a)



(b)

Figura 19: Obtenção da epiderme de orelha de porco para testes de permeação: (a) dissecação da orelha; (b) descolamento da epiderme (superior)

3.11.2 Teste sobre permeação em células de difusão de Franz

Os testes sobre permeação cutânea foram realizados em células de difusão de Franz (Figura 20), que têm 1,77 cm² de área de membrana para difusão e capacidade de 7 mL. Para cada formulação foram utilizadas 6 células de difusão e pelo menos duas peles de orelhas de porcos diferentes, pois normalmente algumas peles apresentavam mais pêlos que outras. Inicialmente as células foram preenchidas com a solução receptora (Renex 1000 3% (m/v)) e termostatizadas à 37±1 °C. A espessura das peles descongeladas foi medida entre duas lâminas, com micrômetro. As peles, após avaliação visual da integridade, foram montadas no

suporte de modo que o lado do estrato córneo ficou exposto às formulações, e o lado da epiderme viável ficou em contato com o líquido receptor, tendo-se o cuidado de retirar as bolhas de ar entre a pele e esta solução. Foram adicionados 300 mg de gel acima da pele (no compartimento doador). A célula, termostatizada a 37±1 °C sob agitação magnética para manter a difusão, foi coberta com tecido negro para evitar a entrada de luz. De cada célula foram coletadas, manualmente, alíquotas do líquido receptor em 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 24 h após o início do experimento e, ao mesmo tempo, igual volume do líquido receptor prétermostatizado foi reposto. Cada alíquota foi filtrada em unidades Millex e injetada no cromatógrafo líquido. Após as 24 h de permeação, o excesso de gel foi retirado com algodão e a superfície da pele foi lavada 8 vezes com água desionizada. O fármaco contido na pele foi extraído com metanol e banho de ultra-som (durante 30 min), a solução filtrada e analisada mediante HPLC.



Figura 20: Células de difusão de Franz

Através do gráfico da quantidade acumulada de ISOTN permeada através da pele em função do tempo, foram calculados os parâmetros de permeação: <u>fluxo</u> do fármaco na pele (obtido, via regressão linear, através da inclinação da parte linear do perfil de permeação) e <u>lag</u> <u>time</u>, pelo intercepto da reta em y=0; (Barry,1983). Também foi estimada a concentração de fármaco que permaneceu na pele.
3.12 Ensaios sobre irritação dérmica

Foram avaliadas a irritação dérmica primária e cumulativa dos géis aquosos lipossomais contendo ISOTN 0,025% (m/v) e géis alcoólicos com ISOTN 0,025 e 0,050% (m/v), utilizados na permeação cutânea. Também, foram testados os géis aquoso e alcoólico sem a presença de lipossomas e ISOTN. O estudo foi conduzido pela empresa BIOAGRI, utilizando método do INCQS (2002), de acordo com as normas da ANVISA (2002 e 2003).

Os animais para o estudo foram coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas nuliparas, adultos jovens, saudáveis, raça *Nova Zelândia*, pesando entre 1,5 e 3,0 kg de peso corporal. Para cada amostra foram utilizados 6 coelhos. Aproximadamente 24 h antes do início do teste, a região dorsal do tronco dos animais foi depilada com uma máquina de tosa e lâmina de barbear, tomando-se o cuidado para não lesar a pele dos animais. Os animais foram alojados individualmente em uma sala a 22± 3 °C (mantida constante); umidade relativa do ar entre 30 e 70%, e iluminada artificialmente em ciclos seqüenciais de 12 h com luz e 12 h sem luz.

Administrou-se 0,5 g/animal da amostra, em uma pequena área de sua pele (aproximadamente 6 cm²) que foi coberta com gaze e fita Micropore®. Após 4h da aplicação do produto, foram removidos todos os resíduos com água desionizada. As áreas adjacentes, que não receberam o produto, serviram como controle. No caso dos testes feitos para avaliar a irritação primária, todos os animais foram examinados 24 e 72 h após a aplicação, em relação ao aparecimento de eritema e edema. No caso do ensaio sobre irritação cumulativa, as aplicações foram feitas durante 10 dias consecutivos (uma aplicação diária) e as análises no animais foram realizadas 24 e 72 h após a última aplicação. A irritabilidade dérmica foi classificada de acordo com o sistema de graduação de irritação cutânea, mencionado na Tabela 2, baseada em Draize *et al.* (1944, 1965).

As reações cutâneas (eritemas e edemas) desenvolvidas na pele de cada animal correspondem a um valor numérico conforme indicado na Tabela 2. Os valores das reações cutâneas foram somados obtendo-se uma média. Após o término do experimento, o índice médio geral de irritação cutânea foi determinado pela soma das médias das reações cutâneas de cada período, dividida pelo número de períodos utilizados. A classificação final foi feita de acordo com o critério estabelecido pelo INCQS (2002), descrito na Tabela 3.

	sintomas	valor				
formação de	Ausência de eritema	0				
eritema	Eritema muito fraco (pouco perceptível)	1				
	Eritema bem definido	2				
	Eritema moderado a severo	3				
	Eritema severo (vermelhidão) à formação de escaras leves (lesões profundas)					
	sintomas	valor				
formação de	Ausência de edema	0				
edemas	Edema muito fraco (pouco perceptível)	1				
	Edema fraco (extremidade da área do edema bem definida)	2				
	Edema moderado (aproximadamente 1 mm)	3				
	Edema severo (mais de 1 mm, ultrapassa a área de exposição)	4				

Tabela 2: Sistema de graduação de irritação cutânea

Tabela 3: Classificação dos produtos em relação à irritação dérmica

valor do índice	classificação
0,00 - 0,99	Amostra não irritante
1,00 - 1,99	Amostra ligeiramente irritante
2,00 - 4,99	Amostra moderadamente irritante
5,00 - 8,00	Amostra severamente irritante

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de parâmetros cromatográficos para análise de ISOTN por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O fármaco apresenta uma absortividade molar (ϵ) 39750 L/(mol.cm) em etanol, sendo facilmente analisado por detectores de UV/VIS em 354 nm. Os isômeros geométricos da ISOTN apresentam também valores elevados de ϵ (25800 a 45300 L/(mol.cm)) e λ_{max} muito próximos (346 a 350 nm) (Gundersen e Blomhoff, 2002). Dependendo da pureza e do tipo do solvente utilizado, o valor de λ_{max} pode estar deslocado (Takemura *et al.*, 1980). Apesar da eficiente quantificação da ISOTN por espectroscopia na região UV/VIS, a constatação da presença dos isômeros é difícil, sendo necessário o uso de outros métodos para analisá-los, como HPLC.

No método HPLC, através de diferentes interações dos isômeros de ISOTN com a fase estacionária (coluna) e fase móvel (solventes), os componentes que saem da coluna são detectados em tempos diferentes. Neste trabalho a detecção por HPLC foi feita através de absorção de luz UV/VIS.

Nos testes como fotodegradação e, principalmente, permeação cutânea, a concentração da ISOTN pode estar entre μmol/L a nmol/L. Portanto foi necessário avaliar alguns parâmetros do sistema cromatográfico, como limite de quantificação do fármaco (item 3.9.1.2).

A Figura 21 corresponde ao cromatograma da mistura de ISOTN com TN (20 μmol/L), obtido via detecção com UV/VIS em 358 nm. A resolução entre ISOTN e TN, que é seu principal isômero, foi de 2,07, indicando separação eficiente entre os picos. Os tempos de retenção foram 9,8 e 11,7 min para ISOTN e TN, respectivamente.

Foi avaliada a presença de TN no produto da Roche (ISOTN), sendo obtido 0,3± 0,1%, em termos da área sob o pico cromatográfico, de TN em relação à de ISOTN, valor este abaixo do limite fixado pela Farmacopéia Européia (2% da área).

Os desvios padrão obtidos através de injeções sucessivas de solução padrão e de soluções alcoólicas lipossomais foram 1,7 e 2%, indicando adequada precisão do método.

O limite de detecção foi 0,6 ng para ISOTN e 0,5 ng para TN e o de quantificação foi 1,9 ng para ISOTN e 1,6 ng para TN. A detecção da TN foi melhor que ISOTN pelo fato do isômero apresentar maior valor de ε (em etanol) que a ISOTN (Gundersen e Blomhoff, 2002).

Nas concentrações estudadas, as soluções padrão apresentaram linearidade em relação à resposta do equipamento. Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram 0,99995 e 0,99999, respectivamente, para ISOTN e TN.



Figura 21: Cromatograma da mistura ISOTN e TN obtido por HPLC, 20 μ mol/L. Sistema Waters (detector UV/VIS 2487 em 358 nm)

4.2 Desenvolvimento de suspensões lipossomais pelo método da hidratação do filme lipídico seco

4.2.1 Considerações Iniciais

A proposta deste trabalho era desenvolver suspensões lipossomais contendo ISOTN que pudessem ser incorporadas em veículos apropriados à aplicação dérmica, como géis aquosos, para serem comercializados e para competirem com as formulações convencionais (géis alcoólicos). Géis comerciais de ISOTN são apresentados em concentrações de 0,05% (m/m) do ativo (Isotrex[®] da Stiefel). Optou-se por trabalhar inicialmente com menor concentração de ISOTN (0,025% (m/m)), tendo em vista artigos sobre TN lipossomal que mostraram que formulações lipossomais contendo menores concentrações de fármaco

apresentaram eficácia igual ou superior às formulações comerciais convencionais, as quais possuíam maiores concentrações de fármaco. Além disso, menores concentrações do ativo podem reduzir níveis de irritação (Mezei, 1993). A partir do momento em que a razão fármaco/lipídios esteja bem estabelecida e os lipossomas obtidos estejam estáveis, a concentração da ISOTN lipossomal pode ser escalonada.

Iniciou-se este trabalho utilizando fosfatidilcolina saturada HPC, com o objetivo de obter lipossomas com bicamadas lipídicas mais rígidas, as quais poderiam proporcionar a liberação mais lenta do fármaco. Os lipossomas compostos de fosfatidilcolina saturada HPC (> 85% de diestearoilfosfatidilcolina), apresentam T_m acima de 50 °C (Taylor e Morris, 1995), valor este que está acima da temperatura da pele; portanto, estes lipossomas estão no estado gel, formando bicamadas menos permeáveis em virtude da maior ordenação das cadeias acilas. Além disso, estes fosfolipídios são mais estáveis à degradação oxidativa (Lasic, 1993).

Os fosfolipídios utilizados, saturados (HPC) e insaturados (PC) apresentaram concentração de fosfatidilcolina superior a 93%.

4.2.2 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina saturada HPC

4.2.2.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina HPC contendo diferentes números de moles de ISOTN

Suspensões lipossomais contendo diferentes números de moles de ISOTN (PC foi fixada ~192 µmol) foram avaliadas em função da encapsulação (%EE), presença de cristais (por microscopia óptica) e parâmetros termodinâmicos (por microcalorimetria). As suspensões foram analisadas logo após a preparação lipossomal e depois de 30 dias armazenadas a 8 °C.

4.2.2.1.1 Avaliação das suspensões após preparação lipossomal

A Figura 22 mostra as suspensões lipossomais preparadas com diferentes números de moles de ISOTN (isto é, diferentes razões ISOTN/HPC). Conforme a concentração de ISOTN aumenta, mais intensa é a coloração amarela da suspensão lipossomal, sendo esta uma indicação de saturação das bicamadas lipídicas por ISOTN e, conseqüente, presença do fármaco na suspensão na forma de cristais.

Brisaert *et al.* (2001) determinaram a capacidade de incorporação da TN em lipossomas avaliando a presença de cristais de TN nas suspensões lipossomais por microscopia óptica. O método também foi adotado neste trabalho. Como a ISOTN apresenta baixa solubilidade em

água (~1 μg/mL), a fração do fármaco que não foi encapsulada em lipossomas, precipita na suspensão e pode ser visualizada no microscópio como cristais.



Figura 22: Suspensões lipossomais de HPC contendo diferentes números de moles de ISOTN: vazio, Lipo_HPC(ISOTN2µmol), Lipo_HPC(ISOTN5µmol), Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) e Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol)

As suspensões Lipo_HPC(ISOTN2µmol) e Lipo_HPC(ISOTN5µmol) apresentaram as maiores %EE de ISOTN nos lipossomas e não foram visualizados cristais do fármaco, por microscopia óptica (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação da %EE e verificação da presença de cristais de ISOTN em suspensões lipossomais de HPC contendo diferentes números de moles de ISOTN, logo após a preparação lipossomal ter sido feita. HPC~192 μmol

suspensões	ISOTN	razão molar	%EE	no.cristais/	
lipossomais	(µmol)	ISOTN/HPC	centrifugação	gradiente de densidade	mm ² (t=0 dias)
Lipo_HPC(ISOTN2µmol)	2	0,0104:1	93±1	95,3±0,7	0; (0*)
Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	5	0,0260:1	92±1	96±1	0; (0*)
Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol)	12,5	0,0653:1	78±2	89±2	270±18; (197±10*)
Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol)	31,5	0,1639:1	70±2	81± 3	950±37; (519±27*)

(*) contagem após centrifugação

Na separação do fármaco livre do encapsulado pelo método de centrifugação, notou-se pelo aspecto visual dos precipitados de Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) e Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol), que existiam cristais de ISOTN sedimentados em conjunto com os lipossomas. Os precipitados apresentaram duas colorações: um pequeno precipitado bem amarelado, seguido de outro, em maior quantidade, esbranquiçado.

O método de centrifugação tem sido utilizado por vários pesquisadores para separar retinóides que foram encapsulados em lipossomas daqueles que ficaram livres em solução (Montenegro *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Desai e Finlay, 2002). Porém, para fármacos hidrofóbicos, se a encapsulação não for total nas bicamadas lipídicas, o fármaco que ficou em solução pode precipitar devido à pequena solubilidade em meio aquoso. Com a centrifugação, o fármaco livre na forma de precipitado (cristais) pode sedimentar em conjunto com os lipossomas. Portanto, o método simples de centrifugação deve ser empregado tomando-se o cuidado de monitorar a presença de cristais do fármaco ou comparar os resultados obtidos de %EE com outros métodos de separação. As suspensões Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) e Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol), visualizadas por microscopia óptica, apresentaram cristais de ISOTN antes e após a centrifugação (Tabela 4), tornando os resultados de %EE por centrifugação não confiáveis para estas duas suspensões.

A metodologia para separação por gradiente de densidade em conjunto com a centrifugação (item 3.7.3) é utilizada na área biológica para separação de organelas e proteínas (Demacker et al., 1983; Suzuki et al., 2000; Copland et al., 2000). O método utiliza a diferença de densidade entre as soluções de sacarose para a separação de várias estruturas. O gradiente de sacarose foi ajustado para permitir separação dos lipossomas e dos cristais do fármaco. Para as suspensões Lipo_HPC(ISOTN2µmol) e Lipo_HPC (ISOTN5µmol) obteve-se somente o halo superior, esbranquiçado, referente aos lipossomas sem cristais de ISOTN. Porém, nas (Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) suspensões que apresentavam muitos cristais е Lipo HPC(ISOTN31,5µmol)), a separação não foi eficiente. Os valores de %EE para Lipo HPC(ISOTN2µmol) e Lipo HPC(ISOTN5µmol) pelo método da centrifugação são semelhantes aos obtidos por gradiente de densidade, provavelmente porque nestas suspensões a ISOTN estava totalmente encapsulada.

Foi testada também outra metodologia para separação do fármaco livre do encapsulado: a filtração através de coluna de Sephadex G50, procedimento adaptado de New (1990) e, também, foi utilizado para separação de retinóides (Shimizu *et al.*, 2003; loele *et al.*, 2005). Para diminuir o tamanho dos lipossomas e evitar obstrução dos poros, as suspensões foram inicialmente colocadas por 15 min em banho de ultra-som (25 kHz e 240 W). As suspensões

lipossomais Lipo_HPC(ISOTN5µmol) e Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) foram filtradas em colunas de Sephadex G50, sendo recuperados 81 e 49% da ISOTN, respectivamente. Somente na suspensão Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) foram visualizados cristais de ISOTN junto com os lipossomas. Este método é mais indicado para fármacos solúveis em água, os quais ficam por mais tempo retidos na coluna. Lipossomas e cristais que são partículas grandes são excluídos e eluem mais rapidamente. Além disso, uma fração dos lipossomas (provavelmente as vesículas com maiores diâmetros) ficou retida na coluna. Portanto, este sistema de filtração não foi apropriado para determinar a %EE de ISOTN em lipossomas.

Para suspensões lipossomais em que a maior parte do fármaco estava encapsulada, tanto o método de centrifugação quanto o gradiente de densidade foram eficientes. Porém na presença de cristais de ISOTN, isto é, de fármaco não encapsulado, o método mais indicado para separação do fármaco livre do encapsulado foi o gradiente de densidade.

Análises da transição de fase dos lipossomas são necessárias, porque o estado (fluidez) das bicamadas é um fator determinante na estabilidade lipossomal e nos perfis de liberação do fármaco *in vitro* e *in vivo* (Biltonen e Lichtenberg,1993). A fim de determinar a temperatura de transição de fase (T_m) e verificar a influência da concentração da ISOTN no comportamento de fase dos fosfolipídios na bicamada lipossomal, as suspensões lipossomais foram analisadas por microcalorimetira. As curvas estão mostradas na Figura 23 e os dados obtidos estão na Tabela 5. As curvas de microDSC das suspensões foram subtraídas do tampão (referência).



Figura 23: Curvas de microDSC de suspensões lipossomais de HPC com diferentes números de moles de ISOTN, logo após a preparação lipossomal ter sido feita

suspensões	ΔH	T _m	largura a
lipossomais	(cal/g)	(°C)	1/2 altura (°C)
Lipo_HPC vazio	10,6±0,1	53,0±0,1	1,8±0,1
Lipo_HPC(ISOTN2µmol)	10,3±0,1	52,7±0,1	2,1±0,1
Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	9,9±0,1	52,3±0,1	2,4±0,1
Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol)	10,6±0,1	51,6±0,1	3,0±0,1
Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol)	10,7±0,2	51,5±0,1	3,2±0,2

Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos das soluções lipossomais de HPC contendo diferentes números de moles de ISOTN, logo após preparação lipossomal ter sido feita

Segundo Engelke *et al.* (2001) e Biltonen e Lichtenberg (1993) a inserção de moléculas estranhas na região das cadeias acilas pode alterar o processo cooperativo de movimento entre as cadeias, alargando o pico (transição de fase). Se o empacotamento lipídio-lipídio é rompido, a ordem é reduzida e a T_m ocorre em temperaturas menores. Se estas moléculas estiverem na região da cabeça polar do lipídio, a T_m diminui como resultado de uma interação mais fraca também entre os grupos polares, causada por uma expansão lateral da região da interface.

A suspensão contendo lipossomas vazios (**Lipo_HPC vazio**) apresentou a transição principal em 53,0 °C e a pré-transição em 46,6 °C (Figura 23). A presença de ISOTN nos lipossomas fez desaparecer a pré-transição, aumentou a largura do pico, diminuiu a temperatura de transição de fase e *onset* (início) da transição. Estas variações nos parâmetros calorimétricos foram evidenciadas com o aumento da concentração de fármaco, alcançando um patamar após 12,5 μmol de ISOTN (Figura 24a).

Observou-se que os valores de entalpia da transição, que corresponde à área sob a curva, diminuíram com o aumento da concentração de ISOTN até Lipo_HPC(ISOTN5µmol), devido à menor energia para ocorrer a transição na presença do fármaco. Em seguida, ocorreu aumento da entalpia para as suspensões lipossomais contendo maiores concentrações de ISOTN (possível segregação de fases), Figura 24b. Os perfis das curvas de microDSC em função do aumento da concentração de fármaco indicam que houve uma tendência de saturação da bicamada lipídica. Ortiz *et al.* (1992) e Montenegro *et al.* (1996) verificaram que acima de determinada concentração, tretinoína (TN) tem menor influência nas curvas de DSC, indicando que uma quantidade limitada de fármaco interage com membranas de fosfolipídios. Concentrações maiores de TN podem formar domínios enriquecidos do fármaco dentro da membrana, causando separação das fases.



Figura 24: (a) temperatura de transição de fase e largura a ½ altura, e (b) entalpia de transição obtidas das curvas de microDSC de suspensões lipossomais contendo HPC com diferentes números de moles de ISOTN, logo após a preparação lipossomal ter sido feita

Estes resultados evidenciaram a desestabilização da bicamada lipídica devido à incorporação da ISOTN. De fato, a natureza anfifílica da molécula de ISOTN sugere que ela se insira na membrana. Wassall *et al.* (1988) e, Wassall e Stillwell (1990), verificaram por técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) que a molécula de tretinoína está situada menos internamente na membrana do que o retinol ou o retinal (Figura 25).



Figura 25: Representação esquemática da posição relativa proposta para: (A) retinol e (B) ácido retinóico (TN) em bicamadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (Wassall *et al.*,1988)

Segundo estes estudos de Wassall *et al.* (1988) e, Wassall e Stillwell (1990), a natureza fortemente hidrofílica do grupo carboxílico faz com que a molécula de TN esteja posicionada mais externamente, forçando as moléculas de fosfolipídio a se separarem na interface aquosa,

aumentando a desordem na região superior das cadeias. Em conjunto com a presença do volumoso grupo ciclohexeno terminal (que desorganiza a região central da membrana), são os fatores responsáveis pela diminuição do empacotamento dos fosfolipídios e aumento da fluidez da bicamada lipídica.

A ISOTN atuou de forma semelhante à TN, perturbando a cooperatividade da transição entre fases através da presença do grupo ciclohexeno entre as cadeias acilas e do grupo carboxílico das cadeias da ISOTN próximo à cabeça polar do fosfolipídio. Provavelmente a perturbação das bicamadas é maior na presença de ISOTN do que TN, por conter o grupo ácido na posição *cis*.

4.2.2.1.2 Avaliação das suspensões durante 42 dias

As suspensões **Lipo_HPC(ISOTN2μmoI)** e **Lipo_HPC(ISOTN5μmoI)**, que não apresentaram cristais de ISOTN, foram monitoradas por microscopia óptica e suas %EE avaliadas por gradiente de densidade pelo período de 42 dias, a 8 °C.

Ambas as suspensões tiveram vazamento do fármaco encapsulado nos lipossomas, indicando que a estrutura lipossomal composta de fosfolipídios saturados HPC não foi estável para ISOTN.

No método do gradiente de densidade, para ambas as suspensões, ocorreu separação entre os cristais e os lipossomas: o halo inferior amarelo (interface das soluções de 50/15% de sacarose) correspondeu aos cristais de ISOTN e o outro halo esbranquiçado na superfície, aos lipossomas (Figura 26b). O sistema de gradiente antes da centrifugação corresponde à Figura 26a. Na Figura 27 estão plotados a %EE e a quantidade de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais, após 42 dias da preparação lipossomal.





(b)

Figura 26: Lipossomas Lipo_HPC(ISOTN2µmol) e Lipo_HPC(ISOTN5µmol) contendo ISOTN submetidos ao gradiente de densidade com sacarose: (a) antes e (b) após centrifugação. Avaliação da preparação lipossomal 42 dias após sua preparação

A medida que diminuiu a porcentagem de encapsulação da ISOTN nos lipossomas, aumentou o número de cristais do fármaco nas suspensões (Figura 27). Em 42 dias de estudo foram obtidos 66% (ou 0,26 mmol/L) e 35% (ou 0,35 mmol/L) de ISOTN encapsulada nos lipossomas Lipo_HPC(ISOTN2µmol) e Lipo_HPC(ISOTN5µmol), respectivamente. É provável que o escape da ISOTN continuasse após os 42 dias, principalmente para a Lipo_HPC(ISOTN5µmol), até atingir uma concentração de ISOTN que permaneça estável dentro das bicamadas.



Figura 27: Quantidade de cristais e %EE da ISOTN nas suspensões lipossomais Lipo_HPC(ISOTN2µmol) e Lipo_HPC(ISOTN5µmol) em função do tempo

Houve uma tendência de diminuição da liberação de ISOTN das suspensões Lipo_HPC(ISOTN2μmol) e Lipo_HPC(ISOTN5μmol), 10 e 20 dias após terem sido preparadas, respectivamente (Figura 27). Como existe uma relação entre o valor da %EE e a formação de cristais de ISOTN, as suspensões lipossomais preparadas após este teste foram sempre visualizadas no microscópio óptico 15 dias após terem sido preparadas.

Vesículas multilamelares grandes são reconhecidas por microscopia de polarização pela presença de estruturas com brilho intenso, esbranquiçadas, apresentando a cruz de Malta, característica da birrefringência das lamelas. O método tem sido utilizado por vários pesquisadores para confirmar a formação de lipossomas e verificar a presença de cristais de fármaco (Brisaert *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2001; Manosroi *et al.*, 2003). Desta

forma, os lipossomas puderam ser distinguidos dos cristais de ISOTN, os quais são amarelados e apresentaram-se, normalmente, na forma de agulhas. As Figuras 28a-d correspondem às fotos obtidas mediante microscopia óptica com luz polarizada das suspensões, 42 dias após terem sido preparadas. As maiores quantidades de cristais de ISOTN foram visualizadas nas suspensões Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol) e Lipo_HPC (ISOTN31,5µmol) (Figuras 28c e 28d, respectivamente).



(c)

(d)

Figura 28: Microscopia óptica com luz polarizada das suspensões: (a) **Lipo_HPC** (ISOTN2 μ mol); (b) **Lipo_HPC(ISOTN5\mumol)**; (c) **Lipo_HPC(ISOTN12,5\mumol)** e (d) **Lipo_HPC(ISOTN31,5\mumol)**. Objetiva de 20x. Barra de 50 μ m, 42 dias após terem sido preparadas

As amostras foram novamente avaliadas por microDSC (Figura 29), 42 dias após terem sido preparadas. Na Tabela 6 estão os valores obtidos das curvas de DSC, os quais foram plotados (Figuras 30a e b).



Figura 29: Curvas de microDSC das suspensões lipossomais contendo HPC com diferentes números de moles de ISOTN, 42 dias após terem sido preparadas

Tabela 6	3: Parâmetros	termodinâmicos	das s	soluções	lipossomais	de	HPC	contendo	diferentes
números	de moles de l	SOTN, 42 dias a	pós te	erem sido	preparadas				

solução lipossomal	∆H	T _m	largura a
	(cal/g)	(°C)	1/2 altura (°C)
Lipo_HPC vazio	10,6±0,1	53,0±0,1	1,8±0,1
Lipo_HPC(ISOTN2µmol)	10,2±0,1	52,7±0,1	1,9±0,1
Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	10,4±0,1	52,6±0,1	2,1±0,1
Lipo_HPC(ISOTN12,5µmol)	10,3±0,2	52,6±0,1	1,9±0,2
Lipo_HPC(ISOTN31,5µmol)	10,4±0,1	52,6±0,1	2,1±0,1

Comparando as Figuras 23 (ou 24) e 29 (ou 30) e os resultados das Tabelas 5 e 6, pode-se notar que a ISOTN foi liberada dos quatro tipos de suspensões lipossomais, 42 dias após terem sido preparadas. As curvas de microDSC, antes deslocadas para menores T_m e mais largas com a inclusão da ISOTN (Figura 23), após 42 dias, apresentaram-se semelhantes às curvas dos lipossomas vazios (Figura 29). Os valores dos parâmetros retornaram para valores próximos ao encontrado para **Lipo_HPC vazio**. Estes dados mostraram que independentemente da quantidade de ISOTN encapsulada durante a preparação lipossomal, o fármaco vazou, alcançando uma concentração que tende a um equilíbrio dentro da estrutura lipossomal composta por fosfatidilcolina HPC.



Figura 30: (a) temperatura de transição de fase e largura a ½ altura, e (b) entalpia de transição obtidas das curvas de microDSC de suspensões lipossomais contendo HPC com diferentes números de moles de ISOTN, após 42 dias da preparação lipossomal

Portanto lipossomas de fosfatidilcolina HPC não forneceram uma estrutura estável para a encapsulação e manutenção da ISOTN encapsulada, provavelmente por formar vesículas contendo bicamadas lipídicas mais rígidas devido à conformação *trans* das cadeias acilas. Devem ser necessárias mudanças na fluidez das bicamadas lipídicas para aumentar a encapsulação da ISOTN.

4.2.2.2 Avaliação da encapsulação de ISOTN em lipossomas de fosfatidilcolina HPC em função de parâmetros experimentais da preparação lipossomal

Como algumas etapas durante a preparação da suspensão lipossomal podem influenciar na encapsulação e degradação do fármaco, foram testados alguns parâmetros do processo, descritos a seguir. Foi utilizada sempre a razão molar ISOTN/HPC de 0,026:1, que corresponde a 192 µmol de PC e 5µmol de ISOTN, isto é, a formulação lipossomal **Lipo_HPC(ISOTN5µmol)**.

4.2.2.2.1 Efeito do solvente na formação do filme lipídico.

Foi avaliada a influência dos solventes metanol e clorofórmio, utilizados para dissolver os lipídios e a ISOTN, na estabilidade da suspensão lipossomal formada. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5μmol) em função do tipo de solvente utilizado na formação do filme lipídico. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1

período	a	nálises	metanol	clorofórmio	clorofórmio/
-					metanol (1:1)
inicial	HPLC	HPLC ISOTN (%) 98±1		97±1	98±2
Inicial		TN (%)	0,6±0,2	1,9±0,1	0,9±0,1
	no.cristais/mm ²		0	0	0
	HPLC	ISOTN (%)	97±1	96,8±0,9	97±2
após 15 dias		TN (%)	0,4±0,3	2,1±0,2	0,8±0,1
	no.cristais/mm ²		27±3	14±1	19±2

A suspensão lipossomal proveniente de filme obtido a partir dos fosfolipídios dissolvidos previamente apenas em clorofórmio, produziu 1,9% de isômero TN (próximo do limite especificado pela Farmacopéia Européia: 2%). Quando se utilizou o solvente metanol, foi produzido 0,6% de TN. Estes valores não mudaram significativamente 15 dias após a preparação lipossomal. Como metanol formou menos produto de degradação, seria mais indicado utilizá-lo na preparação do filme lipídico; porém, o filme obtido não foi homogêneo e a suspensão lipossomal gerou mais cristais de ISOTN (27±3 cristais/mm²) do que com clorofórmio (14±1 cristais/mm²), após 15 dias. Além disso, o metanol conseguiu dissolver toda massa de fosfatidilcolina HPC somente quando a temperatura estava acima de 60 °C.

A mistura de clorofórmio/metanol (1:1) foi testada e produziu um filme homogêneo, suspensões com 0,9±0,1% de TN e valores intermediários de número de cristais (19±2 cristais/mm²), 15 dias após a preparação. Portanto, esta mistura de solventes foi escolhida como padrão para dissolver os componentes lipofílicos (lipídios, fármaco e antioxidante) previamente à formação do filme lipídico.

4.2.2.2.2 Efeito da posição do balão durante formação do filme

Foi avaliada a influência da posição do balão acima do banho do rotaevaporador (T~40 °C), mergulhado totalmente no banho ou balão mergulhado até o nível do solvente (T~65 °C) (Tabela 8). O tempo para formar o filme nas paredes do balão, quando este foi colocado acima do banho, foi de 20 min. Quando o balão foi mergulhado no nível do banho, a demora foi de 8 min e, para o balão totalmente mergulhado no banho, 5 min.

Tabela 8: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5μmol) em função da posição do balão em relação ao banho termostatizado na formação do filme lipídico. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1

	análises		posição do balão em relação ao banho						
período			acima do banho	mergulhado no nível do solvente	totalmente mergulhado no banho				
	HPLC	ISOTN (%)	98±1	97±1	94,5±0,8				
Iniciai	TN (%)		0,6±0,1	0,7±0,1	0,9±0,2				
	no.cri	stais/mm ²	5,8±0,8	0	7±1				
	HPLC	ISOTN (%)	97±1	98±2	94±2				
após 15 dias	···· -·	TN (%)	0,7±0,2	0,8±0,1	1,0±0,1				
	no.cristais/mm ²		28±3	21±2	20±1				

O filme formado com balão totalmente mergulhado no banho de água foi mais irregular, com o aparecimento de grumos de lipídios próximos ao gargalo do balão e a presença de cristais de ISOTN na suspensão logo após a preparação. Estes resultados refletem a evaporação rápida dos solventes, que causa segregação dos componentes, e arraste de substâncias como a ISOTN para fora do balão. Isto justifica a menor porcentagem de encapsulação de ISOTN obtida nesta suspensão (94,5%) quando comparada com as outras cujos filmes foram obtidos com o balão em outras posições.

Filmes lipídicos formados com o balão acima do banho ou mergulhado coincidindo o nível do solvente com o nível de água do banho, produziram suspensões lipossomais contendo quantidades semelhantes de ISOTN e TN. Porém, com o balão acima do banho, foram obtidos cristais na suspensão lipossomal, logo após sua preparação. Isto se deve a uma possível segregação dos componentes com a diminuição do volume dos solventes a 40 °C (T<T_m). É necessário o uso de temperatura próxima a 60 °C para melhor solubilizar a quantidade pesada de fosfatidilcolina HPC, em presença de metanol. Esta suspensão foi a que apresentou maior quantidade de cristais 15 dias após ter sido preparada, refletindo a necessidade de mistura dos componentes em T>T_m para estabilizar mais o fármaco nas bicamadas lipossomais.

A posição do balão mergulhado coincidindo o nível do solvente com o do banho, não apresentou cristais de ISOTN na suspensão lipossomal logo após a sua preparação e não

mostrou degradação da ISOTN. Portanto, esta posição do balão para obtenção do filme lipídico foi estabelecida como padrão nas próximas preparações de lipossomas.

4.2.2.3 Efeito do tempo de hidratação e temperatura de armazenagem da suspensão

A hidratação ineficiente dos lipossomas pode ocasionar o aparecimento de defeitos na estrutura lamelar e instabilidade do fármaco encapsulado, com conseqüente liberação deste. Neste teste, foi avaliado o tempo e tipo de hidratação das vesículas na estabilidade da suspensão de ISOTN lipossomal. Verificou-se, também, se a temperatura de armazenagem da suspensão poderia influenciar a liberação da ISOTN dos lipossomas (Tabela 9 e 10).

Tabela	9 :	Avaliação	da	degradação	е	presença	de	cristais	de	ISOTN	nas	suspensõ	ões
lipossor	nais	de HPC ((Lipo	_HPC(ISOTI	N5	μ mol) em	funç	:ão do t	empo	o e tipo	de l	nidratação	do
filme lip	ídico	o. Razão m	olar	ISOTN/HPC	em	n 0,026:1							

			tempo de hidratação						
período	a	nálises	6	adição rápida					
			30 min	60 min	120 min	(60 min)			
inicial	HPLC	ISOTN (%)	98±1	95,5±0,6	93±1	91±1			
miciai		TN (%)	0,6±0,1	1,0±0,1	2,1±0,2	5,2±0,1			
	no.cristais/mm ²		0	0	0	0			
após 15 dias	no.cristais/mm ²		20±1	21±2	19±2	18±2			

Amostras de suspensão coletadas 30, 60 e 120 min após a hidratação indicaram uma tendência de degradação do fármaco com aumento do tempo de hidratação, refletindo o maior contato do fármaco com o calor e ambiente aquoso, o qual contém ainda oxigênio, apesar da solução ter sido saturada com argônio.

Maior exposição ao oxigênio e luz, provavelmente, foi o motivo da degradação da ISOTN utilizando hidratação lenta (filme hidratado com pequenas porções da solução de hidratação durante os 60 min).

Na Tabela 10, pode-se observar que as amostras da suspensão de 30 min de hidratação, armazenadas por 15 dias a 25 °C ou a 8 °C, não mostraram diferenças na quantificação da ISOTN.

Tabela 10: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5μmol) em função do tipo de armazenagem das suspensões. Rápida adição do tampão e hidratação por 30 min. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1

período	an	álises	armazenagem				
ponouo	••••		geladeira (8 °C)	temperatura ambiente (25 °C)			
	HPLC	ISOTN (%)	98±1	97,5±0,8			
após 15 dias		TN (%)	0,6±0,1	0,9±0,1			
	no.cris	stais/mm²	20±1	22±2			

O tempo e o tipo de hidratação (Tabela 9), como também o armazenamento das suspensões lipossomais em diferentes temperaturas (Tabela 10), não influenciaram significativamente no vazamento de ISOTN, pois foram observados números semelhantes de cristais de ISOTN.

Com o objetivo de minimizar a degradação do fármaco, principalmente a longo prazo, foi estabelecido como padrão, 30 min como tempo de hidratação e armazenagem das suspensões lipossomais a 8º C.

4.2.2.2.4 Efeito da concentração de antioxidante BHT

Foram preparadas suspensões de HPC com 0; 0,05; 0,1 e 0,2% de massa de BHT em relação à massa do lipídio. As suspensões foram avaliadas no mesmo dia do preparo dos lipossomas e depois de 15 dias. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Logo após a obtenção dos lipossomas, não foram visualizados cristais de ISOTN e análises de HPLC indicaram que o fármaco não sofreu degradação. Porém 15 dias após a preparação, a suspensão lipossomal preparada sem BHT apresentou diminuição de 60% da concentração da ISOTN, mostrando a necessidade de antioxidante para preservar o fármaco. A TN formada também foi oxidada (na ausência de BHT), não sendo detectada por HPLC.

A adição de BHT em quantidades crescentes de 0,05 a 0,2% (m/m lipídios) diminuiu a oxidação da ISOTN, não alterando significativamente a TN. As formulações contendo 0,1 e 0,2% de BHT apresentaram estabilidade química semelhante do fármaco e quantidades de cristais de ISOTN.

Tabela 11: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5µmol) em função da concentração de BHT. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1

período	análises		BHT% (m/m lipídio)					
ponodo	u.	anooo	0	0,05	0,1	0,2		
iniaial	HPLC	ISOTN (%)	96±1	96±2	97,1±0,7	97±1		
Inicial	TN (%)		0,4±0,1	0,3±0,1	0,6±0,2	0,5±0,2		
	no.cristais/mm ²		0	0	0	0		
	HPLC	ISOTN (%)	39,2±0,2	94±1	97±1	98,1±0,4		
após 15 dias		TN (%)	0	0,9±0,2	0,4±0,3	0,5±0,1		
	no.cristais/mm ²		0	15,3±0,8	21±1	20±2		

Optou-se por utilizar 0,2% de BHT nas suspensões lipossomais preparadas depois deste teste, pela possibilidade de aumentar a estabilidade do fármaco a longo prazo.

4.2.2.2.5 Efeito da solução de hidratação

Foram testadas soluções de hidratação de filmes lipídicos: tampão citrato pH 5,6 e soro fisiológico, verificando a degradação e presença de cristais de ISOTN nas suspensões lipossomais e analisando o tamanho das vesículas (Tabela 12).

O valor do pH da solução de hidratação < 6 foi escolhido pelos seguintes motivos: (a) segundo Creton *et. al.* (1995), o pKa da ISOTN é > 6 e, portanto, em pH menor que este valor, o fármaco estará não ionizado; (b) a encapsulação de fármacos é maior na bicamada lipídica dos lipossomas estando no estado não ionizado (New, 1990); (c) existe menor resistência à permeação do fármaco na camada córnea da pele se as moléculas da substância não tiverem cargas (Barry, 1983) e (d) o pH da pele varia de 4,5 a 6 dependendo da região do corpo, sendo considerado o valor de 5,4 a 5,6 como pH médio normal da pele (Barry, 1983; Oliveira Filho, 2001). Muitas formulações dermatológicas e cosméticas têm esses valores de pH para evitar irritações cutâneas.

O tampão citrato foi escolhido porque, além de atuar mantendo o pH do meio, também age como um seqüestrador de cátions bivalentes (Lachman *et al.*, 2001).

Tabela 12: Avaliação da degradação e presença de cristais de ISOTN, e diâmetro médio dos lipossomas nas suspensões lipossomais de HPC (Lipo_HPC(ISOTN5µmol) em função das soluções de hidratação, após 15 dias da preparação lipossomal. Razão molar ISOTN/HPC em 0,026:1

soluções de	HPLC		no.cristais/mm ²	diâmetro	
hidratação	ISOTN (%)	ISOTN (%) TN (%)		médio (nm)	
tampão citrato	97 ±1	0,7±0,1	21±2	1832±62	
10 mmol/L					
tampão citrato 50mmol/L	pão citrato 97,5 ±0,7 mmol/L		15±2	2215±89	
NaCl _(aq) 0,9%	98,1 ±0,9	0,6±0,2	16±1	2434±59	
NaCl _(aq) 2%	97 ±1	0,5±0,2	14±2	2353±106	

Todas as soluções de hidratação testadas não influenciaram significativamente a degradação da ISOTN (Tabela 12). Porém, foi observada uma tendência à formação de menor número de cristais do fármaco, lipossomas maiores e sedimentação mais rápida nas soluções com maior força iônica.

As soluções com maiores valores de força iônica, diminuíram, mas não evitaram a formação de cristais de ISOTN. Foi escolhida como padrão a solução de hidratação tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6, pelos seguintes motivos: (a) soluções com maior força iônica inviabilizam a utilização de fosfolipídios aniônicos, como a fosfatidilserina, usados para conferir carga na superfície dos lipossomas e, assim, minimizar a agregação das vesículas com o tempo. A presença de íons em excesso neutraliza a carga negativa da fosfatidilserina, tornando a área da cabeça polar menor e, desta forma, aumentando a aproximação dos fosfolipídios e, consequentemente, o tamanho e a agregação dos lipossomas (New, 1990; Lasic, 1993); (b) géis, como o Carbopol[®] (poliacrilato), apresentam redução na viscosidade quando em presença de alto teor de sais, desestabilizando a formulação (Peppas *et al.* 2002) e (c) se a presença de sais aumenta o tamanho e a velocidade de sedimentação dos lipossomas, o uso de soluções de hidratação com maiores forças iônicas, provavelmente, aumentaria a fusão entre as vesículas, com o passar do tempo (Lasic, 1993).

De forma geral, as avaliações de algumas etapas da preparação lipossomal foram importantes para estabelecer a metodologia padrão para hidratação do filme seco, minimizando a degradação do fármaco durante o processo. Mudanças nos parâmetros experimentais

estudados não evitaram o vazamento da ISOTN dos lipossomas de fosfatidilcolina HPC, provavelmente porque a encapsulação deste fármaco está relacionada principalmente à fluidez da bicamada lipídica.

4.2.2.3 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina HPC e outras substâncias lipofílicas

Devido a dificuldades na separação do fármaco livre do encapsulado, principalmente para volumes maiores de suspensão, priorizou-se o desenvolvimento de suspensões lipossomais que encapsulassem a maior parte da ISOTN. A instabilidade da ISOTN incorporada em lipossomas rígidos (fosfatidilcolina HPC) indicou que a fluidez das bicamadas lipídicas é provavelmente o fator mais importante para a encapsulação da ISOTN. Com o objetivo de aumentar a fluidez da bicamada lipídica e, desta forma, melhorar a %EE do fármaco, foram desenvolvidas suspensões lipossomais obtidas da mistura de fosfatidilcolina HPC com outras substâncias lipofílicas. Estas substâncias corresponderam à surfatantes e fosfolipídios contendo insaturações nas cadeias hidrofóbicas. Segundo Wassall e Stillwell (1990), a presença de insaturações nas cadeias acilas cria espaços dentro da bicamada lipídica, os quais podem acomodar melhor o anel do fármaco.

4.2.2.3.1 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com surfatantes

Vários estudos utilizaram misturas de lecitinas e outros lipídios com surfatantes para encapsulação de fármacos (Cevc *et al.*, 1996; El Maghraby *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2001a; El Maghraby *et al.*, 2004).

Foram preparadas suspensões lipossomais contendo mistura de fosfolipídios HPC com surfatantes com razão molar ISOTN/(HPC+surfatantes) em 0,026:1, ISOTN 5 μmol. As suspensões foram analisadas por microscopia óptica 15 dias após a preparação e os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Entre vários surfatantes, foi testado o colato de sódio, por ter sido utilizado por Cevc *et al.* (1995,1996) em mistura com fosfatidilcolina para formação de vesículas ultradeformáveis (transfersomas), as quais podem penetrar intactas em camadas mais profundas da pele. A mistura de HPC e colato não conseguiu evitar o vazamento da ISOTN (Tabela 13).

Foram testadas misturas de fosfatidilcolina HPC com surfatante contendo uma cadeia acila "C18" insaturada (Oleth 20) e uma cadeia acila "C18" saturada (Lipopeg 4S). Porém, ambos os surfatantes foram ineficientes na formação de uma estrutura estável para a ISOTN.

Tabela 13: Número de cristais de ISOTN presentes em suspensões lipossomais compostas de misturas de fosfatidilcolina HPC e surfatantes contendo ISOTN encapsulada, após 15 dias da preparação lipossomal. Razão molar ISOTN/(HPC+surfatantes) em 0,026:1

surfatantes misturados com fosfatidilcolina HPC	surfatante (%mol)	no.cristais/mm ² de ISOTN
Colato de sódio	5, 10 e 20	9,8 ±0,5; 7±2; 2,0±0,5
Oleth 20	10 e 20	25±2; 21±2
Lipopeg 4S	20 e 40	23±2; 19,0±0,8
Lipopeg 4DS	20, 30 e 40	22±1; 21±1; 17,3±0,5
Lipopeg 4DO	20, 30 e 40	4,3±0,8; 1,3±0,3; 0

Outras suspensões foram preparadas utilizando surfatantes contendo dupla cadeia acila C18 ligadas por oito unidades de óxido de etileno. A estrutura é semelhante à do fosfolipídio. Lipopeg 4DS é composto de duas cadeias de ácido esteárico, e Lipopeg 4DO (também designado **DO**) compreende duas cadeias de ácido oléico. Apenas a mistura de fosfatidilcolina HPC com 40% mol de Lipopeg 4DO evitou o vazamento da ISOTN (não foram obtidos cristais de ISOTN, Tabela 13). Como a diferença entre Lipopeg 4DS e Lipopeg 4DO é a presença de insaturação neste último surfatante, estes resultados indicaram a importância desta insaturação no aumento de espaçamento entre os componentes estruturais dos lipossomas para acomodação das moléculas do fármaco.

A mistura de fosfatidilcolina HPC com 40% em mol de Lipopeg 4DO e 5 μmol de ISOTN, denominada **Lipo_HPC/DO(60/40)(ISOTN5μmol)**, foi uma das suspensões lipossomais escolhida para ser investigada mais detalhadamente. Para simplificações, esta suspensão também foi chamada apenas de **Lipo_HPC/DO**.

Suspensões de fosfatidilcolina HPC contendo 20 ou 40% mol de Lipopeg 4DO, com e sem ISOTN encapsulada, foram avaliadas por microDSC (Figura 31), logo após a preparação lipossomal. Os parâmetros calorimétricos obtidos estão mostrados na Tabela 14.



Figura 31: Curvas de microDSC para suspensões contendo misturas de fosfatidilcolina HPC e surfatante Lipopeg 4DO, com e sem ISOTN encapsulada

Tabela 14: Parâmetros termodinâmicos das soluções lipossomais contendo misturas de fosfatidilcolina HPC e 20 ou 40% mol de surfatante Lipopeg 4DO, contendo ou não ISOTN encapsulada (~5 μmol). Razão molar ISOTN/(HPC+surfatantes) em 0,026:1

suspensões	ΔH	T _m	largura à 1/2 altura	
lipossomais	(cal/g)	(°C)	do pico (°C)	
Lipo_HPC vazio	10,6±0,1	53,0±0,1	1,8±0,1	
Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	9,9±0,1	52,3±0,1	2,4±0,1	
Lipo_HPC/DO(80/20) vazio	8,1±0,1	49,8±0,1	8,5±0,1	
Lipo_HPC/DO(80/20)(ISOTN5µmol)	9,1±0,2	51,1±0,1	3,5±0,2	
Lipo_HPC/DO(60/40) vazio	6,6±0,1	45,7±0,1	9,1±0,1	
Lipo_HPC/DO(60/40)(ISOTN5µmol)	7,5±0,2	51, <u>2±</u> 0,2	4, <u>0</u> ±0,2	

A mistura de surfatante DO com fosfatidilcolina HPC (formulações: Lipo_HPC/DO(80/20) vazio e Lipo_HPC/DO(60/40) vazio), diminuiu a T_m e o Δ H em relação aos lipossomas feitos apenas com fosfatidilcolina HPC (formulação Lipo_HPC(ISOTN5µmol)). A inserção destas moléculas insaturadas alterou o processo cooperativo de movimento das cadeias de fosfatidilcolina HPC, acarretando alargamento do pico correspondente à transição de fase. Se o empacotamento lipídio-lipídio é rompido, a ordem é reduzida, a transição de fase ocorre com menor energia e em temperaturas menores. Quanto maior a porcentagem (em mol) de surfatante na mistura, maiores variações ocorreram nos parâmetros termodinâmicos. Na Figura 31, pode-se observar que as transições de fase nas amostras contendo 20 e 40% mol de surfatante apresentaram dois picos (ombros), indicando provavelmente separação de fases dentro da bicamada lipídica, sendo uma fase mais rica em fosfatidilcolina HPC e outra contendo mais surfatante DO.

A presença de ISOTN nos lipossomas contendo 20 e 40% mol de surfatante (respectivamente Lipo_HPC/DO(80/20)(ISOTN5µmol)) e Lipo_HPC/DO(60/40) (ISOTN5µmol)) apresentou comportamento oposto do observado com os lipossomas vazios (contendo o surfatante porém sem fármaco encapsulado): $T_m e \Delta H$ aumentaram e a largura do pico diminuiu. Provavelmente, o fármaco, pela afinidade por ambiente mais fluído, inseriu-se mais nas proximidades das moléculas de surfatante do que das moléculas de fosfatidilcolina HPC, causando a formação de microdomínios na bicamada contendo DO e ISOTN. Um menor número de moléculas de DO se misturaram às de HPC e, portanto, a cooperação durante a transição de fase entre os fosfolipídios de HPC aumentou, causando as alterações da tendência obtida nos referidos parâmetros.

4.2.2.3.2 Lipossomas de fosfatidilcolina HPC com PC ou colesterol

Conforme observado no item anterior, a presença de surfatante com dupla cadeia hidrofóbica insaturada na mistura com fosfatidilcolina HPC, melhorou a encapsulação da ISOTN. Desta forma, avaliou-se a presença de cristais de ISOTN em suspensões formadas pela mistura de fosfatidilcolinas saturadas HPC e insaturadas PC, conforme Tabela 15.

Tabela 15: Número de cristais de ISOTN encontrados em suspensões lipossomais constituídas por misturas de fosfatidilcolinas HPC e PC contendo ISOTN encapsulada (~5µmol), 15 dias após a preparação lipossomal. Razão molar ISOTN/(HPC+PC) em 0,026:1

suspensões lipossomais	PC (% mol)	no.cristais/mm ²
Lipo_HPC/PC(75/25)(ISOTN5µmol)	25	4,8±0,8
Lipo_HPC/PC(70/30)(ISOTN5µmol)	30	1,8±0,3
Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5µmol)	40	0
Lipo_HPC/PC(50/50)(ISOTN5µmol)	50	0
Lipo_HPC/PC(25/75)(ISOTN5µmol)	75	0
Lipo_PC(ISOTN5µmol)	100	0

Lipossomas obtidos com a mistura de fosfatidilcolina HPC $e \ge 40\%$ em mol de fosfatidilcolina insaturada PC, apresentaram máxima encapsulação do fármaco (não foram visualizados cristais de ISOTN). Resultado semelhante foi encontrado para a mistura de fosfolipídio HPC com Lipopeg 4DO (item 4.2.2.3.1), o que pode ser uma indicação da necessidade de, pelo menos 40% em mol de substância insaturada com estrutura semelhante ao do fosfolipídio, para fluidificar a bicamada lipídica.

A mistura de fosfatidilcolina HPC com 40% em mol de fosfatidilcolina PC e 5 μmol de ISOTN, denominada Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5μmol), foi uma das suspensões lipossomais escolhidas para ser investigada com maior detalhe. Esta suspensão, também foi chamada apenas de Lipo_HPC/PC.

Colesterol é frequentemente incluído em formulações lipossomais para modificar a fluidez das bicamadas, regulando a estabilidade da formulação e a velocidade de liberação de fármacos encapsulados (Lasic, 1993). Foi avaliada a encapsulação do fármaco em lipossomas contendo colesterol. Suspensões contendo 20% mol de colesterol aumentaram o vazamento de ISOTN (foram contados 30±2 cristais/mm²), provavelmente por competir com o fármaco pela mesma região na bicamada lipídica.

Algumas das suspensões lipossomais provenientes da mistura de fosfatidilcolina HPC e PC foram analisadas por microDSC. Os parâmetros termodinâmicos obtidos das curvas de microDSC (Figura 32) estão na Tabela 16.



Figura 32: Curvas de microDSC para suspensões contendo misturas das fosfatidilcolinas HPC e PC, com e sem ISOTN encapsulada

Tabela 16: Parâmetros de microDSC obtidos das soluções lipossomais contendo misturas ou não de fosfatidilcolinas HPC e PC, contendo ou não ISOTN encapsulada (~5 μ mol). Razão molar ISOTN/(HPC+PC) em 0,026:1

suspensões	ΔH	T _m	largura a	
lipossomais	(cal/g)	(°C)	1/2 altura (°C)	
Lipo_HPC vazio	10,6±0,1	53,0±0,1	1,8±0,1	
Lipo_HPC(ISOTN5µmol)	9,9±0,1	52,3±0,1	2,4±0,1	
Lipo_HPC/PC(60/40) vazio	5,2±0,1	43,7±0,1	6,3±0,1	
Lipo_HPC/PC(75/25)(ISOTN5µmol)	5,6±0,1	47,4±0,1	4,9±0,1	
Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5µmol)	5,0 ±0,1	43,0 ±0,1	6,6±0,1	
Lipo_HPC/PC(50/50)(ISOTN5µmol)	4,7±0,1	40,2±0,1	6,9±0,1	
Lipo_HPC/PC(25/75)(ISOTN5µmol)	0,9±0,2	32,5±0,1	6,1±0,1	

Análises dessas curvas (Figura 32) indicaram que a presença de fosfatidilcolina insaturada PC misturada com fosfatidilcolina HPC, alargou o pico relativo à transição de fase, diminuiu o ΔH e a T_m, indicando fluidificação da bicamada lipídica. Com o aumento da concentração de fosfatidilcolina PC na mistura com HPC, maiores variações nos parâmetros foram observadas. Segundo Taylor e Craig (2003), fosfolipídios de origem natural (ovo e soja) insaturados apresentam temperaturas de transição de fase entre -15 a -5 °C e -30 a -20 °C, respectivamente.

O perfil da curva de Lipo_HPC/PC(60/40)vazio, Figura 32, apresentou-se apenas como um pico largo, sendo diferente do obtido com a suspensão Lipo_HPC/DO(60/40)vazio (item 4.2.2.3.1, Figura 31), a qual apresentou dois picos. Isto pode ser uma indicação de maior miscibilidade entre componentes PC e HPC.

A presença de ISOTN na suspensão contendo 40% em mol de PC (Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5µmol)) mostrou tendência de diminuir a $T_m e \Delta H$, e aumentar a largura do pico referente à transição de fase. Comportamento característico de substâncias que se inserem na bicamada, diminuindo a ordem do empacotamento dos fosfolipídios (Taylor e Craig, 2003). Novamente, este resultado foi diferente do obtido com a suspensão Lipo_HPC/DO(60/40)(ISOTN5µmol). É provável que, ocorrendo maior miscibilidade entre as fosfatidilcolinas HPC e PC, existam menos microdomínios enriquecidos com fosfatidilcolina PC, os quais poderiam atrair maior quantidade de moléculas de ISOTN. Neste caso, a ISOTN deve estar distribuída de forma mais homogênea entre os fosfolipídios.

4.2.3 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina insaturada PC

4.2.3.1 Suspensões lipossomais de fosfatidilcolina PC contendo diferentes números de moles de ISOTN

Para comparações com as suspensões lipossomais de fosfatidilcolina saturada HPC, foram preparadas suspensões lipossomais somente com fosfatidilcolina insaturada PC. Conforme os resultados já obtidos, a fluidez das bicamadas é o fator mais importante para encapsulação da ISOTN. Portanto, lipossomas contendo somente fosfatidilcolinas insaturadas PC, devem fornecer o ambiente adequado para a inserção do fármaco. Foram avaliadas diferentes razões molares ISOTN/PC. Os resultados das analises por microscopia óptica das suspensões lipossomais após 15 dias da preparação lipossomal estão na Tabela 17.

Tabela 17: Número de cristais de ISOTN encontrados em suspensões lipossomais de fosfatidilcolina PC contendo diferentes números de moles de ISOTN, 15 dias após a preparação lipossomal. PC~192 μmol

suspensões lipossomais	ISOTN (µmol)	razão molar ISOTN/PC	no.cristais/mm ²	
Lipo_PC(ISOTN4µmol)	4	0,0207:1	0	
Lipo_PC(ISOTN5µmol)	5	0,0260:1	0	
Lipo_PC(ISOTN6,8µmol)	6,8	0,0351:1	1,3±0,3	
Lipo_PC(ISOTN10,4µmol)	10,4	0,0543:1	9,3±0,8	

Conforme a Tabela 17, as suspensões Lipo_PC(ISOTN6,8μmol) e Lipo_PC(ISOTN10,4μmol) apresentaram cristais de ISOTN na suspensão 15 dias após a preparação das vesículas, indicando vazamento do fármaco. Os cristais foram visualizados na suspensão Lipo_PC(ISOTN10,4μmol) logo após sua preparação.

A suspensão lipossomal contendo ISOTN \leq 5 µmol, que corresponde a razão molar ISOTN/PC de 0,0260:1, encapsulou todo o fármaco. A suspensão Lipo PC(ISOTN5µmol) foi escolhida para outras caracterizações, sendo denominada também de Lipo PC. O valor de molar ISOTN/PC 0.026:1 razão ~ é igual ao utilizado nos lipossomas Lipo_HPC/PC(60/40)(ISOTN5µmol) e Lipo_HPC/DO(60/40)(ISOTN5µmol), os quais também apresentaram máxima encapsulação do fármaco.

Não foi possível avaliar a influência da ISOTN nos lipossomas constituídos por fosfatidilcolina PC via microDSC devido às limitações das temperaturas de trabalho do equipamento (opera somente com temperaturas positivas). Fosfatidilcolinas insaturadas apresentam temperaturas de transição de fase abaixo de 0°C (New, 1990; Taylor e Craig 2003).

4.2.3.2 Lipossomas constituídos de misturas de fosfatidilcolina PC e outras substâncias lipofílicas

Foi testada a influência de colesterol na encapsulação da ISOTN nas vesículas. Foram preparadas suspensões lipossomais com fosfatidilcolina PC e colesterol variando a razão molar ISOTN/(PC+colesterol) e a razão molar PC/colesterol. Foi avaliada a quantidade de cristais de ISOTN por microscopia óptica, 15 dias após a preparação lipossomal. Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

suspensões lipossomais	razão molar ISOTN/(PC+Col)	ISOTN (µmol)	Col (% mol)	no.cristais/mm ²
Lipo_PC/Col(85/15)(ISOTN6,8µmol)	0,0352:1	6,8	15	5,3±0,8
Lipo_PC/Col(85/15)(ISOTN5µmol)	<u>0,0260:1</u>	<u>5</u>	<u>15</u>	<u>0</u>
Lipo_PC/Col(85/15)(ISOTN4µmol)	<u>0,0207:1</u>	<u>4</u>	<u>15</u>	<u>0</u>
Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN6,8µmol)	0,0352:1	6,8	20	8±1
Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN5µmol)	<u>0,0260:1</u>	<u>5</u>	<u>20</u>	<u>0</u>
Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN4µmol)	<u>0,0207:1</u>	<u>4</u>	<u>20</u>	<u>0</u>
Lipo_PC/Col(70/30)(ISOTN6,8µmol)	0,0352:1	6,8	30	13±2
Lipo_PC/Col(70/30)(ISOTN5µmol)	0,0260:1	5	30	7,3±0,5
Lipo_PC/Col(70/30)(ISOTN4µmol)	0,0207:1	4	30	3,3±0,5

Tabela 18: Número de cristais de ISOTN encontrados em suspensões lipossomais constituídas de misturas de fosfatidilcolina PC com colesterol (Col), 15 dias após a preparação lipossomal

Suspensões lipossomais de PC contendo colesterol em concentrações de 15 ou 20% em mol e razão molar ISOTN/(PC+colesterol) variando de 0,0207:1 a 0,0260:1 (suspensões destacadas com sublinhado), não apresentaram cristais de ISOTN.

Nas suspensões com ISOTN fixada em 6,8 µmol, isto é, com razão molar ISOTN/(PC+ colesterol) igual a 0,0352:1, pode-se observar que o aumento da porcentagem molar de colesterol (de 15 para 20 e 30% mol), acarretou maior vazamento de ISOTN (verificado pela

presença de maior quantidade de cristais de ISOTN). Todas as suspensões contendo 30% mol de colesterol diminuíram a encapsulação de ISOTN nos lipossomas. A presença de colesterol, mesmo no ambiente mais fluido dos lipossomas de fosfatidilcolina insaturada PC, competiu com a ISOTN pela região de inserção na bicamada lipídica. Este comportamento também foi avaliado em lipossomas constituídos de fosfatidilcolina HPC (item 4.2.2.3.2). Mohammed *et al.* (2004) verificaram a diminuição da encapsulação de ibuprofeno em lipossomas de PC contendo mais que 20% mol de colesterol, em virtude da redução na área efetiva por molécula na bicamada lipídica, dificultando assim, a entrada de outras moléculas lipofílicas (competição).

PC Para comparação com lipossomas contendo apenas fosfatidilcolina (Lipo_PC(ISOTN5µmol)), optou-se por avaliar a suspensão com a mesma razão molar **ISOTN**/lipídios de 0,026:1 е contendo 20% mol de colesterol, Lipo PC/Col(80/20)(ISOTN5µmol), também denominada somente de Lipo PC/Col.

Brisaert *et al.* (2001) encapsulou toda TN em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo contendo 20% mol de colesterol, com a razão molar tretinoína/lipídios de 0,0526:1. No caso da ISOTN, pela presença da conformação *cis*, existiram maiores restrições para sua encapsulação nas bicamadas (loele *et al.*, 2005) obtendo-se uma menor razão molar ISOTN/lipídios.

Lipossomas de fosfolipídios insaturados apresentam maior tendência de fusão a longo prazo (Lasic, 1993). Uma das formas de minimizar este processo, além de adicionar colesterol, é a presença de lipídios com carga negativa. Lipossomas com cargas negativas na superfície são mais estáveis pela presença da repulsão eletrostática. Para comparações, foi preparada uma suspensão composta de fosfatidilcolina PC e 10% mol de fosfatidilserina (PS), razão molar ISOTN/(PC+PS) de 0,0260:1. Esta suspensão, denominada Lipo_PC/PS(90/10)(ISOTN5µmol) ou simplesmente Lipo_PC/PS, não apresentou nenhum cristal de ISOTN 15 dias após a preparação, permitindo concluir que houve encapsulação total da ISOTN nestas vesículas.

A inclusão de fosfolipídios com carga negativa diminuiu o diâmetro médio dos lipossomas de 2219±110 nm (**Lipo_PC**) para 682±58 nm (**Lipo_PC/PS**), mostrando que a presença de cargas negativas, além de ajudar na estabilidade da suspensão por repulsão eletrostática, também proporciona a formação de vesículas menores (Lasic, 1993).

As suspensões Lipo_PC/Col(80/20)(ISOTN5µmol) e Lipo_PC/PS(90/10)(ISOTN5µmol) foram escolhidas para serem estudadas mais detalhadamente.

4.3 Comparação entre métodos de preparação de lipossomas

Para verificar se diferentes métodos de preparação lipossomal poderiam melhorar a encapsulação da ISOTN em vesículas produzidas com fosfatidilcolina saturada HPC (Lipo_HPC(ISOTN5µmol)), foram testadas as técnicas de hidratação do filme lipídico seco (item 3.4.1), injeção com etanol (item 3.4.2) e encapsulação passiva (item 3.4.3). Estes métodos também foram utilizados para preparar lipossomas contendo fosfatidilcolina insaturada PC (Lipo_PC(ISOTN5µmol)). A razão molar ISOTN/lipídios usada foi 0,026:1, 5 µmol de ISOTN. Foram avaliadas a %EE e a presença de cristais do fármaco, diâmetro médio e polidispersidade das amostras obtidas pelos três métodos (Tabela 19).

período	o análises		hidratação do filme lipídico seco		injeção com etanol		encapsulação passiva	
			Lipo_HPC	Lipo_PC	Lipo_HPC	Lipo_PC	Lipo_HPC	Lipo_PC
inicial	HPLC	ISOTN (%)	97,8±0,9	96,9±0,7	84,8±0,9	81±1	95±1	95,7±0,5
meta		TN (%)	0,8±0,1	0,6±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	0,6±0,2	0,6±0,2
	no.cristais/mm ²		0	0	103±5	12±3	12±1	3±1
inicial	diâmetro médio(nm)/ IP		1976±34/	2458±89/	419±18/	358±27/	184±10/	204±12/
IIICiai			0,31±0,01	0,38±0,02	0,25±0,02	0,27±0,02	0,17±0,01	0,19±0,02
após 15 dias	%EE dens	(grad. idade)	50±1	96±2	38±2	83±2	46±1	89±2

Tabela 19: Comparação entre os métodos de preparação de lipossomas

Os métodos pouco induziram a formação de produto de degradação TN. Os menores diâmetros e polidispersidade dos lipossomas foram obtidos usando os métodos da injeção com etanol e encapsulação passiva. Porém as suspensões lipossomais provenientes destes dois métodos apresentaram cristais de ISOTN logo após a preparação, portanto, não ocorreu encapsulação completa da ISOTN como observado no método da hidratação do filme lipídico seco.

Analisando as amostras 15 dias após a preparação, a %EE da ISOTN foi maior para aquelas preparadas com fosfatidilcolina PC (Lipo_PC), refletindo o maior espaçamento entre

lipídios para acomodar as moléculas do fármaco. Entre os três métodos, a técnica de hidratação do filme lipídico seco, em geral, foi a que proporcionou maior encapsulação do fármaco. Isto se deve a melhor interação dos lipídios com o fármaco antes da hidratação. O método de encapsulação passiva envolve a partição do fármaco adicionado na água para as bicamadas lipídicas (Stillwell e Wassall, 1990). Como a ISOTN, em solução aquosa, cristaliza e forma agregados facilmente (Noy, 1992; Han e Wiedmann, 1998), parte dela pode precipitar e não ser encapsulada. No método de injeção, o etanol pode competir com o fármaco pela mesma região de inserção dentro da bicamada e, assim, diminuir a eficiência de encapsulação.

A encapsulação passiva tem a vantagem de expor o fármaco a menor número de etapas de manipulação, mas envolve uma preparação prévia de lipossomas vazios. O método de injeção também tem a vantagem de envolver menos manipulação da ISOTN, além de fornecer lipossomas menores, permitir escalonamento e ser de baixo custo. Porém, esta técnica é limitada pela solubilidade dos lipídios em etanol (40 mmol/L) (New, 1990) e os lipossomas obtidos têm elevada polidispersidade. Variáveis como velocidade de injeção e agitação, diâmetro da agulha, concentração dos solventes e dos lipídios influenciam o tamanho (New, 1990; Pons *et al.*, 1993; Toiutou *et al.*; 2000,) e, assim, optou-se por utilizar o método de hidratação do filme lipídico seco como o de escolha para preparar suspensões lipossomais contendo ISOTN.

4.4 Diminuição do tamanho dos lipossomas

A distribuição de tamanho lipossomal e a reprodutibilidade do processo de obtenção dos lipossomas são importantes para a eficiência na aplicação e controle dos lotes do material produzido comercialmente (reprodutibilidade). Para diminuir o tamanho e polidispersidade dos lipossomas, utilizam-se técnicas como cromatografia de exclusão em gel, ultracentrifugação por diferenças de densidade, sonicação, extrusão em membranas com tamanho de poros adequados, prensa francesa, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão. A maior parte destes métodos apresenta alto custo e alguns, dependendo da quantidade de material a ser produzido, tornam-se inviáveis (New, 1990). Foram testados dois tipos de métodos que podem ser escalonados: sonicação e extrusão.

4.4.1 Sonicação dos lipossomas

Ultra-som é bastante utilizado em Química, não só para limpeza de materiais e no auxílio para dissolução de substâncias, mas também em reações químicas (Suslick, 1989;

Suslick *et al.*, 1999). Os poucos estudos relacionando lipossomas com ultra-som concentramse, na investigação de processos de nebulização para administração pulmonar de formulações lipossomais (Bridges e Taylor, 2000), análises da deformação e rompimento das vesículas (Marmottant e Hilgenfeldt, 2003) e espectroscopia de ultra-som (Ma *et al.*, 1990). Nenhum efetivamente relaciona a freqüência e a potência ultra-sônica com o tamanho dos lipossomas.

Dos métodos escalonáveis para redução do tamanho dos lipossomas, a sonicação é o de menor custo. Existem dois tipos de sonicadores, o tipo ponteira e o banho. O sonicador tipo ponteira é imerso dentro da suspensão lipossomal. A energia empregada (100 W/cm²) em um pequeno volume de suspensão rompe as membranas, podendo-se obter lipossomas com diâmetro de até 20 nm. Porém, suas limitações são superaquecimento local, pequeno volume de suspensão, reações de peroxidação induzidas em cadeias acila insaturadas, liberação de partículas de titânio contaminando o produto e geração de aerosóis. No sonicador tipo banho, a amostra contida em um recipiente é colocada dentro do banho de ultra-som. A energia empregada (1-5 W/cm²) é dispersa sobre uma grande área limitando, assim, sua eficiência, pois são obtidas vesículas com tamanhos heterogêneos. Este método não causa degradação e nem contaminação (New, 1990; Crommelin e Schreier, 1994). Neste trabalho, o sonicador tipo ponteira não foi indicado, pois a ISOTN apresenta várias duplas ligações que podem ser danificadas.

Os parâmetros importantes na sonicação são: a quantidade de energia liberada na cavitação (intensidade de cavitação) e a densidade de cavitação (número de implosões de cavidades por unidade de volume por unidade de tempo); parâmetros que dependem dos tamanhos das bolhas geradas (Suslick, 1988; Manson, 1989). A intensidade de cavitação diminui se a temperatura do líquido aumenta ou se diminui a tensão superficial do líquido.

A intensidade de cavitação depende diretamente da amplitude da onda e da potência ultra-sônica (isto é, a energia requerida para gerar a cavitação). A intensidade de cavitação é inversamente proporcional à freqüência da onda. Quando esta aumenta, a intensidade de cavitação diminui por causa do menor tamanho das bolhas geradas, resultando em implosões menos violentas e liberando menos energia. O quadrado do raio da bolha é proporcional à energia da implosão. A redução do efeito de cavitação em altas freqüências pode ser compensada pelo aumento da potência ultra-sônica. Aumentando a amplitude das vibrações, existe maior diferença de pressão gerada pelas ondas em relação à pressão ambiente e, consequentemente, maiores energias de implosão. Freqüências maiores são tipicamente associadas com maiores densidades de cavitação e é um fator importante para induzir a remoção/quebra de partículas (Suslick, 1988; Manson, 1989; Fuchs, 2002).

A sonicação deve ser conduzida acima da temperatura de transição de fase dos lipídios, a fim de se obter lipossomas estáveis, eliminando defeitos nas bicamadas, os quais, a longo prazo, podem causar liberação de fármacos encapsulados e induzir a fusão dos lipossomas (New, 1990; Crommelin e Schreier, 1994).

Para redução do tamanho dos lipossomas por ultra-som, foram utilizados vários banhos de ultra-som, todos com a mesma dimensão, temperatura e volume de água. Foram escolhidos banhos com diferentes freqüências e potências para avaliar a influência destes parâmetros no diâmetro médio e na polidispersidade das vesículas.

Como este teste foi realizado no início deste projeto de Tese, foram avaliadas apenas suspensões lipossomais constituídas de fosfatidilcolina HPC, formulação Lipo_HPC(ISOTN5µmol). Antes das sonicações, foi realizada a extrusão das suspensões lipossomais em membranas com diâmetro de poro igual a 1000 nm para possibilitar comparações, visto que lipossomas MLV's obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico seco têm tamanho bastante heterogêneos. Os dados obtidos de diâmetro médio e polidispersidade dos lipossomas nas suspensões sonicadas, nos diferentes banhos de ultrasom, estão mostrados na Figura 33.



Figura 33: Sonicação de lipossomas de fosfatidilcolina HPC (1000 nm) em diferentes banhos de ultra-som: (a) diâmetro médio; (b) polidispersidade dos lipossomas em função do tempo de exposição ao ultra-som

O tamanho dos lipossomas foi influenciado por ambos os fatores: ocorreu diminuição do tamanho com aumento da potência ou da freqüência de ultra-som.

Para freqüência fixa em 25 kHZ, o aumento de 2,4 vezes na potência (de 100 para 240 W), implicou no surgimento de bolhas (cavitações) implodindo com maior energia ao redor das vesículas. Considerando um tempo de 60 min, a diminuição de diâmetro dos lipossomas em relação ao tamanho original foi de 37% (100 W) para 49% (240 W), diferença esta de 12% causada pelo aumento da potência.

Para uma potência fixa em 240 W, o aumento de 1,9 vezes na freqüência (de 25 para 47 kHz), implicou na formação de bolhas com menor tamanho (menor energia) implodindo ao redor das vesículas, e geração de maior densidade de cavitações. Considerando um período de 60 min, a diminuição de diâmetro dos lipossomas em relação ao tamanho original foi de 49% (25 KHz) para 81% (47 KHz), diferença de 32% com o aumento da freqüência.

Observou-se que a freqüência teve um efeito maior que a potência na diminuição do tamanho dos lipossomas. Segundo fabricantes destes equipamentos, banhos de ultra-som que utilizam freqüências maiores são mais efetivos na limpeza de áreas menores. Assim, os lipossomas que são vesículas muito pequenas foram rompidos mais facilmente utilizando maior número de implosões de bolhas pequenas.

Observou-se que o índice de polidispersidade aumentou com o tempo de sonicação (inicial de 0,16 para 0,28, em média), independentemente da freqüência e da potência dos banhos utilizados, atingindo um patamar após 30 min. Portanto, a sonicação, ao mesmo tempo em que diminuiu o tamanho dos lipossomas, aumentou sua polidispersidade. A sonicação envolve a ruptura aleatória de lipossomas, na qual as bicamadas são rompidas e se refazem rapidamente formando vesículas com tamanhos diferentes.

Como o banho de ultra-som 47 kHz/240 W foi o que causou a maior diminuição nos lipossomas vazios e menor diferença de polidispersidade, em relação aos valores originais, sua eficiência foi também testada em relação aos lipossomas contendo ISOTN encapsulada.

Uma parte da suspensão de lipossomas contendo ISOTN encapsulada, preparada no dia, foi extrudada em membrana de 1000 nm e outra não. Posteriormente, alíquotas dessas duas partes (extrudada e não extrudada) foram sonicadas em banho de ultra-som 47 kHz/240 W. Foram comparados o diâmetro médio e a polidispersidade das vesículas destas amostras e de lipossomas vazios, extrudados e não extrudados (Figura 34).

Observou-se que as suspensões contendo lipossomas não extrudados apresentaram reduções de tamanho das vesículas iguais às extrudadas em membranas de 1000 nm (Figura 34). Foram suficientes 30 min de sonicação para estabilizar o tamanho dos lipossomas e a polidispersidade. Os lipossomas vazios obtidos (extrudados ou não) foram maiores e mais polidispersos que aqueles contendo ISOTN. Segundo Stillwell et al. (1982), lipossomas

contendo retinóides são menores que os respectivos lipossomas vazios. Comparando apenas os lipossomas não extrudados, até os 30 min de sonicação, as vesículas vazias foram mais difíceis de romper do que aquelas contendo ISOTN (Figura 34). A inclusão da ISOTN deixou a bicamada lipossomal mais suscetível ao rompimento. Trinta minutos de sonicação foram suficientes para obter lipossomas contendo ISOTN com diâmetro médio ~164 nm.



Figura 34: Sonicação de lipossomas de fosfatidilcolina HPC vazios e contendo ISOTN, sem e com extrusão (1000 nm), em diferentes banhos de ultra-som: (a) diâmetro médio e (b) polidispersidade dos lipossomas em função do tempo de exposição ao ultra-som

Para comparar o método de sonicação com o de extrusão, foi preparada uma nova suspensão lipossomal contendo ISOTN, sendo que uma parte foi sonicada 30 min em banho de ultra-som (47 kHz/240 W) e a outra parte foi processada na extrusora (membranas de 200 nm). A estabilidade química e o tamanho dos lipossomas foram avaliados e comparados em relação aos da suspensão lipossomal original (não submetida à redução de tamanho).

A concentração de ISOTN nos lipossomas sonicados por 30 mim foi diminuída em 7 \pm 1% e foram obtidos 3,2 \pm 0,2% do isômero TN, enquanto nos lipossomas extrudados esses valores foram de 2,1 \pm 0,6% e de 0,6 \pm 0,2%, respectivamente. Na sonicação, o rompimento das bicamadas e a rápida formação de lipossomas cada vez menores, tendem a expor o fármaco ao meio aquoso, o qual em contato com oxigênio dissolvido, aliado à energia liberada na cavitação (implosão da microbolhas), podem provocar sua degradação. Os lipossomas sonicados apresentaram diâmetros médios de 175 \pm 29 nm e polidispersidade de 0,21 \pm 0,02, enquanto os
valores para os extrudados foram 214±8 nm e 0,09±0,01, respectivamente. Devido à alta polidispersidade dos lipossomas, maior degradação da ISOTN e utilização de pequeno volume de amostra, a sonicação não foi adequada para reduzir e homogeneizar o tamanho das vesículas.

4.4.2 Extrusão dos lipossomas

Extrusão é um processo pelo qual os lipossomas MLV's são forçados a passar através de filtros com tamanho de poro definido, para reduzir o tamanho dos mesmos e fazer com que fiquem com diâmetro médio próximo daquele dos poros (New, 1990; Hope *et al.*, 1993; Berger *et al.*, 2001). Conforme visto no item 4.4.1, a extrusão foi mais eficiente que o ultra-som para diminuir e homogeneizar o tamanho das vesículas.

No caso de um fármaco facilmente degradável, como a ISOTN, quanto menor o número de etapas de extrusão, maior será a estabilidade química da suspensão final. Então, foi feito um estudo para determinar quantos ciclos de extrusão seriam necessários para alcançar o tamanho desejado e, ao mesmo tempo, foi monitorada a concentração da ISOTN nos lipossomas extrudados. Suspensões de fosfatidilcolina HPC e PC contendo ISOTN encapsulada (formulações Lipo_HPC(ISOTN5µmol) e Lipo_PC(ISOTN5µmol)) foram expostas a 10 ciclos de extrusão em membranas de 400 nm (Figura 35).



Figura 35: Diâmetro médio e polidispersidade em função do número de extrusões para **Lipo_HPC(ISOTN5µmol)** e **Lipo_PC(ISOTN5µmol)**; extrusão em membrana de 400 nm

Escolheu-se fazer a extrusão em membranas com diâmetro de poro igual a 400 nm: (a) para ter maior controle sobre a estabilidade da suspensão a longo prazo; (b) para diminuir o espalhamento de luz nos testes com fluorescência e (c) porque a aplicação dérmica não exige vesículas tão pequenas como a aplicação intravenosa (100 nm) pois a liberação de fármacos contidos em lipossomas MLV's pode ser mais lenta na pele. Segundo Yarosh (2001), lipossomas com diâmetro de 200 a 600 nm são mais eficientes para aplicação tópica. Du Plessis *et al.* (1994b) verificaram que lipossomas com 300 nm de diâmetro constituem reservatórios mais apropriados para aplicação tópica na pele.

Para as suspensões **Lipo_HPC** e **Lipo_PC** foram necessários, pelo menos, 5 ciclos sucessivos de extrusão para obter vesículas com tamanho e polidispersidade estabilizados.

Após 10 ciclos de extrusão, não se observou degradação significativa do fármaco, as porcentagens de ISOTN e TN na suspensão **Lipo_HPC** foram respectivamente 97,5±0,4% e 0,5±0,1%, e para **Lipo_PC**, os valores corresponderam a 98±1% e 0,7±0,2%. Quinze dias após a extrusão, a suspensão **Lipo_HPC** extrudada apresentou 16±2 cristais/mm² de ISOTN, enquanto que nenhum cristal foi visualizado na suspensão **Lipo_PC** extrudada. Portanto, a diminuição do tamanho (de 2300 nm para 380 nm) dos lipossomas com a extrusão, a qual provavelmente possibilitou o aumento do raio de curvatura das vesículas, não influenciou a estabilidade da ISOTN encapsulada (não impediu o vazamento do fármaco nos lipossomas de HPC).

Lipossomas (não extrudados) obtidos com fosfolipídio PC foram maiores, mais polidispersos, refletindo na maior facilidade de remoção das camadas de lipídios da parede do balão (maiores fragmentos lipídicos) durante a etapa de hidratação.

Como a extrusão não degradou o fármaco, pouco material ficou retido no equipamento (o rendimento do processo foi ~97%) e não houve liberação de ISOTN dos lipossomas mesmo 15 dias após a extrusão, este método foi escolhido para reduzir e homogeneizar as suspensões lipossomais a serem estudadas. Para maior segurança em relação ao tamanho das vesículas, devido às diferentes composições das suspensões lipossomais, optou-se por fazer 7 ciclos sucessivos de extrusão.

4.5 Caracterização dos lipossomas com máxima encapsulação de ISOTN

Nos experimentos anteriores foram obtidas suspensões lipossomais que não mostraram cristais de ISOTN e, portanto, a encapsulação de ISOTN foi ~100%. Foram escolhidas 5

suspensões: Lipo_PC; Lipo_PC/Col; Lipo_PC/PS; Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO. Todas as suspensões contém ~5 μmol de ISOTN encapsulada e razão ISOTN/lipídios ~0,026:1. Nas próximas etapas, foram utilizadas a nomeclatura simplificada das suspensões, por exemplo em vez de Lipo_PC(ISOTN5µmol), usou-se apenas Lipo_PC (ver Tabela 1 e Abreviaturas). Para cada uma delas foram determinados a %EE, o diâmetro das vesículas, verificação da presença de cristais do fármaco por microscopia, realizados ensaios sobre fotodegradação, estabilidade física e química das suspensões por 3 meses, estudos com fluorescência, permeação cutânea, irritação dérmica primária, sendo todas as suspensões extrudadas em membranas (400 nm).

4.5.1 Determinação da porcentagem de ISOTN encapsulada nos lipossomas

A suspensão sem fármaco livre foi considerada como sendo aquela após extrusão (que serviu para reduzir o tamanho e filtrar cristais de ISOTN) seguida de ultracentrifugação (para separar produtos de oxidação da ISOTN solúveis em água).

Após ultracentrifugação das suspensões extrudadas em membranas, foram analisadas alíquotas do sobrenadante e do precipitado ressuspenso em tampão citrato. Os valores foram comparados com a quantidade adicionada no início do processo. A concentração da ISOTN foi determinada por HPLC e o teor de fosfolipídios por método colorimétrico. A partir dos valores de ISOTN e de lipídios foram obtidas a eficiência de encapsulação do fármaco (%EE), a razão molar fármaco/lipídio nas suspensões e o coeficiente de partição entre membrana/tampão. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 20, 21 e 22.

suspensões lipossomais	lipossomas ressuspensos		sobrenadante	
contendo ISOTN encapsulada	(%) lipídios	(%) ISOTN	(%) lipídios	(%) ISOTN
Lipo_PC	96,3±0,2	95,6±0,1	1,1±0,4	1,0±0,3
Lipo_PC/Col	96,8±0,2	96,0±0,3	1,0±0,3	0,7±0,1
Lipo_PC/PS	94,0 0,2	93,1±0,3	3,3±0,6	2,4±0,7
Lipo_HPC/PC	97,6 0,1	96,9±0,2	0,6±0,2	0,7±0,2
Lipo_HPC/DO	92,9±0,2	91,6±0,4	1,1±0,6	1,2±0,4

Tabela 20: Porcentagem de lipídios e de ISOTN nas suspensões lipossomais e sobrenadantes após extrusão/ultracentrifugação em relação ao adicionado no balão

As porcentagens de lipídios e ISOTN obtidos nos lipossomas após separação do fármaco livre (Tabela 20) foram maiores que 92 e 91%, respectivamente. A soma das porcentagens de lipídios e ISOTN nos lipossomas ressupensos e nos sobrenadantes não correspondeu a 100%; os valores variaram de 93 a 98%. Esta diferença deve-se a dificuldades obtidas no processo de obtenção dos lipossomas. As suspensões preparadas estavam concentradas (30 mg/mL de lipídios), turvas e com espuma. Estas características dificultaram a retirada total da suspensão contida no balão após a preparação, a ressuspensão dos lipossomas após ultracentrifugação e o acerto do menisco no balão volumétrico. Na etapa de extrusão, podem ocorrer perdas de material que fica aderido na membrana ou cilindro da extrusora.

A suspensão Lipo_PC/PS após centrifugação apresentou maiores valores de porcentagem de lipídios e ISOTN no sobrenadante em relação às demais (Tabela 20). Isto se deve a dificuldades de sedimentação de lipossomas carregados negativamente. Ao retirar o sobrenadante do tubo, uma pequena porção de lipossomas, não tão compactados, foi carregada junto com o líquido.

Após separação do fármaco livre, a suspensão **Lipo_HPC/DO** foi a que apresentou menor valor de porcentagem de lipídios e ISOTN (Tabela 20), devido a dificuldades de se trabalhar com suspensões contendo surfatantes. Esta suspensão apresentou maior viscosidade e espuma do que as outras.

Na Tabela 20, os valores de %ISOTN correspondem à eficiência de encapsulação da ISOTN, calculada pela Equação 6 (item 3.9.2), normalmente utilizada nos estudos com lipossomas de TN (Montenegro *et al.*, 1996; Sinico *et al.*, 2005). Esta "%ISOTN" pode ser considerada mais como um rendimento do processo lipossomal em relação ao fármaco.

Devido às perdas conjuntas de fármaco e lipídios durante a obtenção dos lipossomas, os valores de ISOTN encapsulada nos lipossomas, após separação do fármaco livre, devem ser maiores. Uma forma de obter um resultado mais real de %EE do fármaco é considerar tanto os números de moles de ISOTN quanto dos lipídios presentes: a razão molar ISOTN/lipídios (Tabela 21).

suspensões	razão ISOTN/lipídios (mol/mol)			
lipossomais contendo ISOTN encapsulada	teórico	experimental	experimental/teórico (%)	
Lipo_PC	0,0257:1	(0,0254 ± 0,0001) :1	99,0 a 99,5	
Lipo_PC/Col	0,0256:1	(0,0254 ± 0,0001) :1	98,9 a 99,4	
Lipo_PC/PS	0,0257:1	(0,0255 ± 0,0002) :1	98,5 a 99,5	
Lipo_HPC/PC	0,0258:1	(0,0257±0,0001):1	99,0 a 99,5	
Lipo_HPC/DO	0,0258:1	(0,0255 ± 0,0002) :1	98,1 a 99,1	

Tabela 21: Razão molar ISOTN/lipídios das suspensões lipossomais

O valores experimentais de razão molar ISOTN/lipídios foram comparados com os teóricos (moles dos componentes usados para preparação dos lipossomas) (Socaciu *et al.*, 2000), havendo boa concordância entre eles, indicação que, se ocorreram perdas durante o processo, elas foram proporcionais entre lipídios e ISOTN. A razão entre os valores experimentais e o teórico forneceu uma %EE da ISOTN mais apropriada que a mostrada na Tabela 20. Pode-se dizer que a %EE da ISOTN foi maior que 98% em todas as suspensões, de modo que a metodologia e os lipossomas obtidos foram adequados para encapsular praticamente todo o fármaco. Estes resultados indicaram que as suspensões não necessitam de prévia separação do fármaco livre para serem utilizadas em outros estudos, como testes *in vitro* e *in vivo*.

O percentual de encapsulação da ISOTN nos lipossomas também pode ser expresso através do coeficiente de partição do fármaco ($P_{l/a}$) entre duas fases imiscíveis: lipossomas e água (de Paula e Schreier, 1996), através da Equação 7 (item 3.9.2). Como as porcentagens de ISOTN encapsulada nos lipossomas estão subestimadas na Tabela 20, o coeficiente de partição foi calculado considerando a porcentagem de ISOTN na membrana através da razão entre os valores experimentais e teóricos (Tabela 21). A porcentagem de ISOTN na solução tampão (sobrenadante) foi obtida subtraindo-se a porcentagem de ISOTN na membrana (Tabela 22) do valor de 100%.

Coeficientes de partição são normalmente obtidos solubilizando-se o fármaco na fase aquosa, em seguida misturando-se esta fase com a orgânica (solvente ou membranas) (Leo *et al.*, 1971). No nosso caso, o coeficiente de partição da ISOTN no sistema lipossomas/água ($P_{l/a}$) foi obtido com a ISOTN dissolvida na fase orgânica (lipídica) e posterior adição de água (método da hidratação do filme lipídico seco, item 3.4.1). Este procedimento facilitou a inserção das moléculas do fármaco na bicamada lipídica, já que a solubilidade do fármaco em água é muito pequena e a ISOTN apresenta facilidade de cristalização em água (a concentração de ISOTN a ser encapsulada foi maior que a solubilidade de ISOTN aquosa). O método de preparação lipossomal por encapsulação passiva (item 3.4.3), utilizado para encapsulação da ISOTN, se assemelha à metodologia tradicional de obtenção de P_{I/a}, porém o fármaco também foi dissolvido em etanol para ser adicionado ao tampão contendo os lipossomas, com a finalidade de facilitar sua entrada nas membranas. Na Tabela 19 (item 4.3) o método de preparação lipossomal por formação do filme lipídico seco proporcionou maior %EE do fármaco do que o método da encapsulação passiva, indicação de que dependendo da metodologia utilizada, os resultados de %EE e partição podem ser diferentes (em virtude da pequena solubilidade do fármaco na água).

suspensões lipossomais contendo ISOTN encapsulada	P _{l/a}	log P _{l/a} médio	
Lipo_PC	3300 a 6633	3,70	
Lipo_PC/Col	3053 a 5520	3,63	
Lipo_PC/PS	2250 a 7374	3,68	
Lipo_HPC/PC	1659 a 7213	3,65	
Lipo_HPC/DO	1730 a 3712	3,43	

Tabela 22: Coeficiente de partição ($P_{I/a}$) da ISOTN entre lipossomas/água (tampão citrato 10 mmol/L, pH 5,6)

Considerando os erros da quantificação de ISOTN e lipídios, obteve-se uma faixa de valores de $P_{l/a}$ para cada suspensão (Tabela 22). Isto ocorreu porque determinações de coeficientes de partição pelo método de separação de fases (centrifugação) podem apresentar erros como dificuldades de separação total das duas fases acarretando, em alguns casos, a presença de lipídios no sobrenadante, distúrbio do estado de equilíbrio do fármaco após a separação (Schreier *et al.*, 2000). Apesar dos possíveis erros experimentais e das variações obtidas de $P_{l/a}$, os valores de log $P_{l/a}$ médio refletem a afinidade da ISOTN pela membrana (Lasic, 1993). Quanto maior a lipofilicidade, maior é a tendência de partição para membranas. Alguns fatores como método utilizado, solubilidade aquosa do fármaco, forma e estrutura do fármaco, pH, temperatura, composição da membrana, presença de interações como ponte de hidrogênio, podem afetar o valor de $P_{l/a}$ (de Paula e Schreier, 1995; Malheiros *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003; Pola *et al.*, 2004).

A eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos é conhecida aumentar com o coeficiente de partição octanol/água (lipofilicidade do fármaco), porém a incorporação em lipossomas de fármacos pouco solúveis em água, não depende apenas das propriedades físico-químicas do mesmo, mas também de outros fatores acima citados como composição da bicamada lipídica e do método de utilizado (Mohammed *et al.*, 2004). A mesma ordem de magnitude dos valores de log $P_{I/a} \sim 3$, obtida para os 5 tipos de lipossomas (Tabela 22), indicou que apesar das diferenças de composição lipossomal, as bicamadas ofereceram um ambiente apropriado (fluído) e semelhante para encapsular ISOTN, justificando a alta porcentagem de encapsulação do fármaco nestas vesículas.

O valor de log P da isotretinoína no sistema octanol/água é ~6,7 (Nankervis *et al.*, 1996), o qual pode ser utilizado como estimativa da afinidade do fármaco (lipofilicidade) com membranas e pode ser correlacionado com sua atividade biológica (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação). Contudo, este coeficiente (ou o log do coeficiente) obtido para o sistema octanol/água nem sempre reflete a real partição do fármaco entre a membrana lipídica e a água, pois o sistema lipossomal é dinâmico e mais complexo que a partição do fármaco entre dois solventes quase imiscíveis. Log P do sistema octanol/água é um parâmetro de lipofilicidade isotrópica, enquanto que log P do sistema lipossoma/água um parâmetro de lipofilicidade anisotrópica. O valor de $P_{l/a}$ é mais representativo, refletindo a partição do fármaco entre membranas/água no organismo (van Balen *et al.*, 2004). Valores diferentes entre coeficientes de partição (membrana/água) e (octanol/água) foram observados por Malheiros *et al.* (1998). Yamamoto e Liljestrand (2004) obtiveram valores de log $P_{l/a} ~3$ para alguns estrogênios esteróides em lipossomas constituídos de bicamadas lipídicas fluídas (valores menores que os correspondentes log do coeficiente de partição octanol/água).

4.5.2 Determinação de diâmetro médio e polidispersidade das suspensões lipossomais

Foi monitorada, através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, a intensidade de luz espalhada pelos lipossomas, fornecendo informações sobre o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos (polidispersidade) das vesículas nas suspensões contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO. Os dados estão na Tabela 23.

suspensões lipossomais	diâmetro médio	nalidianaraidada	
contendo ISOTN encapsulada	(nm)	polidispersidade	
Lipo_PC	330±1	0,15±0,05	
Lipo_PC/Col	312±7	0,14±0,03	
Lipo_PC/PS	276±4	0,12±0,05	
Lipo_HPC/PC	322±7	0,15±0,06	
Lipo_HPC/DO	960±99	0,46±0,06	

Tabela 23: Diâmetro médio e polidispersidade de suspensões lipossomais com ISOTN encapsulada

As suspensões lipossomais, excetuando-se a **Lipo_HPC/DO**, apresentaram vesículas com diâmetros médios semelhantes, um pouco menores que o diâmetro dos poros da membrana de extrusão (400 nm). Os menores lipossomas foram obtidos na suspensão **Lipo_PC/PS**, devido à presença de fosfolipídios com carga negativa.

A suspensão Lipo_HPC/DO apresentou vesículas com diâmetro médio acima do esperado, devido à dificuldade da dispersão lipossomal, pois a agitação vigorosa da suspensão ocasionou a formação de muitas bolhas por causa da presença do surfatante, e uma leve agitação não foi o suficiente para dispersar os aglomerados de lipossomas. No equipamento que determina o tamanho de partículas, as bolhas (que também espalham a luz incidente) são consideradas como partículas e analisadas em conjunto com os lipossomas. A Figura 36b corresponde a uma das réplicas da suspensão Lipo_HPC/DO. Nela nota-se a presença de partículas com diâmetro de 360 a 2687 nm. Sem as bolhas, provavelmente os valores de distribuição e do diâmetro médio dos lipossomas da suspensão Lipo_HPC/DO seriam menores.

Nas outras suspensões, a distribuição do tamanho variou entre 150 e 600 nm. A Figura 36a mostra, como exemplo, os dados para uma das análises da suspensão **Lipo_PC**.

A polidispersidade (~0,14) dos lipossomas nas suspensões foi adequada, principalmente porque a formulação preparada visa aplicação tópica. *Sinico et. al.* (2005), obtiveram valores de polidispersidade de 0,4 a 0,6 para vesículas MLV's contendo TN encapsulada para administração tópica e valores de 0,2 a 0,3 para vesículas sonicadas. A polidispersidade das vesículas da suspensão **Lipo_HPC/DO** foi maior devido às dificuldades citadas.



Figura 36: Gráfico de distribuição Lognormal do tamanho dos lipossomas contendo ISOTN encapsulada nas suspensões: (a) Lipo_PC e (b) Lipo_HPC/DO

4.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Um dos métodos mais utilizados para visualizar lipossomas é a microscopia eletrônica de transmissão. Após coloração da amostra lipossomal com ácido fosfotúngstico ou molibdato de amônio (ou outro material denso de elétrons), é possível determinar a distribuição de tamanho e número de lamelas em lipossomas (New, 1990).

As suspensões contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão e algumas micrografias estão apresentadas na Figura 37 (a–f).



(e) Lipo_HPC/DO

(f) Lipo_HPC

Figura 37: Micrografias eletrônicas de transmissão das suspensões lipossomais contendo ISOTN encapsulada: (a) Lipo_PC; (b) Lipo_PC/Col; (c) Lipo_PC/PS; (d) Lipo_HPC/PC; (e) Lipo_HPC/DO e (f) Lipo_HPC. Na micrografia do Lipo_HPC/DO a barra é de 100 nm e, nas demais, é de 40 nm

O mecanismo que permite a visualização de lamelas concêntricas não é bem conhecido, mas está aliado ao processo de secagem da amostra com o corante. Na microscopia eletrônica, os elétrons são muito pouco absorvidos por material biológico, assim a análise deste material é realizada por contraste (amostra e *background*), através do espalhamento de elétrons pelo uso de corantes. Íons de metais pesados, os quais recobrem a amostra, apresentam maior espalhamento elástico do feixe de elétrons, enquanto as bicamadas lipídicas, compostas basicamente de carbono e hidrogênios, espalham menos o feixe. Apenas os elétrons que passam pelas bicamadas lipídicas são envolvidos na formação da imagem final. Desta forma, quando a imagem é formada, os lipossomas aparecem em contraste negativo (New, 1990) e o resultado visual é a alternância de lamelas concêntricas claras e escuras, mostrada nas Figuras 37 (a–f).

Ocorreram deformação e aglomeração dos lipossomas com a secagem das amostras e apesar da dificuldade de obtenção de boas amostras, várias lamelas lipídicas foram observadas; indicação da formação de lipossomas.

As suspensões lipossomais tendo a componente fosfatidilcolina insaturada PC em maior quantidade (Figura 37a-c) foram as que apresentaram o maior número de lamelas (pelo menos 3). Lipossomas **Lipo_HPC** apresentaram 1 lamela (Figura 37f). A mistura de fosfatidilcolina HPC com PC (Figura 37d), resultou na presença de mais lamelas (pelo menos 2). A suspensão **Lipo_HPC/DO** (Figura 37e) aparentemente apresentou 1 lamela e pode ser que a presença do surfatante tenha dificultado a adequada coloração.

4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Uma das maneiras de visualizar a estrutura lipossomal é através da microscopia eletrônica de varredura, técnica que fornece informações sobre tamanho, fusão, superfície e forma das vesículas (New, 1990). O método de secagem direta da suspensão no porta-amostra é mais fácil, porém, assim como ocorria com a microscopia eletrônica de transmissão, há deformação e agregação dos lipossomas pela desidratação. Para melhor visualizar os lipossomas, foi utilizado o método de Ishii *et al.* (1996), no qual inicialmente uma fita de papel de filtro é imersa na suspensão lipossomal, seguido de fixação com verde de malaquita, glutaraldeído e tetróxido de ósmio. Foram obtidas micrografias do papel de filtro (Figura 38a) e das suspensões contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO fixadas no papel de filtro (Figura 38b-f).



(e) Lipo_HPC/PC

(f) Lipo_HPC/ DO

Figura 38: Micrografias eletrônicas de varredura das suspensões lipossomais contendo ISOTN encapsulada: (a) papel de filtro; (b) **Lipo_PC**; (c) **Lipo_PC/CoI**; (d) **Lipo_PC/PS**; (e) **Lipo_HPC/PC**; (f) **Lipo_HPC/DO**. Barra = 1 μm

As micrografias dos papéis de filtro embebidos nas suspensões apresentaram estruturas diferentes daquelas encontradas no próprio papel. As estruturas (Figura 38b-f), na maior parte, esféricas e polidispersas, correspondem aos lipossomas. Foram obtidos diâmetros médios de 80 a 600 nm, semelhantes aos encontrados por espectroscopia de correlação de fótons (item 4.5.2).

Análises das suspensões lipossomais por SEM, mostraram que o tamanho dos lipossomas da suspensão **Lipo_HPC/DO** (Figura 38e) foi semelhante ao encontrado nas outras formulações lipossomais. Portanto, o valor de diâmetro médio obtido por espectroscopia de correlação de fótons (item 4.5.2) está superestimado pela presença de microbolhas na amostra durante a realização da medida. Estas microbolhas surgiram em virtude da suspensão conter surfatante.

4.5.5 Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais a 8 °C

As suspensões contendo ISOTN encapsulada Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO foram mantidas a 8 °C por 3 meses e avaliadas em relação ao diâmetro médio e polidispersidade (Figura 39a e 39b, respectivamente), por HPLC e microscopia óptica (Figuras 40a e 40b, respectivamente).



Figura 39: Avaliações (a) do diâmetro médio e (b) da polidispersidade das suspensões contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC, durante 3 meses a 8 °C



Figura 40: Avaliações (a) da eficiência de encapsulação e (b) da presença de cristais de ISOTN das suspensões contendo ISOTN encapsulada: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/DO; Lipo_HPC, durante 3 meses a 8 °C

O diâmetro médio e a polidispersidade (Figuras 39a e 39b, respectivamente) e a porcentagem do fármaco encapsulado nos lipossomas (Figura 40a) não foram alterados significativamente durante esse tempo, lembrando que o valor obtido para o diâmetro médio (~1000 nm) e polidispersidade (~0,35) da amostra Lipo_HPC/DO foram superestimados por espectroscopia de correlação de fótons, pela presença de microbolhas.

A amostra **Lipo_PC/Col** apresentou alguns cristais de ISOTN após 30 e 90 dias da preparação das suspensões (Figura 40b), indicando maior instabilidade do fármaco (ou defeitos) nestes lipossomas na presença de colesterol. Este resultado sugere a diminuição da quantidade de colesterol na formulação.

4.5.6 Avaliação da fotodegradação das suspensões lipossomais e solução alcoólica de ISOTN sob lâmpada fluorescente e UVA

As moléculas de ISOTN são extensivamente conjugadas e, portanto, lábeis para isomerização principalmente por luz (Liu e Asato, 1984; Curley e Fowble, 1988). Alguns dos isômeros formados apresentam ações terapêuticas menos intensas e/ou diferentes (Curley e Fowble, 1988, Lehman *et al.*, 1988, Kunchala *et al.*, 2000) e, por isso, os produtos para aplicação tópica contendo ISOTN devem ser utilizados à noite. Formulações que diminuam a

fotodegradação do fármaco podem aumentar a eficácia do tratamento e aumentar o tempo de estocagem do produto a ser comercializado.

Vários estudos têm reportado maior fotoestabilidade de retinóides encapsulados em lipossomas quando comparados aos retinóides dissolvidos em solventes (Curley e Fowble, 1988; Brisaert *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Manconi *et al.*, 2003; loele *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar a fotodegradação da ISOTN encapsulada nos lipossomas produzidos, foram determinadas as porcentagens de ISOTN nas suspensões lipossomais e em solução etanólica, em função do tempo de exposição às lâmpadas fluorescente e UVA (isto é, simulando fotodegradação acelerada). Utilizaram-se soluções alcoólicas e suspensões lipossomais contendo ~0,83 mmol/L de ISOTN, a qual corresponde a 0,025% (m/m) do fármaco.

Inicialmente avaliou-se a emissão da lâmpada fluorescente utilizada. Foi verificado que a lâmpada emite radiação principalmente na região do visível e num pequeno intervalo na região do UV (Figura 41).





As suspensões Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC, e a solução etanólica de ISOTN, foram expostas a lâmpada fluorescente. A decomposição fotoquímica da ISOTN foi avaliada por HPLC, pois os produtos de degradação da ISOTN (isômeros) absorvem no mesmo intervalo de comprimentos de onda (Gundersen e Blomhoff, 2002), dificultando a análise por espectroscopia de absorção na região UV/VIS.

A Figura 42 mostra o decaimento temporal da concentração de ISOTN irradiada com luz da lâmpada fluorescente. Pode-se observar que o fármaco encapsulado em lipossomas apresentou menor fotodegradação que o dissolvido em etanol, com exceção da suspensão lipossomal **Lipo_HPC**. Os lipossomas rígidos formados por fosfatidilcolina HPC, além de

favorecerem o vazamento do fármaco com o tempo, proporcionaram maior degradação, estando este fato relacionado à menor estabilidade do fármaco na bicamada.



Figura 42: Fotodegradação da ISOTN (~0,83 mmol/L) em solução alcoólica e em suspensões lipossomais, irradiada sob lâmpada fluorescente, durante 24 h

Plotando In ([ISOTN]/[ISOTN]_{inicial}) versus tempo (Lachman *et al.*, 2001), obteve-se o constante de velocidade da fotodegradação (K_{tot}) por ajuste linear, considerando uma cinética de primeira ordem até 60/90 min de irradiação. A Figura 43 corresponde ao gráfico de In([ISOTN]/[ISOTN]_{inicial}) versus tempo da suspensão **Lipo_PC**.



Figura 43: Gráfico de In([ISOTN]/[ISOTN]_{inicial}) x tempo para suspensão **Lipo_PC** contendo ISOTN encapsulada após irradiação sob lâmpada fluorescente, durante 24 h. [ISOTN] é a concentração do fármaco em um dado instante e [ISOTN]_{inicial} a inicial (0 min)

O produto de degradação formado no início da fotodegradação foi basicamente TN; todavia, após 60 min, o gráfico mencionado se desvia da linearidade, indicando que a cinética se tornou mais complexa, com formação de outros isômeros que podem se interconverter (Figura 44). Os valores de K_{tot} estão apresentados na Tabela 24.

As Figuras 44a e b correspondem aos cromatogramas de ISOTN em etanol e em suspensão Lipo_PC, respectivamente, nas quais pode-se observar a formação dos isômeros do fármaco durante o período de irradiação. Os picos em t_r 11,3 min e 13,5 min correspondem à ISOTN e TN, respectivamente. A falta de padrões impossibilitou a identificação dos outros isômeros (correspondentes aos dois picos centrais), os quais surgiram a partir de 60 min de irradiação. A suspensão Lipo_PC minimizou a formação destes dois isômeros em relação ao da solução alcoólica. O mesmo comportamento foi obtido com as outras amostras lipossomais.



Figura 44: Cromatogramas (HPLC) de ISOTN após irradiação sob lâmpada fluorescente. (a) solução de ISOTN em etanol; (b) suspensão **Lipo_PC** contendo ISOTN encapsulada

Os dados da Tabela 24 indicam que a solução etanólica com ISOTN apresentou maior constante de velocidade de fotodegradação ($K_{fot} = 0,0072 \text{ min}^{-1}$) e a menor concentração de fármaco residual (27%) após irradiação sob lâmpada fluorescente do que as suspensões lipossomais. Os valores de K_{fot} obtidos para as suspensões foram semelhantes (K_{fot} médio = 0,0048 min⁻¹ e [ISOTN]=40%), considerando 24 h. A encapsulação do fármaco em lipossomas aumentou a estabilidade fotoquímica, pois a ISOTN em solução alcoólica foi mais facilmente isomerizada (fotodegradação foi mais rápida) que a ISOTN encapsulada na bicamada lipossomal.

amostras contendo	constante de velocidade- K _{fot}			
ISOTN	(min ⁻¹)	150 IN apos 24 II (%)		
lâmpada fluorescente				
etanol	$0,0072 \pm 0,0003$	27,4±0,2		
Lipo_PC	$0,0051 \pm 0,0003$	39,3±0,2		
Lipo_PC/Col	0,0047 ± 0,0005	44,3±0,2		
Lipo_PC/PS	0,0051 ± 0,0004	40,1±0,3		
Lipo_HPC/PC	$0,0046 \pm 0,0002$	37,2±0,1		
Lipo_HPC/DO	$0,0046 \pm 0,0003$	39,0±0,2		
Lipo_HPC	$0,0049 \pm 0,0002$	17,8±0,1		
lâmpada UVA				
etanol	$0{,}038 \pm 0{,}007$	17,0±0,2		
Lipo_PC	$0,014 \pm 0,002$	26,7±0,1		
Lipo_HPC	0,027 ± 0,002	0		

Tabela 24: Constante de velocidade da fotodegradação e porcentagem de ISOTN restante após exposição à luz de lâmpada fluorescente e UVA por 24 h

loele *et al* (2005), utilizando irradiação com luz de lâmpada fluorescente, determinaram que o constante de velocidade da fotodegradação da ISOTN em etanol (5,4 x10⁻³ min⁻¹) foi maior que o obtido com o fármaco encapsulado em lipossomas produzidos com fosfatidilcolina de ovo ($3,1x10^{-3}$ min⁻¹). Estes valores são semelhantes aos mostrados na Tabela 24.

Foram comparadas as fotodegradações da ISOTN lipossomal e alcoólica sob lâmpada fluorescente (simulando luz interna de ambientes, como laboratórios e residências) e sob lâmpada de UVA (simulando radiação UVA da luz solar), Figura 45 e Tabela 24. A ISOTN presente nas suspensões **Lipo_PC** e **Lipo_HPC** e solução etanólica de ISOTN irradiadas sob luz UVA, sofreu maior degradação que sob lâmpada fluorescente, indicando que a radiação UVA (de maior energia) foi mais prejudicial ao fármaco (Tabela 24). Após 24 h de irradiação a ordem crescente de fotodegradação com luz UVA foi **Lipo_PC**
solução etanólica<**Lipo_HPC**, semelhante à encontrada utilizando lâmpada fluorescente. Novamente, lipossomas **Lipo_HPC** demonstraram ser inadequados para encapsulação de ISOTN.



Figura 45: Fotodegradação da ISOTN (~0,83 mmol/L) em solução alcoólica e em suspensões lipossomais, irradiada sob lâmpada UVA, durante 24 h

A suspensão lipossomal contendo ISOTN será aplicada sobre a pele, provavelmente, na forma de gel lipossomal (suspensão + espessante), o qual ficará exposto à luz ambiente. Para comparar a fotodegradação da ISOTN em solução (Figura 42) e na forma de gel, a suspensão **Lipo_PC** contendo ISOTN encapsulada foi adicionada ao gel aquoso de hidroxipropilcelulose e a solução etanólica de ISOTN ao gel alcoólico de hidroxipropilcelulose (item 3.8). Estes géis foram irradiados durante 4 h sob lâmpada fluorescente e depois analisados (Figura 46).



Figura 46: Fotodegradação da ISOTN (~0,83 mmol/L) em gel etanólico, gel lipossomal Lipo_PC, etanol e suspensão Lipo_PC de ISOTN sob lâmpada fluorescente, durante 4 h

Em geral, a ISOTN presente nos géis alcoólico e lipossomal apresentou menor degradação após 4 h de exposição à lâmpada fluorescente que nas respectivas soluções alcoólica e lipossomal, sendo que a maior fotoproteção da ISOTN ocorreu no gel lipossomal (restou 60% da ISOTN inicial), Figura 46. Este, por ser mais turvo, causou maior espalhamento da luz incidente, diminuindo a fotodegradação da ISOTN. O gel alcoólico é mais translúcido, enquanto que o lipossomal tem aparência cremosa. Portanto, a utilização de gel auxiliou na proteção do fármaco, resultado este importante para possível comercialização do produto.

Deste modo pode-se afirmar que um dos objetivos foi alcançado, pois a formulação lipossomal estabilizou mais a ISOTN que a convencional.

A radiação da lâmpada fluorescente e da UVA degradou a ISOTN com pouco tempo de exposição, confirmando a importância de se utilizar vidraria âmbar e reduzir a intensidade da luz ambiente durante a manipulação deste fármaco. Além disso, produtos para aplicação tópica a base de ISOTN, realmente devem ser utilizados à noite ou o paciente deve evitar exposição à radiação solar ou de lâmpadas fluorescentes logo após a aplicação.

4.5.7 Análise de fluorescência das suspensões lipossomais

Foram utilizados vários métodos de fluorescência a fim de verificar as diferenças da microfluidez e micropolaridade entre as suspensões lipossomais e confirmar a encapsulação da ISOTN nas vesículas. As suspensões lipossomais analisadas foram: Lipo_PC, Lipo_PC/Col, Lipo_PC/PS, Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC.

Estes estudos basearam-se no uso de sondas fluorescentes como pireno e TMA-DPH. A razão entre as intensidades de fluorescência das componentes vibrônicas I_1/I_3 do pireno está relacionada à micropolaridade do meio onde a sonda está inserida. Por outro lado, a razão entre as intensidades de fluorescência do excímero e do monômero (I_E/I_M) do pireno reflete a formação de excímeros pela capacidade de deslocamentos laterais da sonda na bicamada lipossomal, processo este controlado por difusão. O grau de anisotropia avalia a restrição aos movimentos rotacionais da sonda inserida (ou não) na bicamada lipídica (Kalyanasundaram e Thomas, 1977; Galla e Hartmann, 1980; Lakowicz, 1999).

Segundo Thomson (1969), ácidos retinóicos não fluorescem à temperatura ambiente e, portanto, é praticamente impossível monitorar, via fluorescência intrínseca de ISOTN, sua incorporação à bicamada lipossomal e investigar as mudanças que este fármaco pode causar nas propriedades das membranas. Desta forma, foi necessário o uso de sondas fluorescentes extrínsecas para verificar, de forma indireta, a presença da ISOTN na bicamada vesicular.

Vários estudos foram realizados com pireno (ou seus derivados), TMA-DPH e outras sondas para investigar o efeito de substâncias encapsuladas em lipossomas (Engelke *et al.*, 1996; Engelke *et al.*, 2001; loffe e Gorbenko, 2005; Crosas *et al.*, 2006). Artigos de revisão (Somerharju, 2002; Maier *et al.*, 2002) exploram as várias aplicações destas sondas.

A solução de pireno em tampão citrato e as suspensões lipossomais vazios e com ISOTN encapsulada foram tituladas com iodeto (Figuras 47, 48 e 49, respectivamente). A supressão da fluorescência da sonda foi utilizada para avaliar sua localização na membrana lipossomal.

Íons iodeto suprimem a fluorescência de moléculas de pireno localizadas próximo à interface lipídio/água. A eficiência dessa supressão depende da organização lipídica e da localização do fluoróforo e ela resulta do cruzamento intersistemas para um estado triplete, promovido pelo acoplamento spin-órbita do fluoróforo excitado e o supressor. A emissão de luz a partir o estado triplete é lenta, podendo ser também suprimida por outros processos (Langner e Hui, 1991; Lakowicz, 1999).



Figura 47: Supressão da intensidade de fluorescência do pireno (1 μmol/L) em tampão citrato 10 mmoL/L pH 5,6 pela adição do supressor iodeto



Figura 48: Supressão da intensidade de fluorescência do pireno (1 μmol/L) incorporado em suspensões de lipossomas **vazios** (**Lipo_PC**; **Lipo_PC/Col**; **Lipo_PC/PS**; **Lipo_HPC/PC**; **Lipo_HPC/DO** e **Lipo_HPC**) pela adição de iodeto. Razão molar lipídios/pireno: 250:1. A legenda, comum a todos, está no último gráfico



Figura 49: Supressão da intensidade de fluorescência do pireno (1 μmol/L), incorporado em suspensões de lipossomas com **ISOTN encapsulada (Lipo_PC; Lipo_PC/Col; Lipo_PC/PS;** Lipo_HPC/PC; Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC) pela adição de iodeto. Razão molar lipídio/pireno ~250:1 e razão molar ISOTN/pireno ~6,5:1. A legenda, comum a todos, está no último gráfico e eles foram expandidos para melhor visualização

Através dos espectros das Figuras 47 a 49, foram obtidos os gráficos de Stern-Volmer, $[(F_0/F) - 1]$ versus [KI] (Figura 50), utilizando a Equação 8. Segundo Lakowicz (1999), estes gráficos se desviam da linearidade em direção ao eixo x, se existem duas populações de fluoróforos, sendo que uma delas não está acessível ao supressor. Assim, apenas as moléculas de pireno dispostas mais na interface têm fluorescência suprimida, pois os íons iodeto não penetram facilmente no interior da membrana. A fluorescência remanescente corresponde a das moléculas de pireno inacessíveis a esses íons e que estão inseridas internamente na bicamada lipídica. Esta fluorescência é, portanto, independente da concentração do supressor.



Figura 50: Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F)-1 versus [KI] em suspensões lipossomais contendo pireno: (a) lipossomas vazios (razão molar lipídio/pireno ~250:1) e (b) lipossomas encapsulados com ISOTN (razão molar lipídios/pireno ~250:1 e razão molar ISOTN/pireno ~6,5:1). A legenda, comum a todos, está no último gráfico e eles foram expandidos para melhor visualização

Nas Figuras 50a e b não foi observada a linearidade de $[(F_0/F) - 1]$ versus [KI], indicando que não havia uma única população de moléculas de pireno na suspensão. Parte das moléculas desta sonda se inseriu em região mais hidrofóbica da membrana lipossomal, de difícil acesso ao supressor. Observou-se, ainda, tendência à saturação da intensidade de fluorescência em maiores concentrações de iodeto.

A supressão da fluorescência das duas populações de fluoróforos, uma das quais é inacessível ao supressor, foi analisada usando a forma modificada da equação de Stern-Volmer (Equação 9). Foram obtidos gráficos de $[F_0/(F_0-F)]$ versus 1/[KI] (Figura 51).

Nos gráficos da Figura 51 foram obtidas linhas retas, tanto para as amostras com lipossomas vazios quanto para aquelas com os lipossomas contendo ISOTN encapsulada. A

inclinação da reta foi obtida considerando os quatro últimos pontos, em virtude de uma parte das moléculas de pireno estarem inacessível aos íons iodeto e a saturação da supressão com a adição de maiores concentrações desses íons. Os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a fração da intensidade de fluorescência acessível ao supressor (f_a) estão na Tabela 25.



Figura 51: Gráficos de Stern-Volmer modificado $F_0/(F_0-F)$ versus 1/[KI] em suspensões lipossomais contendo pireno: (a) lipossomas vazios (razão molar lipídio/pireno ~250:1) e (b) lipossomas encapsulados com ISOTN (razão molar lipídios/pireno ~250:1 e razão molar ISOTN/pireno ~6,5:1). A legenda, comum a todos, está no último gráfico e os gráficos foram expandidos para melhor visualização

amostras	PIRENO em lipossomas vazios		PIRENO em lipossomas contendo ISOTN		
	f _a (%)	K _{sv} (L.mol ⁻¹)		f _a (%)	K _{sv} (L.mol ⁻¹)
PC	14,9	19,6		30,0	85,3
PC/Col	18,3	21,2		35,8	90,5
PC/PS	24,1	23,9		31,4	86,0
HPC/PC	33,3	41,1		42,3	136,1
HPC/DO	49,8	37,5		56,8	126,8
HPC	52,2	90,2		75,3	141,2
PIRENO em tampão					
	f _a (%)			K _{sv} (L.mol ⁻¹)	
tampão	96,7			152,0	

Tabela 25: Valores de K_{SV} e f_a obtidos dos gráficos de Stern-Volmer para as suspensões lipossomais com e sem ISOTN encapsulada contendo pireno e supressor iodeto

Dos espectros de pireno em tampão (Figura 47) e em lipossomas (Figura 48 e 49), <u>sem</u> <u>adição do supressor</u>, foram obtidos: razão I_1/I_3 (Figura 52), a razão I_E/I_M (Figura 53) e os valores do grau de anisotropia (Figura 54).



Figura 52: Razão entre as de intensidades de fluorescência das componentes vibrônicas 1 e 3, obtido dos espectros do monômero de pireno em tampão e encapsulado em lipossomas, contendo ou não ISOTN



Figura 53: Razão entre as áreas das bandas de fluorescência do excímero e a do monômero do pireno em tampão e encapsulado em lipossomas, contendo ou não ISOTN



Figura 54: Grau de anisotropia de pireno em tampão e encapsulado em lipossomas contendo ou não ISOTN

O espectro de fluorescência do pireno (1 μ mol/L) dissolvido em tampão citrato (Figura 47) apresentou intensa banda (máximo em 373 nm), vibronicamente estruturada correspondente ao monômero e outra banda (máximo em 473 nm), pouco perceptível, referente ao excímero. O valor I_E/I_M obtido para o pireno em tampão foi de 0,29. Segundo Kalyanasundaram e Thomas (1977), a intensidade da componente 1 é bem maior do que da componente 3 (I₁/I₃ = 1,7), fato característico da molécula de pireno em ambiente polar, neste caso a água.

Nesta mesma Figura 47, observou-se a supressão eficiente da fluorescência do monômero com a adição de íons iodeto, indicando o acesso mais fácil do supressor pelo fluoróforo. Análises prévias acompanhando a variação temporal da fluorescência indicaram que a supressão ocorre logo após a adição do supressor.

Inicialmente serão discutidos os resultados obtidos com pireno incorporado em suspensões de lipossomas vazios (Figura 48).

Os espectros de fluorescência do pireno incorporado em suspensões lipossomais apresentaram características diferentes em relação ao do pireno dissolvido em tampão. A adição do pireno nas suspensões lipossomais diminuiu I_1/I_3 (Figura 52), indicando que a sonda se inseriu em um ambiente mais hidrofóbico, como a bicamada lipídica. Os valores de K_{SV} e f_a (Tabela 25) indicaram que o pireno está menos acessível ao supressor. A encapsulação do pireno nos lipossomas aumentou a probabilidade da aproximação entre as moléculas da sonda,

refletindo-se no maior valor de I_E/I_M (Figura 53), e também restringiu os movimentos rotacionais do pireno, causando aumento do grau de anisotropia (Figura 54). As variações das intensidades de fluorescência foram menores para pireno encapsulado em lipossomas do que para pireno em tampão (Figuras 48 e 47, respectivamente), indicando que o pireno está encapsulado.

Em lipossomas de fosfatidilcolina HPC, as cadeias acila estão arranjadas na conformação *trans*, formando bicamadas mais rígidas e impermeáveis (New, 1990). Para haver maior incorporação de pireno neste tipo de lipossoma, a incubação foi realizada acima da T_m , pois assim as bicamadas lipídicas estavam mais fluidas. Porém, com o resfriamento da suspensão em temperatura abaixo da T_m , houve aumento do empacotamento da bicamada, reduzindo o espaço disponível para alojar as moléculas de pireno. Estas para se acomodarem dentro da bicamada lipídica, a qual se tornou mais rígida por causa da temperatura menor, tenderam a se segregar em pequenos domínios em regiões onde existem defeitos no empacotamento ou em regiões menos rígidas da bicamada (Galla e Sackmann, 1974; Müller *et al.*, 1986). Devido à maior compactação das cadeias acila, provavelmente as moléculas de pireno em membranas mais rígidas estão mais próximas da cabeça polar dos fosfolipídios.

Os lipossomas constituídos por fosfatidilcolina insaturada PC apresentam maior fluidez e permeabilidade devido à dificuldade de empacotamento da bicamada causada pela conformação *gauche* das cadeias acila, aumentando o volume por área de fosfolipídio (New, 1990). Este menor empacotamento das cadeias facilita tanto a inserção de moléculas na bicamada quanto o escape de moléculas para o cerne aquoso, principalmente de fármacos hidrofílicos. Lipossomas produzidos com fosfatidilcolinas insaturadas fornecem um ambiente com menores restrições aos movimentos lateral, transversal e rotacional do pireno que lipossomas formados por fosfatidilcolinas saturadas (Galla e Sackmann, 1974).

Na Figura 48, pode-se observar que a banda do excímero do pireno foi mais intensa nos lipossomas contendo fosfatidilcolina saturada HPC (formulações Lipo_HPC/PC; Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC) do que fosfatidilcolina insaturada PC (formulações Lipo_PC; Lipo_PC/Col e Lipo_PC/PS), indicando que moléculas de pireno estavam mais próximas, provavelmente pelo aumento local da concentração da sonda, isto é, pela formação de microdomínios desta sonda (Galla e Sackmann, 1974, Galla e Hartmann, 1980). Em lipossomas formados com HPC foram obtidos os maiores valores para I_1/I_3 , K_{SV} e f_a , indicando que moléculas de pireno ficaram mais expostas às moléculas de água e ao supressor, estando provavelmente mais próximas da cabeça polar. O maior valor do grau de anisotropia indicou que a sonda estava em um ambiente mais rígido, que dificultou o movimento molecular.

Análises entre as formulações com fosfatidilcolina PC (Lipo_PC; Lipo_PC/Col e Lipo PC/PS), indicaram algumas diferenças nos valores dos parâmetros I₁/I₃, K_{SV} e f_a. Na comparação de Lipo_PC/PS com Lipo_PC, observou-se que a incorporação de fosfolipídio com carga negativa (PS) nos lipossomas contendo PC, provavelmente forneceu maior espaçamento entre os fosfolipídios (devido à repulsão eletrostática entre as cabeças polares), possibilitando que mais moléculas de água (e, portanto, também íons iodeto) penetrassem em regiões próximas às moléculas de pireno, aumentando a micropolaridade do local próximo da sonda (> valor I₁/I₃). Possibilitou, também, maior deslocamento lateral das moléculas de pireno (implicando na maior concentração de excímeros) e maior liberdade rotacional do pireno (menor grau de anisotropia). A formulação Lipo PC/Col possui colesterol, o qual restringiu os movimentos das moléculas de pireno e, portanto, a probabilidade de formação de excímero. Os valores do grau de anisotropia, I_1/I_3 , $K_{SV} e f_a$ obtidos para Lipo PC/Col em relação à formulação Lipo PC, sugeriram que as moléculas rígidas de colesterol deslocaram as moléculas de pireno mais para a interface. Os lipossomas Lipo_PC encapsularam moléculas de pireno em regiões mais hidrofóbicas pois o valor do grau de anisotropia foi maior e os valores de K_{SV} , f_a e I₁/I₃ foram menores.

Nos lipossomas com fosfatidilcolina HPC (Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC), observou-se que os Lipo-HPC, por serem mais compactos, apresentaram maior valor do grau de anisotropia do pireno. Além disso, a dificuldade de encapsulação da sonda na região rígida das cadeias acila, proporcionou às moléculas de pireno estarem mais próximas da interface, fato este devido aos maiores valores de I_1/I_3 (indicando maior aumento de polaridade), K_{SV} (associado à supressão mais intensa) e f_a (relativo ao maior acesso do supressor). O valor de I_E/I_M (0,999) para os lipossomas rígidos Lipo_HPC em relação aos fluidos Lipo_PC ($I_E/I_M=0,560$) mostrou a provável formação de microdomínios de moléculas de pireno na bicamada das vesículas Lipo_HPC.

Diminuições nos valores do grau de anisotropia, I₁/I₃, K_{SV} e f_a de pireno incorporado nos lipossomas Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO em relação ao Lipo_HPC, indicaram mudanças na compactação dos fosfolipídios HPC na bicamada lipídica ao serem misturados com fosfatidilcolina insaturada (PC) ou surfatante (DO). Estes componentes insaturados aumentaram a fluidez dos lipossomas Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO, em razão da miscibilidade entre os componentes da bicamada ou segregação destes diferentes constituintes em microdomínios, gerando um ambiente mais fluído para acomodar as moléculas de pireno. O surfatante DO por restrições de empacotamento das cadeias acila insaturadas e da volumosa cabeça polar, pode formar microdomínios mais fluidos dentro da bicamada rígida de HPC, o que

justifica o valor maior de I_E/I_M obtido para pireno em **Lipo_HPC/DO**. É provável que as moléculas de pireno se incorporem preferencialmente nesta região, aumentando a concentração de excímeros.

O valor de I_E/I_M obtido para Lipo_HPC/PC (0,856) foi semelhante ao obtido pela média ponderada entre Lipo_PC e Lipo_HPC (I_E/I_M calculado igual a 0,826), indicando maior miscibilidade entre os componentes, fazendo com que as moléculas de pireno nos lipossomas Lipo_HPC/PC se incorporassem em região mais apolar (menores valores de I_1/I_3 e de f_a) e com maior restrição aos movimentos rotacionais do que nos lipossomas Lipo_HPC/DO. A supressão da fluorescência foi mais gradativa para Lipo_HPC/DO que Lipo_HPC/PC, provavelmente pela dificuldade dos íons iodeto alcançarem as moléculas de pireno em virtude do efeito estérico exercido pela cabeça polar do surfatante DO. Através de microcalorimetria, observou-se maior tendência à segregação de fases nos lipossomas Lipo_HPC/DO (Figura 31) que em Lipo_HPC/PC (Figura 32).

O pireno também foi usado para verificar se as moléculas de ISOTN foram encapsuladas. A presença de ISOTN nos lipossomas com fosfatidilcolina PC ou HPC (Figura 49), aumentou a K_{SV}, f_a (Tabela 25), polaridade (Figura 52) e grau de anisotropia (Figura 54), e diminuição de I_E/I_M (Figura 53). Estes resultados indicam que as moléculas de pireno foram inseridas na bicamada em local próximo às moléculas de ISOTN. A presença do anel na estrutura do fármaco, provavelmente, dificultou o movimento lateral e rotacional das moléculas de pireno, refletindo na diminuição de I_E/I_M e aumento do grau de anisotropia. Os valores de I₁/I₃, K_{SV} e f_a nos lipossomas contendo ISOTN sugeriram que parte da molécula de pireno ficou mais acessível às moléculas de água e do supressor (por causa do aumento da fluidez da membrana ou deslocamento do pireno para regiões mais próximas da interface). Segundo Socaciu et al. (1999, 2000), bicamadas lipossomais contendo carotenóides inseridos, proporcionaram um ambiente mais polar às moléculas de pireno (verificado pelo aumento de I_1/I_3) do que lipossomas vazios. A presença de carotenóides aumentou a polaridade interior da membrana, em virtude da maior penetração de moléculas de água. Stillwell et al. (1982) demonstraram que retinol e TN incorporados em vesículas de lecitinas de ovo aumentaram a permeabilidade da membrana aos íons K^+ , I^- e glicose.

Outra indicação de que as moléculas de pireno estão próximas das moléculas ISOTN encapsuladas, foi a diminuição da intensidade de fluorescência da sonda na presença da ISOTN. O comprimento de onda de excitação do pireno corresponde ao de máxima absorbância da ISOTN (Figura 55). Desta forma existe uma competição entre as moléculas pela luz incidente de excitação, diminuindo a intensidade de fluorescência final do pireno (pois as

moléculas de ISOTN atuam como filtro interno). Comportamento similar também verificado por Socaciu *et al.* (1999) com a inclusão de pireno em lipossomas contendo carotenóides.



Figura 55: Espectros de absorção de pireno (1 µmol/L) e ISOTN (6,7 µmol/L) em metanol

Entre as suspensões **Lipo_PC**, **Lipo_PC/Col** e **Lipo_PC/PS** contendo ISOTN encapsulado, o pireno incorporado em **Lipo_PC/Col** apresentou menor valor de I_E/I_M , refletindo a maior dificuldade para formação de excímeros em presença de colesterol e ISOTN. Os valores do grau de anisotropia, I_1/I_3 , f_a e K_{SV} para **Lipo_PC/Col**, sugeriram que a molécula de pireno ficou mais exposta à água, com a inclusão de ISOTN na bicamada lipossomal.

As formulações **Lipo_PC/PS** (lipossomas vazios e os lipossomas com ISOTN encapsulada) foram as que apresentaram as menores diferenças entre si dos valores dos parâmetros (I₁/I₃, f_a, K_{SV}, I_E/I_M e anisotropia) em relação às outras formulações avaliadas. Podese sugerir que isto se deve ao maior espaçamento entre as moléculas de fosfolipídio, proporcionado pela inclusão do fosfolipídio negativo PS, desta forma as moléculas de pireno foram menos influenciadas pela presença da ISOTN do que nos outros tipos de lipossomas.

A seguir serão discutidos os resultados obtidos com as amostras Lipo_HPC/PC, Lipo_HPC/DO e Lipo_HPC contendo ISOTN encapsulada.

Conforme os resultados obtidos anteriormente, a suspensão **Lipo_HPC** forneceu uma estrutura instável, rígida para acomodar adequadamente todas as moléculas de ISOTN, sendo que uma parte deste fármaco foi encontrada em solução formando cristais. Portanto, para realizar este teste de fluorescência, a formulação **Lipo_HPC** contendo ISOTN foi utilizada logo após sua preparação para evitar vazamentos do fármaco. O valor de I_E/I_M para **Lipo_HPC** com

ISOTN (semelhante ao encontrado para pireno em tampão) indicou que o fármaco diminuiu a formação de microdomínios de pireno, talvez pelo efeito de desorganização da bicamada de fosfolipídios de HPC pela inserção do fármaco (fluidificação) ou porque parte das moléculas de pireno ficaram dissolvidas em solução. O valor do grau de anisotropia do pireno para a suspensão **Lipo_HPC** com ISOTN (0,0677), maior do que o obtido para a amostra **Lipo_HPC** vazio (0,0325), indicou que pelo menos parte das moléculas de pireno ainda está encapsulada e que estas "sentem" a presença das moléculas ISOTN. Porém, a variação da intensidade de fluorescência do pireno aumentou em relação à de outros lipossomas contendo ISOTN encapsulada, sendo menor a interferência do fármaco como filtro interno. Estes resultados indicaram que a presença de ISOTN, aliada à rigidez da bicamada, impediram a encapsulação total do pireno, ficando algumas moléculas livres em solução e, por isso, foram obtidos maiores valores de I₁/I₃, f_a, K_{SV}.

Em relação às amostras Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO, observou-se que a diferença de I_E/I_M é menor entre as suspensões Lipo_HPC/PC com e sem ISOTN (0,066) do que a variação entre as suspensões Lipo_HPC/DO com e sem ISOTN (0,504). O valor obtido para o grau de anisotropia do pireno em Lipo_HPC/PC contendo ISOTN (0,127) foi mais próximo do valor para a amostra Lipo_PC (0,114) do que o valor da suspensão Lipo_HPC/DO (0,087). Estes resultados indicam que a formulação Lipo_HPC/PC apresentou melhor mistura entre seus componentes (HPC, PC e ISOTN), com menor formação de microdomínios (segregação de fases) do que Lipo_HPC/DO. Nesta última suspensão é provável a existência de maior quantidade de microdomínios de DO, os quais por serem fluidos, servem também como sítios para fixação da ISOTN, dificultando a entrada de pireno e a formação de excímeros. Entre as suspensões contendo ISOTN encapsulada, Lipo_HPC/PC e Lipo_HPC/DO apresentaram os maiores valores de I_E/I_M e do grau de anisotropia do que Lipo_HPC, aumentou a fluidez da bicamada lipídica, fazendo com que as moléculas de pireno se incorporassem mais nestas vesículas.

Para verificar se ISOTN suprime a fluorescência do pireno quando livre em solução, foi dissolvido pireno (1 μmol/L) em tampão citrato ou em metanol e titulado com solução metanólica de ISOTN (Figuras 56a e b, respectivamente).



Figura 56: Espectros de fluorescência de pireno (1 µmol/L) na presença ou não de ISOTN (5 e 10 µmol/L) em: (a) tampão citrato 10mmol/L pH 5,6 e (b) metanol

Foram observadas poucas mudanças nas intensidades dos espectros do pireno em tampão após adição das alíquotas de solução de ISOTN (Figura 56a) e nenhuma mudança na razão I_1/I_3 . Porém, visualmente observou-se uma leve turvação referente à precipitação da ISOTN que é pouco solúvel em água. A concentração de ISOTN encapsulada dentro dos 20 µl de lipossomas (alíquota utilizada nos estudos de supressão com íons iodeto) corresponde a 6,7 µmol/L, valor este entre 5 a 10 µmol/L de ISOTN adicionada na cubeta contendo pireno.

Para provar a ação supressora da ISOTN na fluorescência do pireno, foi utilizado um solvente que dissolvesse as duas substâncias, o metanol (Figura 56b). Neste caso observou-se diminuição da intensidade da fluorescência do pireno com a adição da ISOTN. Portanto, somente quando as moléculas de ISOTN e pireno estão encapsuladas nos lipossomas ocorre interferência do fármaco na fluorescência da sonda. Além da supressão da fluorescência do pireno, houve mudança da polaridade desta sonda com a adição do fármaco. A razão I₁/I₃ do pireno diminuiu de 1,42 (sem ISOTN) para 1,05, em presença de 10 μmol/L de ISOTN, em metanol. Presumimos que ISOTN pode ter formado algum agregado hidrofóbico com moléculas de pireno.

Verificou-se que o grau de anisotropia foi um dos parâmetros que indicou mais conclusivamente a encapsulação da ISOTN. Para confirmar este fato utilizou-se outra sonda fluorescente, o TMA-DPH (cuja fórmula estrutural está no Anexo 1), a qual é excitada em maior comprimento de onda, minimizando o efeito de filtro interno da ISOTN.

TMA-DPH, análogo à sonda hidrofóbica DPH (difenilhexatrieno), tem um grupo carregado positivamente ligado ao anel aromático, propiciando que a molécula fique ancorada na interface lipídio-água da bicamada. Portanto, é um fluoróforo usado para sondar a polaridade da região mais externa da bicamada lipídica (Cranney *et al.*, 1983; New, 1990) e tem sido utilizada também para monitorar a microviscosidade de membranas (Simonetti *et al.*, 1996; Crosas *et al.*, 2006).

TMA-DPH foi adicionado ao tampão citrato ou incorporado às suspensões lipossomais na razão molar lipídios/sonda de 500:1 e em seguida foi medido o grau de anisotropia de fluorescência. Os resultados estão apresentados na Figura 57.



Figura 57: Graus de anisotropia de TMA-DPH em tampão e incorporado em lipossomas contendo ou não ISOTN

Um valor alto do grau de anisotropia representa menor grau de liberdade de rotação do fluoróforo ou menor fluidez da membrana. TMA-DPH apresentou maior grau de anisotropia quando incorporada em lipossomas do que no tampão. Como a sonda ficou ancorada na interface lipídio-tampão, o grau de anisotropia de TMA-DPH refletiu diferenças no empacotamento desta região. As moléculas de pireno são mais hidrofóbicas que TMA-DPH, monitorado melhor as diferenças de empacotamento da região das cadeias acila na bicamada lipídica.

Utilizando TMA-DPH, a suspensão Lipo_PC/Col mostrou maior grau de anisotropia em virtude da presença de colesterol nesta região do que as amostras Lipo_PC e Lipo_PC/PS. O

valor desse parâmetro na suspensão Lipo_HPC/DO foi maior que na suspensão Lipo_HPC/PC, provavelmente pela presença da cabeça polar volumosa da molécula do surfatante. A encapsulação da ISOTN foi indicada pelo aumento geral do grau de anisotropia, resultado semelhante ao obtido com a sonda pireno (Figura 54), porém a variação entre os valores de anisotropia dos lipossomas vazios e com ISOTN foi menor utilizando TMA-DPH. A molécula de ISOTN é anfifílica e seu grupo ácido provavelmente situa-se na região da cabeça polar dos fosfolipídios, indicando que o fármaco deve ter contribuído para as restrições dos movimentos rotacionais da sonda TMA-DPH.

4.6 Determinação da solução receptora para teste de permeação

Nos testes sobre permeação cutânea, realizados em um equipamento denominado célula de Franz, o fármaco adicionado na superfície de uma membrana ou pele, difunde através desta, sendo coletado no fluido receptor que simula as condições fisiológicas (normalmente utiliza-se tampão fosfato) e que serve para mimetizar, *in vitro*, a circulação sangüínea. Porém, na pele real existe um sistema de vascularização com proteínas que retira o fármaco constantemente da derme. Para manter esta condição *sink*, de não saturação do fármaco na interface entre a pele e o líquido receptor, e a parada no processo de difusão, utiliza-se agitação constante do líquido e uma solução que consiga solubilizar o fármaco. Para isto o ideal é aplicar uma concentração de fármaco na pele que represente 10% da solubilidade do fármaco em relação ao volume utilizado naquela solução receptora (Walters, 2002).

Porém, a isotretinoína é praticamente insolúvel em água (solubilidade igual a 0,8 μg/mL a 37 °C). Soro humano ou solução de albumina são indicados como líquidos receptores, mas são necessárias etapas posteriores de extração do fármaco para possibilitar a quantificação por HPLC, encarecendo a análise e aumentando a possibilidade de degradação da ISOTN. Soluções alcoólicas também são utilizadas, mas podem extrair e/ou desorganizar os lipídios intercelulares da barreira cutânea. Outra alternativa é utilizar surfatantes não-iônicos solúveis, em pequena concentração, no tampão fosfato. Contudo estas substâncias solubilizam membranas (Jones, 1999; Foldvari, 2000) e para utilizá-los na fase receptora, eles devem ao mesmo tempo ajudar a solubilizar o fármaco, mas não podem desestruturar as vesículas. Se isto acontecer, provavelmente não afetarão as propriedades de barreira da pele, já que esta é composta de bicamadas lipídicas (Walters, 2002). Cócera *et al.* (2000, 2001a, 2001b) têm avaliado a solubilização de lipossomas constituídos de lipídios do estrato córneo, os quais são solubilizados de forma semelhante aos lipossomas de fosfatidilcolina, porém com menores

tendências a serem desestruturados quando se emprega maiores concentrações de surfatantes.

Optou-se por testar vários surfatantes não-iônicos, com cadeias ramificadas, lineares, com insaturações e presença de anéis (cujas fórmulas estruturais estão no Anexo 1), para auxiliar a difusão da ISOTN.

Foi determinada a solubilidade da ISOTN nas diferentes soluções contendo surfatantes, proteína e etanol. Em seguida obtiveram-se os valores de CMC dos surfatantes e testou-se a capacidade de solubilização de lipossomas contendo calceína pelos mesmos.

4.6.1 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) de surfatantes

Surfatantes são moléculas anfifílicas que agem diminuindo a tensão interfacial, proporcionando solubilização, emulsificação e dispersão. Em solução aquosa, acima de uma estreita faixa de concentração, conhecida como concentração micelar crítica (CMC), os surfatantes podem espontaneamente se auto-associar para formar agregados moleculares termodinamicamente estáveis conhecidos como micelas. Ocorrem mudanças abruptas nas propriedades físico-químicas da solução de surfatante quando sua concentração é próxima a da CMC (Attwood e Florence, 1983; Moulik, 1996).

Experimentalmente, a CMC é determinada monitorando parâmetros como condutância, viscosidade, tensão superficial, fluorescência e espalhamento de luz, em função da concentração do surfatante (Attwood e Florence, 1983; Moulik, 1996). A CMC dos surfatantes testados foi obtida por medidas de fluorescência, utilizando o pireno como sonda da micropolaridade local. A estrutura vibrônica do espectro de fluorescência do monômero de pireno é sensível à polaridade do ambiente ao seu redor (Kalyanasundaram e Thomas, 1977; Ananthapadmanabhan, 1985). Monitorou-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos picos 1 e 3 (I₁/I₃) do espectro do pireno em função da concentração do surfatante (Aguiar *et al.*, 2003). A curva sigmoidal obtida (Figura 58) foi ajustada com a função de Boltzmann, que forneceu o valor central da sigmóide (x_o), correspondendo ao valor médio da CMC. As curvas obtidas para os surfatantes estão apresentadas na Figura 59.

Para elucidação, somente os espectros de fluorescência do pireno em solução contendo o surfatante Volpo 20 (Brij 98) foram mostrados, Figura 60.

Determinou-se a CMC dos surfatantes porque alguns não apresentavam indicações da CMC na literatura e, além disso, a possibilidade de solubilização do fármaco hidrofóbico como a ISOTN, dar-se-á quando houver micelas no meio, isto é, a concentração do surfatante estiver acima da CMC.


Figura 58: Razão entre as intensidades de fluorescência dos picos 1 e 3 (I_1/I_3) do pireno (1 μ mol/L) em função do logaritmo natural da concentração de Volpo 20 (Brij 98) e ajuste da curva sigmoidal tipo Boltzmann



Figura 59: Razão entre as intensidades de fluorescência dos picos 1 e 3 (I_1/I_3) do pireno (1 μ mol/L) em função do logaritmo natural da concentração de vários surfatantes (mol/L)

Segundo Kalyanasundaram e Thomas (1977), a diminuição do valor de I_1/I_3 é um indicativo da solubilização da sonda em ambiente mais hidrofóbico (neste caso as micelas do surfatante). A micelização para surfatantes não-iônicos é mais gradual porque moléculas de

pireno podem se associar com as do surfatante formando agregados pré-micelares. Com aumento da concentração do surfatante, a razão I_1/I_3 diminui rapidamente indicando a conversão dos monômeros (ou pré-agregados) em micelas (Ananthapadmanabhan *et al.*, 1985; Mathias, 2001). Acima da CMC, o valor de I_1/I_3 tende a ser constante por causa da total incorporação da sonda dentro da região hidrofóbica das micelas. Por causa da formação dos agregados pré-micelares, o valor da CMC pode ser indicado como o centro da sigmóide ou o intervalo da concentração referente ao início e fim da CMC. Agregados pré-micelares também foram estudados por Ananthapadmanabhan *et al.* (1985), Mathias (2001) e Aguiar *et al.* (2003).



comprimento de onda (nm)

Figura 60: Espectros de fluorescência de pireno (1 μ mol/L) em função da concentração de surfatante Volpo 20

A Figura 60 corresponde aos espectros de fluorescência de pireno em função da concentração do surfatante Volpo 20. Foi observado que aumentando a concentração de surfatante não apenas a razão I_1/I_3 diminuiu, como também, ocorreram mudanças nas intensidades dos espectros e surgimento da banda do excímero. A diminuição máxima da intensidade de fluorescência do monômero concomitantemente com o aumento da intensidade da banda do excímero, situou-se na região central da curva sigmoidal. Até antes de atingir a CMC, as moléculas de pireno formaram agregados com as moléculas de pireno ficassem

• 、

1 114

suficientemente próximas para formar excímeros. Após a CMC, as moléculas de pireno situaram-se no interior da micela, porém com o aumento da concentração de surfatante, maior foi o número de micelas geradas, e assim, menor a intensidade da banda do excímero e maior a banda do monômero (moléculas de pireno foram diluídas entre as micelas geradas). Este comportamento foi observado com todos os outros surfatantes.

Valores de CMC obtidos experimentalmente e outros encontrados na literatura estão apresentados na Tabela 26.

Γ					0	CMC								
dife	rente	es si	urfatantes	S										
Гab	ela	26 :	Valores	de	CMC	experimer	ntal	(técnica	de	fluorescência)	е	da	literatura	para

.

00 \ / |

~~~~

| soluções de<br>surfatante | CMC<br>experimental<br>(mol/L) | CMC da literatura<br>(mol/L)                                                                                                                           |  |  |  |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| Renex 100                 | 1,07±0,03 x10 <sup>-4</sup>    | 8,3 x10 <sup>-5</sup> (Balcan e Anghel, 2005)<br>7,5 x10 <sup>-5</sup> (Galembeck <i>et al</i> ., 1998)                                                |  |  |  |
| Renex 400                 | 2,2±0,2 x10 <sup>-4</sup>      | 3 x10 <sup>-4</sup> (Chen <i>et al.</i> , 1997)                                                                                                        |  |  |  |
| Renex 1000                | 3,9±0,2 x10 <sup>-4</sup>      | 7,5x10 <sup>-4</sup> (Galembeck <i>et al</i> ., 1998)                                                                                                  |  |  |  |
| Cremophor RH40            | 1,82±0,06 x10 <sup>-5</sup>    | (*)                                                                                                                                                    |  |  |  |
| Triton X100               | 2,11±0,05x10 <sup>-4</sup>     | 2,4x10 <sup>-4</sup> (Memoli <i>et al.</i> ,1999)<br>2,4x10 <sup>-4</sup> (Hait e Moulik, 2001)<br>3x10 <sup>-4</sup> (Priev <i>et al.</i> ,2002)      |  |  |  |
| Tween 80                  | 3,4±0,1x10 <sup>-5</sup>       | 1,0x10 <sup>-5</sup> (Hait e Moulik, 2001)<br>2,8x10 <sup>-5</sup> (Patist <i>et al</i> ., 2000)                                                       |  |  |  |
| Tween 327                 | 8,8±0,3 x10 <sup>-5</sup>      | 8,4x10 <sup>-5</sup> (Patist <i>et al</i> ., 2000)                                                                                                     |  |  |  |
| Brij 700                  | 5,1±0,2x10 <sup>-5</sup>       | 2,0x10 <sup>-5</sup> (Hait e Moulik, 2001)                                                                                                             |  |  |  |
| Brij 78                   | 2,6±0,1x10 <sup>-5</sup>       | 5,7x10 <sup>-6</sup> (Hait e Moulik, 2001)<br>4,6x10 <sup>-5</sup> (Klammt <i>et al.</i> , 2005)<br>7,1x10 <sup>-6</sup> (Patist <i>et al</i> ., 2000) |  |  |  |
| Volpo 20 (Brij 98)        | 2,89±0,06x10 <sup>-5</sup>     | 2,5x10⁻⁵ (Klammt <i>et al.</i> , 2005)                                                                                                                 |  |  |  |

<sup>(\*)</sup> Análogos do Cremophor RH 40: o Cremophor EL (com 35 unidades de óxido de etileno e não hidrogenado) tem CMC de 3,2x10<sup>-5</sup> mol/L (Nerurkar *et al.*, 1996).

Normalmente, álcoois graxos etoxilados ou "peglado" (denominados Brij) apresentam maior facilidade de empacotamento das moléculas do que surfatantes contendo anéis (como os surfatantes Renex) e/ou ramificações (como os surfatantes nomeados Tween). A CMC é influenciada pelo tamanho da cabeça polar e da parte hidrofóbica (Attwood e Florence, 1983).

Na Tabela 26, pode-se observar que a CMC foi maior para Renex 1000 do que Renex 100, refletindo diferenças no empacotamento devido ao tamanho da cabeça polar. De la Maza e Parra (1996) verificaram que quanto maior o conteúdo de óxido de etileno (cabeça polar) no Renex, maior foi a CMC. O mesmo aconteceu com o álcool "Peglado" Brij 700 em relação ao Brij 98 (Volpo 20) e Brij 78. O surfatante Brij 98 por ser formado por cadeia hidrofóbica insaturada (oleil – C18:1) apresentou tendência de maior valor da CMC do que o Brij 78, o qual tem cadeia saturada (estearoil – C18).

O surfatante Tween 80 por ser constituído de cadeia hidrofóbica oleil e 20 unidades de óxido de etileno apresentou menor valor de CMC que o outro surfatante Tween 327, que é mais hidrofílico (cadeia hidrofóbica lauril - C12, e 80 unidades de óxido de etileno).

Triton X100 apesar de conter semelhante número de unidades de óxido de etileno que Renex 100 (9,5 e 10, respectivamente), apresentou maior CMC devido à presença de cadeia carbônica ramificada, a qual dificultou a interação entre os surfatantes fazendo com que a micelização ocorresse em maior concentração.

Como Cremophor RH40, é um derivado hidrogenado do óleo de mamona (rícino), podem existir outras espécies com cadeias menos ramificadas e/ou lineares misturadas com a estrutura ramificada principal (pelo menos 85 a 95%, Anexo 1), as quais podem ter afetado o valor da CMC (diminuído a CMC).

Variações entre os valores de CMC obtidos neste trabalho e os da literatura (Tabela 26) provavelmente se devem ao uso de diferentes técnicas (sensibilidade) para determinação da CMC (Ananthapadmanabhan, 1985). Estas variações também são esperadas em virtude das condições experimentais serem normalmente diferentes (na literatura os surfatantes utilizados apresentam maior pureza (Sigma), CMC normalmente foi determinada a 25°C e em água). A técnica de cálculo da CMC (determinação da derivada, ajuste por curva sigmoidal ou indicação da faixa da CMC) pode influenciar no resultado final desta concentração micelar. Em virtude destas considerações, pode-se dizer que os valores de CMC obtidos, para maioria dos surfatantes estudados, foram semelhantes aos valores da literatura.

Devido às dificuldades de obtenção dos valores de CMC na literatura do surfatante Cremophor RH40, foi anexado o valor de CMC de surfatante com estrutura semelhante (Tabela 26). Cremophor EL apesar de ter unidades de óxido de etileno (35) parecidas com o Cremophor RH40 (40), apresenta na estrutura duplas ligações (cadeia oleil), as quais dificultam o empacotamento das moléculas e, portanto, Cremophor EL possui maior valor de CMC que o obtido para Cremophor RH40.

#### 4.6.2 Solubilidade da ISOTN em diferentes meios receptores

Para os testes de permeação, as fases receptoras constituídas de soluções de surfatante normalmente são preparadas considerando a porcentagem em massa do surfatante no tampão % (m/v). Concentrações de surfatantes de 0,5; 1,5 e 6% (m/v) são bastante utilizadas neste tipo de experimento (Bronaugh e Stewart, 1984; Walters, 2002); todavia, concentrações elevadas de surfatante causam a formação de muitas bolhas na fase receptora da célula de Franz, prejudicando o teste. Desta forma, previamente à realização dos testes, foi necessário determinar a solubilidade da ISOTN em soluções contendo a menor concentração de surfatante (0,5% (m/v)), as quais também devem ser utilizadas para avaliar a capacidade de solubilização dos lipossomas. Também foram analisadas soluções receptoras contendo albumina humana 3% (m/v) e etanol 50% (v/v).

Para comparar a solubilidade da ISOTN nas soluções com surfatante levou-se em consideração a massa molar média dos surfatantes. Esta é uma aproximação porque surfatantes etoxilados apresentam uma distribuição de massas molares por causa das diferentes unidades de óxido de etileno presentes. Porém, a massa molar média, normalmente, representa bem o máximo da curva de distribuição de massas.

Os surfatantes utilizados apresentam massa molares médias entre 646 g/mol (Triton X100) e 4670 g/mol (Brij 700). Foram preparadas soluções contendo concentrações iguais a 0,5; 1,5 e 3,0% (m/v), correspondendo respectivamente a 1,07; 3,21 e 6,42 mmol/L, considerando o surfatante com maior massa molar média, que é o Brij 700. Estas concentrações foram utilizadas para preparar as soluções dos outros surfatantes, para posterior comparação.

Na Tabela 27 encontram-se os valores de solubilidade da ISOTN nas diferentes soluções. Concentrações maiores de Renex 1000 também foram avaliadas a fim de aumentar a solubilidade da ISOTN.

**Tabela 27**: Valores de solubilidade de ISOTN em soluções de surfatante (1,07 mmol/L), albumina humana e etanol, determinados por HPLC

| soluções                   | solubilidade da<br>ISOTN (mg/mL) |
|----------------------------|----------------------------------|
| Tampão fosfato-salina      | 0,0008±0,0001                    |
| Renex 100                  | 0,019±0,001                      |
| Renex 400                  | 0,017±0,001                      |
| Renex 1000 0,5% (m/v)      | 0,012±0,001                      |
| Renex 1000 1,5% (m/v) (*)  | 0,055±0,002                      |
| Renex 1000 3,0% (m/v) (**) | 0,130±0,003                      |
| Cremophor RH40             | 0,046±0,002                      |
| Triton X100                | 0,019±0,001                      |
| Tween 80                   | 0,023±0,001                      |
| Tween 327                  | 0,015±0,001                      |
| Brij 700                   | 0,033±0,002                      |
| Brij 78                    | 0,041±0,001                      |
| Volpo 20 (Brij 98)         | 0,042 ±0,001                     |
| Etanol:água 25% (v/v)      | 0,074±0,001                      |
| HSA 3% (m/v)               | 0,071±0,002                      |

(\*) e (\*\*) correspondem às concentrações de 3,21 e 6,42 mmol/L de Renex 1000, respectivamente.

Considerando a mesma concentração molar (1,07 mmol/L), a solubilidade da ISOTN foi maior nas soluções contendo surfatantes da série Brij (álcoois etoxilados) que naquelas com Renex, Triton e Tween (cujas moléculas contêm anéis), provavelmente devido aos menores valores de CMC dos Brij's e, portanto, ao maior número de micelas presentes no meio e que possibilitaram maior solubilização do fármaco. Soluções contendo Renex 1000 e Brij 700, cujas moléculas apresentam maior cabeça polar (100 unidades de oxido de etileno), solubilizaram menos a ISOTN em relação às demais. Comportamento semelhante foi obtido com os surfatantes da série Tween e entre os surfatantes testados, o Cremophor foi o que apresentou o menor valor de CMC e, em conseqüência, a maior solubilização da ISOTN.

Como, no organismo humano, 99% da ISOTN é carreada pela albumina (Seghal *et al.*, 2006) e sabendo que a solubilidade de ISOTN em etanol é razoável (9 mg/mL), pode-se inferir que a solubilidade da ISOTN seria maior em soluções contendo estas substâncias. Apesar dos resultados confirmarem maior solubilização da ISOTN em solução contendo HSA e em etanol, a solução com esta proteína não foi usada, por serem necessárias outras etapas para separar o

fármaco complexado com HSA. Por outro lado, a solução contendo 50% de etanol também não foi empregada porque esta substância, além de ser irritante para a pele, pode afetar as propriedades de barreira da epiderme e alterar a permeação.

### 4.6.3 Determinação da capacidade de solubilização de lipossomas por surfatantes

O uso mais comum de surfatantes em estudos de biomembranas baseia-se na sua habilidade de solubilizar membranas (Lichtenberg et al., 2000). Vários estudos foram realizados para verificar Interações de surfatantes com lipossomas produzidos com fosfatidilcolina ou com lipídios de estrato córneo (Lasch, 1995; Cócera *et al.*, 2000, 2001a,b; de la Maza e Parra; 1997; Silvander *et al.* 2003). Normalmente, estas interações levam à ruptura da estrutura lipossomal e solubilização dos componentes, formando micelas mistas (entre moléculas de surfatantes e lipídios). Ambos os fosfolipídios e os surfatantes são anfifílicos e, consequentemente, tendem a se auto-agregarem em solução aquosa, sendo que a estrutura destes agregados (micelar ou lamelar) depende da concentração/estrutura dos dois componentes em solução (Lichtenberg *et al.*, 2000).

Lichtenberg (1985) postulou que a razão molar surfatante/lipídio necessária à solubilização dos lipossomas depende da CMC do surfatante e do coeficiente de distribuição do surfatante entre as bicamadas lipossomais e a água. A micelização e interação hidrofóbica são os principais responsáveis pelo processo de solubilização.

O fenômeno associado à adição dos surfatantes à dispersão lipossomal foi descrito como um modelo de três estágios. No estágio inicial, quando a concentração de surfatante é pequena (<< CMC), os monômeros são incorporados dentro das bicamadas de acordo com o equilíbrio de partição entre as fases aquosas e lipídica. A estrutura lipossomal é mantida. Conforme aumenta a concentração de surfatante, aumenta a quantidade de monômeros de surfatante na fase aquosa e na fase lipossomal até que os lipossomas estejam saturados. Neste ponto as micelas de surfatante se formam (CMC) e pode-se obter a concentração de surfatante e a razão molar surfatante/lipídio na saturação (*onset* da lise). Deste modo, quando a concentração de surfatante excede o valor de saturação, os fosfolipídios são gradualmente solubilizados dentro das micelas (formando micelas mistas) que coexistem com vesículas saturadas contendo surfatantes. Finalmente, em maiores concentrações de surfatante, ocorre a solubilização completa das vesículas e apenas micelas mistas estão presentes na solução (obtendo-se a concentração de surfatante e razão molar surfatante/lipídio de solubilização total da membrana; lise total). Os agregados coexistem com os monômeros dos surfatantes (Lichtenberg *et al.*, 1983; Memoli *et al.* 1999).

Nestes experimentos de interação, normalmente variaram-se as concentrações de surfatantes e lipossomas (construção de diagramas de fase), determinando as concentrações de surfatante e razões surfatante/lipídios de saturação e de completa solubilização das vesículas, além da constante de ligação molar. Diferenças observadas no comportamento relativo à solubilização de lipossomas por surfatantes estão relacionadas à composição da membrana, concentração lipídica, empacotamento da bicamada lipídica, tamanho das vesículas, estrutura molecular e concentração dos surfatantes, e composição do meio aquoso e da temperatura (Memoli *et al.*, 1999; Lichtenberg *et al.*, 2000).

Várias técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas para investigar interações entre membranas e surfatantes (Goni e Alonso, 2000). Para verificar a capacidade de solubilização dos lipossomas (modelos de biomembranas) pelos surfatantes aqui estudados, foi empregada a técnica de fluorescência, monitorando temporalmente a emissão de luz da calceína encapsulada em lipossomas dispersos nas soluções de surfatantes. A suspensão lipossomal utilizada foi constituída por fosfatidilcolina insaturada PC (Lipo\_PC). Segundo Memoli *et al.* (1999) e Ahyayauch *et al.* (2006) para solubilizar lipossomas contendo fosfolipídios insaturados foi necessário maior razão molar surfatante/lipídio do que lipossomas com fosfolipídios saturados, devido à maior fluidez das membranas.

A calceína inserida no cerne aquoso dos lipossomas apresenta auto-supressão da sua fluorescência por efeito de concentração (New, 1990). Durante o período de saturação e no início da solubilização, as moléculas de surfatante se inserem na bicamada fosfolipídica induzindo a formação de poros transientes na mesma, através dos quais a calceína é liberada. Em concentrações maiores de surfatante, a permeabilidade da membrana lipídica é total, havendo completa liberação da sonda, anteriormente encapsulada no cerne aquoso das vesículas, com a formação das micelas mistas (Memoli *et al.*, 1999).

A suspensão lipossomal contendo calceína, após extrusão em membranas (poros com diâmetro de 100nm) e separação da maior parte da calceína não encapsulada, foi adicionada a soluções com diferentes surfatantes (1,07 mmol/L). A intensidade de fluorescência da calceína foi registrada em função do tempo (18 h ou 1080 min) e a liberação completa foi confirmada, após este período, mediante a adição de solução de 10% (m/v) de Triton X100 em cada uma das suspensões. A capacidade de solubilização de lipossomas por este surfatante também foi avaliada, por ser o surfatante mais utilizado para lise de lipossomas, portanto, servindo como padrão (New, 1990). Os valores da porcentagem de calceína liberada estão mostrados na Tabela 28 e a Figura 61 mostra o perfil temporal de liberação da calceína lipossomal nas diferentes soluções.



**Figura 61:** Liberação de calceína encapsulada em lipossomas **Lipo\_PC** de 165 nm em diferentes soluções de surfatante (1,07 mmol/L) durante 18 h

**Tabela 28:** Porcentagem de calceína liberada de lipossomas **Lipo\_PC** (165 e 333 nm) em diferentes soluções de surfatante (1,07 mmol/L) após 18 h

| soluções              | calceína liberada (%) | calceína liberada (%) |  |  |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|
| Soluções              | lipossomas de 165 nm  | lipossomas de 333 nm  |  |  |
| Tampão fosfato-salina | 20,4                  | 14,0                  |  |  |
| Renex 100             | 99,4                  |                       |  |  |
| Renex 400             | 99,9                  |                       |  |  |
| Renex 1000 0,5%       | 17,1                  | 11,5                  |  |  |
| Renex 1000 1,5% (*)   |                       | 8,8                   |  |  |
| Renex 1000 3,0% (**)  |                       | 5,0                   |  |  |
| Cremophor RH40        | 99,5                  |                       |  |  |
| Triton X100           | 100,0                 |                       |  |  |
| Tween 80              | 99,8                  |                       |  |  |
| Tween 327             | 96,7                  |                       |  |  |
| Brij 700              | 91,5                  |                       |  |  |
| Brij 78               | 99,9                  | 60,2                  |  |  |
| Volpo 20 (Brij 98)    | 100,0                 | 98,7                  |  |  |

(\*) e (\*\*) correspondem às concentrações de 3,21 e 6,42 mmol/L de Renex 1000, respectivamente.

As vesículas contendo calceína tem diâmetro médio e polidispersidade iguais a 165 $\pm$ 7 nm e 0,14 $\pm$ 0,01, respectivamente, e a concentração da sonda encapsulada foi ~1,8 µmol/L.

A calceína lipossomal em tampão fosfato-salina foi liberada durante às 18 h do teste, indicando que as bicamadas dos lipossomas produzidos com fosfatidilcolina PC são permeáveis à sonda. Em presença de surfatante (1,07 mmol/L), ocorreu desestruturação dos lipossomas, formação de micelas mistas e liberação da calceína. Com exceção do surfatante Renex 1000, todos os demais causaram liberação quase completa da calceína.

Estudos feitos por López et al. (1998) e Memoli et al. (1999) indicaram que, dependendo da estrutura e afinidade dos surfatantes por membranas, é necessário maior ou menor concentração para solubilização completa dos lipossomas, sendo que esta se inicia quando a concentração do surfatante é próxima à da CMC. Para saber qual é a concentração de solubilização de cada surfatante seria necessário realizar um experimento variando a concentração do surfatante abaixo e acima da CMC (construir um digrama de fases para descrever o sistema surfatante/fosfolipídio); (Lichtenberg et al., 2000). Em nosso estudo, diferente dos outros acima citados, a composição e a concentração dos lipossomas, como também, a concentração das soluções dos surfatantes, foram mantidas constantes. A concentração dos surfatantes foi fixada em 1,07 mmol/L por ser a concentração usada nos testes de solubilidade da ISOTN. Apesar desta concentração dos surfatantes estar bem acima dos valores da CMC's, dependendo do surfatante (como Renex 1000), ela não foi suficiente para solubilização completa das vesículas. Normalmente na presença de lipossomas, as moléculas de surfatante são consumidas pelos lipossomas no processo de desintegração da bicamada fazendo com que o valor da CMC seja maior do que o obtido considerando apenas o surfatante em água (Deo et al., 2005; Lichtenberg et al., 2000).

Não foi possível obter a concentração de solubilização para cada surfatante, por não se ter um diagrama do sistema surfatante/fosfolipídio. Apesar disto, os resultados obtidos foram relevantes, pois os surfatantes na concentração fixa (1,07 mmol/L), Tabela 28, estavam sendo avaliados e comparados para escolha da fase receptora mais apropriada para os testes de permeação cutânea. Os resultados puderam mostrar as diferentes tendências da capacidade dos surfatantes atuarem como agentes para solubilização das vesículas lipossomais na concentração fixa.

Através da Figura 61, a série Renex mostrou que quanto maior a cabeça polar do surfatante, menor a liberação da calceína com o tempo e, consequentemente, menor a interação com os lipossomas. Esta mesma tendência foi observada com os surfatantes da série

Brij. Tween 327 é mais hidrofílico que Tween 80 e, portanto, interagiu menos intensamente com os lipossomas. Considerando uma série de surfatantes cujas cadeias são homólogas, a intensidade de interação está relacionada à CMC e geralmente quanto maior o número de unidades de óxido de etileno na molécula do surfatante (maior será sua CMC), menor será sua afinidade pela membrana (Partearroyo *et al.*, 1996; de la Maza *et al.*, 1998). Cócera *et al.* (2001) e Memoli *et al.* (1999) analisaram que o aumento do comprimento da cadeia hidrofóbica do surfatante reduz drasticamente a CMC, a qual pode ser usada como um critério para atividade de superfície: quanto menor a CMC, maior é atividade na superfície. Para Lichtenberg *et al.* (1983) quanto menor a CMC, menor será a concentração do surfatante para iniciar a saturação e solubilização dos lipossomas. Renex 1000 apresentou maior CMC que Renex 400 e Renex 100, fornecendo indicações de menor interação com as bicamadas lipídicas que os outros dois surfatantes (Tabela 28).

Experimentos de hemólise (Galembeck *et al.*,1998; Preté *et al.*, 2002) têm mostrado que o efeito de surfatantes na estabilidade de membranas de eritrócitos tendem a ser bifásicos: em pequena razão molar fármaco/lipídio estes compostos protegem os eritrócitos contra a lise hipotônica, enquanto que em maiores razões molares na membrana, eles induzem a hemólise. Solubilização envolve interações hidrofóbicas entre as cadeias de surfatante e o lipídios (ou proteínas) da membrana. Quanto maior a habilidade do surfatante em ligar a membrana, maior será seu poder lítico.

Renex 1000 foi o surfatante que apresentou menor interação com os lipossomas extrudados de 165 nm, pois após a adição de Renex 1000 na suspensão lipossomal, foram liberados 17% da calceína encapsulada nas vesículas, valor este próximo do obtido (20%) com a suspensão lipossomal somente na presença de tampão (Tabela 28). O efeito protetor do Renex 1000 foi devido à menor extensão de penetração das cadeias apolares da molécula deste surfatante na membrana por causa da presença das longas cadeias de polioxietileno fortemente hidratadas. A concentração de Renex 1000 necessária para causar a solubilização total dos lipossomas de 165 nm deve estar acima de 1,07mmol/L.

Galembeck *et al.* (1998) verificaram que solução contendo Renex 1000 em concentrações até 20 mmol/L protege eritrócitos contra a hemólise hipotônica, enquanto que a solução com Renex 95 (9,5 unidades de óxido de etileno) foi hemolítica em concentrações acima da CMC. Silvander *et al.* (2003) mostraram que a liberação de carboxifluoresceína encapsulada no cerne aquoso dos lipossomas foi minimizada pela presença de fosfolipídios ligados a polioxietileno e Brij 700 (surfatante com 100 unidades de óxido de etileno).

Nos testes sobre permeação cutânea, foram utilizados géis contendo lipossomas extrudados em membranas de 400 nm, em virtude deste fato, foi preparada outra suspensão lipossomal contendo calceína e extrudada nesta mesma porosidade de membrana. Além do monitoramento da liberação da calceína por 18 h (Figura 62), foi avaliado o tamanho das vesículas por espectroscopia de correlação de fótons, após 18 h (Tabela 29). A porcentagem de calceína liberada após 18 h utilizando estes lipossomas está mostrada na Tabela 28.



**Figura 62:** Liberação de calceína encapsulada em lipossomas **Lipo\_PC** (diâmetro médio: 333 nm) em diferentes soluções de surfatante (1,07 mmol/L) e em soluções contendo 3,21 e 6,42 mmol/L de Renex 1000

Lipossomas (contendo calceína em concentração ~1,0  $\mu$ mol/L), extrudados em membranas com poros de 400 nm, apresentaram diâmetro médio igual a 333±9 nm, com polidispersidade de 0,15±0,01. A porcentagem de calceína encapsulada em lipossomas com diâmetro igual a 333 nm foi menor que em lipossomas com 165 nm de diâmetro, talvez pela maior quantidade de lamelas lipídicas, o que reduz o volume do cerne aquoso. Os lipossomas extrudados em membranas de 400 nm apresentaram por microscopia eletrônica de transmissão a presença de mais de uma lamela (Figura 37).

Como a solubilidade da ISOTN na solução de 1,07 mmol/L de Renex 1000 (0,012 mg/mL de ISOTN) esteve abaixo da concentração indicada para a condição *sink* do teste de permeação (0,10 mg/mL de ISOTN), foram testadas outras soluções mais concentradas de Renex 1000 que proporcionaram maiores solubilidades do fármaco. Estas soluções foram avaliadas em relação à liberação da calceína de lipossomas extrudados em membranas de 400 nm (Tabela 28, Figura 62) e a variação de tamanho das vesículas (Tabela 29).

O surfatante Renex 1000 foi o que apresentou menor liberação da calceína (11,5%), Tabela 28. Resultado também obtido nos testes com lipossomas de 165 nm. Soluções mais concentradas deste surfatante reduziram ou estabilizaram a liberação da sonda encapsulada. O surfatante Brij 78 solubilizou rapidamente os lipossomas, confirmando seu poder de solubilização dos lipossomas observado na Figura 61.

Com a solução contendo Brij 700, a liberação da calceína de lipossomas maiores (diâmetro de 333 nm) foi mais lenta que com os menores (diâmetro de 165 nm). Microscopia TEM de lipossomas extrudados em membrana com poros de 400 nm (Figura 37) mostraram mais de uma lamela. Segundo Lichtenberg *et al.* (2000), após adição de surfatante em solução contendo vesículas multilamelares, ocorre partição das moléculas de surfatante entre aos fosfolipídios da bicamada mais externa e a solução. Se a razão surfatante/lipídio nesta bicamada exceder um valor crítico, há formação de micelas mistas, expondo a próxima bicamada ao surfatante. Dependendo da concentração do surfatante, podem existir vários tipos de agregados. O equilíbrio entre lipossomas MLV e moléculas de surfatante deve ser mais lento, produzindo vesículas com diferentes números de lamelas e tamanhos. Para Memoli *et al.* (1999), lipossomas maiores apresentam menor raio de curvatura e, portanto, menor área por fosfolipídio, dificultando a interação com os surfatantes e a conseqüente liberação de calceína.

Após 18 h, lipossomas com diâmetro de 333 nm que foram mantidos em contato com as soluções de surfatante foram avaliados em função do diâmetro médio e polidispersidade (espectroscopia de correlação de fótons), Tabela 29.

| soluções             | diâmetro<br>médio (nm) | polidispersidade |
|----------------------|------------------------|------------------|
| Tampão               | 333±9                  | 0,15±0,01        |
| Renex 1000 0,5%      | 347±8                  | 0,17±0,01        |
| Renex 1000 1,5% (*)  | 383±10                 | 0,16±0,02        |
| Renex 1000 3,0% (**) | 410±15                 | 0,18±0,02        |
| Triton X100          | 55±2                   | 0,29±0,03        |
| Brij 700             | 251±19                 | 0,23±0,03        |
| Brij 78              | 148±15                 | 0,31±0,02        |

Tabela 29: Diâmetro médio e podispersidade das soluções de calceína lipossomal (Lipo\_PC;333 nm) contendo surfatante (1,07 mmol/L) após 18 h

(\*) e (\*\*) correspondem às concentrações de 3,21 e 6,42 mmol/L de Renex 1000, respectivamente.

A transformação de lipossomas em micelas mistas, geralmente, envolve um crescimento inicial das vesículas com a inserção de moléculas de surfatante até que ocorra saturação das bicamadas, seguido de formação de agregados complexos de surfatante-lipídio, os quais apresentam diâmetros menores, indicando a ruptura de parte dos lipossomas. Em concentrações maiores de surfatantes há completa solubilização das vesículas, aparecendo micelas mistas com diâmetro bem menor do que o dos lipossomas (Cócera *et al.*, 2000; Deo *et al.*, 2005).

O aumento da concentração de Renex 1000 ocasionou aumento do diâmetro médio das vesículas. A inserção de algumas moléculas do surfatante na bicamada e a presença da longa cabeça polar hidratada das moléculas de Renex 1000 nos lipossomas fez aumentar o tamanho das vesículas (aumento do raio hidrodinâmico). A não liberação de calceína (Figura 62) e o aumento do tamanho dos lipossomas (Tabela 29) com o aumento da concentração de Renex 1000, indicaram que a concentração deste surfatante responsável pela solubilização dos lipossomas é maior que 6,42 mmol/L (3% (m/v)).

Surfatantes, como Triton X100 e Brij 78, que liberaram totalmente a calceína durante a incubação com os lipossomas de 333 nm (Figura 62), causaram diminuição do tamanho dos lipossomas e aumento da polidispersidade (Tabela 29), indicando desestruturação dos lipossomas. Provavelmente formaram-se micelas mistas muito pequenas, não detectadas por causa da sensibilidade do equipamento de medida. Como pode ser visto na Figura 62, houve liberação parcial de calceína na solução contendo Brij 700, provavelmente são necessárias concentrações maiores deste surfatante para maior solubilização dos lipossomas de 333 nm. As moléculas de Brij 700 interagem com lipossomas porque medidas da intensidade de luz espalhada sugerem a coexistência de vários tipos de agregados pela tendência de diminuição de tamanho e aumento da polidispersidade.

Lipossomas não foram desestabilizados por solução 3% (m/v) de Renex 1000, o que permitiu concluir que este surfatante, nesta concentração, provavelmente não irá desestruturar os lipídios intercelulares da barreira cutânea. Em vista deste fato, esta solução foi escolhida como solução receptora para os ensaios de permeação, descritos a seguir.

#### 4.7 Ensaios sobre permeação cutânea

A eficácia de produtos para tratamento da pele é medida por testes clínicos, que são dispendiosos e demorados. Em virtude disto, durante o desenvolvimento de produtos (cosméticos e medicamentos) para aplicação tópica é usual trocar alguns destes testes por outros a serem realizados em laboratório. Para que um determinado ingrediente ativo em um

produto para aplicação tópica seja eficaz, quantidades suficientes do mesmo devem alcançar o sítio de ação desejado, no interior da pele. Deste modo são necessários estudos sobre a permeação e quantificação do ativo na várias camadas da pele para selecionar os ingredientes e comparar formulações. O estudo sobre permeação serve para identificar a extensão na qual o ativo conseguiu penetrar na pele, ou seja, em que ponto no interior desta a penetração foi bloqueada. A velocidade e extensão da absorção dentro e através da pele determinam a dose efetiva de ativos/toxinas que operam nos tecidos da pele ou na circulação sistêmica (Zatz, 1993).

O objetivo da terapia local (tópica), ao lado do conforto ao paciente (pois não se trata de uma rota invasiva, como a intravenosa, intramuscular e subcutânea, e nem causa desconforto gastrointestinal, por exemplo) é produzir níveis adequados de fármaco no tecido, simultaneamente produzindo pequenas concentrações sanguíneas, ou seja que o fármaco não seja distribuído pelo menos em fração significativa sistemicamente no organismo. O transporte de fármacos aplicados topicamente pela corrente sanguínea não é desejável pela possibilidade do aparecimento de efeitos adversos e porque sua remoção rápida do local em que foi aplicado, limita sua concentração em níveis não terapêuticos, no tecido (Zatz, 1993).

Existem indicações na literatura que sistemas lipossomais podem controlar a liberação de ativos na pele (Schreier e Bouwstra, 1994; Touitou *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997). Para avaliar a liberação da ISOTN lipossomal na pele foram realizados estudos sobre permeação utilizando células de difusão de Franz e os resultados comparados com aqueles obtidos da permeação de ISOTN em formulação alcoólica convencional. A pele da orelha de porco foi escolhida porque apresenta características semelhantes a pele humana em relação à estrutura e permeação de solutos (Fang *et al.*, 1995; Andega *et al.*, 2001; Marro *et al.*, 2001).

As suspensões lipossomais e solução etanólica de ISOTN foram incorporadas em géis de hidroxipropilcelulose para depois serem aplicadas na pele. Foram obtidas concentrações finais de 0,025% (m/m) do fármaco nos géis lipossomais e de 0,025 e 0,050% (m/m) de ISOTN nos géis alcoólicos.

Inicialmente realizamos testes de permeação com gel alcoólico contendo 0,025% (m/m) de ISOTN, utilizando pele de porco cortada com dermátomo (espessura: ~0,8 mm), pele inteira (espessura: 1 mm) e estrato córneo + epiderme viável (espessura: ~0,12mm), analisando o fármaco na fase receptora 24 h após a permeação. Somente foi possível quantificar a ISOTN na solução receptora utilizando a membrana "estrato córneo + epiderme viável". Em virtude da pouca solubilidade da ISOTN em água, a derme espessa dificultou a passagem do fármaco (em testes *in vitro*, a derme não possui circulação sanguínea que retira fármacos que alcançam esta

região). Normalmente, os testes de permeação com pele inteira (intacta) realizados com retinóides utilizam o fármaco com marcação radioativa (Walters, 2002), tornando a metodologia de quantificação do fármaco mais sensível que a metodologia por nós utilizada (baseada em HPLC com detector de UV/VIS). Assim, optou-se pelo uso da membrana "estrato córneo + epiderme viável".

Os parâmetros de permeação foram calculados a partir do gráfico de quantidade acumulada de ISOTN permeada através da pele de porco em função do tempo, durante 24 h (Figura 63): fluxo (inclinação da parte linear do perfil de permeação) e *lag time* (pelo intercepto da parte linear no eixo x), cujos valores estão nas Figuras 64a e 64b, respectivamente. Após 24 h de permeação, foi determinada a quantidade de ISOTN que permaneceu na pele (Figura 65b), a qual foi comparada com a de ISOTN permeada através da pele (Figura 65a).

Em alguns experimentos, por causa da luz, calor, oxigênio, a ISOTN sofreu isomerização formando TN (até 5%). Na Figura 63, foram observados perfis de permeação diferentes em função da composição do gel.



**Figura 63:** Quantidade de ISOTN permeada na epiderme de orelha de porco *in vitro* x tempo, durante 24 h

Segundo Knepp *et al.* (1988) e Fang *et al.* (2001b), vesículas no estado líquido-cristalino apresentam maior velocidade de liberação do fármaco na pele do que vesículas no estado gel. Como maior fluidez da bicamada pode resultar em aumento da liberação dos solutos, eram esperados maiores valores de fluxo para a formulação Lipo\_PC. Contudo, o fluxo de ISOTN pela epiderme de porco foi maior para a formulação Lipo\_HPC/PC, seguida da Lipo\_PC/Col

(Figura 64a), correspondendo aos menores tempos de residência dentro da pele (*lag time*, Figura 64b). Isto se deve provavelmente à temperatura de transição de fase dos lipossomas **Lipo\_HPC/PC** (Figura 32) estar próxima da temperatura da pele (37°C), tornando as bicamadas mais fluidas, permeáveis e com defeitos. Desta forma estes lipossomas podem liberar o fármaco mais facilmente e também se misturar aos lipídios da pele, aumentando a permeação da ISOTN.



**Figura 64**: Valores de fluxo (a) e *Lag time* (b) de ISOTN em géis lipossomais e alcoólicos obtidos nos testes de permeação em epiderme de orelha de porco, durante 24 h

Em relação à Lipo\_PC/Col, a provável instabilidade do fármaco na bicamada lipídica que contém colesterol, verificada pela presença de cristais de ISOTN no teste de estabilidade (item 4.5.5), influenciou a liberação mais rápida e partição da ISOTN na pele. Vrhovnik, *et al.* (1998) observaram por EPR maior liberação na pele da sonda encapsulada em lipossomas contendo dipalmitoilfosfatidilcolina ou dimiristoilfosfatidilcolina com 30% de colesterol em relação aos lipossomas sem o esteróide.

Lipossomas Lipo\_PC/PS tiveram menor fluxo e maior *lag time*, refletindo uma interação/liberação da ISOTN mais lenta, talvez porque o fosfolipídio PS e a pele, apresentam cargas negativas (Barry, 1983). A formulação Lipo\_PC apresentou valores intermediários de fluxo, enquanto Lipo\_HPC/DO apresentou características semelhantes à Lipo\_PC/PS. A presença de polioxietileno na superfície lipossomal do Lipo\_HPC/DO, formando uma camada mais hidrofílica, pode ter minimizado a partição do fármaco e/ou fusão com lipídios da pele.

Além disso, estes lipossomas apresentam  $T_m>37$  °C, estrutura da bicamada lipídica mais rígida que os outros lipossomas a base de fosfatidilcolina PC e o **Lipo\_HPC/PC** (Figura 31).

Foi observado um maior fluxo de fármaco para o gel alcoólico de ISOTN 0,025% (m/m) que os géis lipossomais 0,025% (m/m), o mesmo ocorrendo com o gel alcoólico 0,050% (m/m). Este fato se deve ao efeito do etanol na barreira lipídica da pele. Etanol é considerado um agente ou promotor de penetração por aumentar a solubilidade e o coeficiente de partição de certos fármacos na matriz lipídica, a custa de rompimento e extração dos lipídios do estrato córneo, causando irritação da pele (Kim *et al.*, 1992; Walker e Smith, 1996; Foldvari, 2000).

Gel alcoólico 0,025% (m/m) apresentou valor de fluxo (18 ng/h.cm<sup>2</sup>) mais próximo do valor obtido para o gel contendo **Lipo\_HPC/PC** (13 ng/(h.cm<sup>2</sup>)). Esta última formulação pode ter atuado como agente de penetração, pois a quantidade de ISOTN permeada pela pele foi maior (60%) que a quantidade retida (Figuras 65a e 65b, respectivamente) e com pequeno valor de *lag time*.



**Figura 65:** (a) Quantidade de ISOTN permeada pela pele na solução receptora; (b) quantidade de ISOTN acumulada na pele, após 24 h de permeação

As quantidades de ISOTN obtidas na solução receptora, permeadas 24 h após aplicação dos géis lipossomais e alcoólicos (Figura 65a) seguem a tendência dos resultados de fluxo (Figura 64a). Os géis contendo Lipo\_PC, Lipo\_PC/PS e Lipo\_HPC/DO tiveram concentrações semelhantes ou maiores de ISOTN na pele (Figura 65b) que no líquido receptor (Figura 65a),

indicando que a composição lipossomal ajudou a liberação da ISOTN preferencialmente dentro da pele e não através da pele. Para Cevc *et al.* (1996) lipossomas contendo lipídios negativos (como fosfatidilserina) contribuem positivamente para o depósito do ativo na pele. Segundo Naeff *et. al.* (1998), a liberação sustentada e efeito de reservatório do ativo na pele ocorrem quando a concentração de fármaco que nela permanece é maior que a permeada. Desta forma, o fármaco atua no sítio alvo (pele), minimizando a absorção sistêmica. Os géis Lipo\_HPC/PC, Lipo\_PC/Col e os géis alcoólicos produziram mais ISOTN na solução receptora que na pele, indicando que estes lipossomas podem estar atuando como agentes de penetração cutânea.

A quantidade de fármaco na solução receptora em relação à de ISOTN no gel (300  $\mu$ L de gel, equivalente a 75  $\mu$ g de ISOTN; área da pele: 1,77 cm<sup>2</sup>) foi 0,1 a 0,7% para as formulações lipossomais e até 1,7% para os géis alcoólicos. Assim, considerando que a solução receptora simula a circulação sanguínea, os géis lipossomais proporcionaram menor absorção sistêmica, o que é desejável sob o ponto de vista terapêutico.

Na Figura 65b, observou-se que o gel alcoólico de ISOTN 0,05% (m/m) proporcionou uma quantidade de ISOTN retida na pele próxima ao valor obtido com o gel alcoólico 0,025% (m/m), indicando tendência de saturação da pele pelo fármaco. Os valores de desvio padrão foram muito maiores para os géis alcoólicos, conseqüência da dificuldade de limpeza da pele devido à maior aderência destes géis. Portanto, os valores de quantidade de ISOTN acumulados na pele para os géis alcoólicos podem, ainda, estar superestimados.

Um fato que deve ser levado em consideração sobre estes resultados é que a força empregada na separação da derme e epiderme, pode ter aumentado o diâmetro dos poros e, assim, os valores de fluxo e *lag time* para todos os géis podem estar superestimados.

Outro teste importante que poderia ser realizado é a avaliação do fármaco em cada região da pele após o teste de permeação do fármaco durante 24 h utilizando a pele inteira. Este teste fornece informações sobre a quantidade do fármaco em cada região da pele (estrato córneo, epiderme e derme). Entretanto isso não foi possível porque é necessária muita prática e habilidade para separar estas camadas além do que é preciso considerar que, neste caso, o fármaco ficaria mais exposto à luz, calor e oxigênio, sendo degradado.

Os resultados obtidos com os estudos sobre liberação *in vitro* da ISOTN (através dos testes de permeação cutânea realizado em célula de Franz) mostraram que esta liberação pode ser modulada variando a composição lipídica das suspensões lipossomais. Concluindo, pode-se afirmar que os géis lipossomais apresentaram menores fluxos percutâneos que os alcoólicos convencionais e, consequentemente, há menor absorção sistêmica do fármaco e menores efeitos adversos.

## 4.8 Teste sobre irritação cutânea primária e acumulativa em coelhos

Fármaco e excipientes têm diferentes capacidades de sensibilização para induzir dermatites de contato irritativa ou alérgica. O risco de reação na pele produzido por substância química dependem de sua inerente alergenicidade e habilidade para penetrar na pele normal ou danificada (Walters, 2002).

Irritação é uma reação não imunológica em tecidos por aplicação de um estímulo. Surge logo após o contato com o produto irritante ou pela exposição contínua de uma pele mais sensível. Irritação pode ser do tipo subjetiva (sem inflamação: ardor, coceira) ou do tipo primária (exposição inicial causa inflamação). Irritação acumulativa refere-se à resposta inflamatória após exposição repetitiva ao ativo, no mesmo local. A reação mais comum consiste de uma resposta inflamatória local caracterizada por eritema/edema ou reação corrosiva com destruição do tecido local. A irritação tende a reduzir a eficiência da função de barreira do estrato córneo e pode aumentar a perda transepidérmica de água, diminuindo o conteúdo de água da pele. Não há um modelo adequadamente validado *in vitro* para predizer a irritação na pele causada por produtos químicos aplicados. O método padrão utiliza seres humanos ou animais (Walters, 2002) e o teste mais utilizado usando animais, é chamado de teste de Draize (Draize *et al.*, 1944; Draize, 1965).

Para verificar o potencial de risco irritativo à pele das suspensões lipossomais desenvolvidas, foram realizados testes de irritação dérmica primária (apenas uma aplicação de produto) e irritação dérmica acumulativa (uma única aplicação diária, durante vários dias), pois o produto a ser comercializado será de uso regular, sem enxágüe. Foi avaliada a irritação dérmica dos géis aquosos lipossomais contendo 0,025% (m/m) de ISOTN, e para comparação, foram avaliados os géis alcoólicos contendo 0,025 e 0,050% (m/m) de ISOTN. Este último gel corresponde à formulação do produto comercialmente disponível ISOTREX<sup>®</sup> 0,05% (m/m), produzido pela empresa Stiefel. Foram testados também os géis aquoso e alcoólico, sem a presença de lipossomas e ISOTN, para verificar possíveis irritações da formulação base. Os resultados estão apresentados na Tabela 30.

| amostras                                                   | irritabilidade         | irritabilidade         |  |
|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|--|
| amostras                                                   | primária               | acumulativa            |  |
| gel aquoso + PC + ISOTN 0,025% (m/m)                       | não irritante          | não irritante          |  |
| gel aquoso + PC/Col + ISOTN 0,025% (m/m)                   | não irritante          | não irritante          |  |
| gel aquoso + PC/PS+ ISOTN 0,025% (m/m)                     | não irritante          | não irritante          |  |
| gel aquoso + HPC/PC + ISOTN 0,025% (m/m)                   | não irritante          | não irritante          |  |
| gel aquoso + HPC/DO + ISOTN 0,025% (m/m)                   | não irritante          | ligeiramente irritante |  |
| gel aquoso                                                 | não irritante          | não irritante          |  |
| gel alcoólico + ISOTN 0,025% (m/m)                         | não irritante          | severo irritante       |  |
| gel alcoólico + ISOTN 0,050% (m/m)<br>( <i>comercial</i> ) | ligeiramente irritante | severo irritante       |  |
| gel alcoólico                                              | não irritante          | não irritante          |  |

**Tabela 30:** Testes de irritação dérmica primária e acumulativa dos géis aquosos e alcoólicos, contendo ou não ISOTN, em coelhos

Considerando a metodologia adotada, as formulações lipossomais foram não irritantes para a pele de coelho, tanto nos testes de irritação primária quanto nos de irritação acumulativa, com exceção da formulação **Lipo\_HPC/DO**, que contém o surfatante, que foi ligeiramente irritante no teste cumulativo. Este surfatante, apesar de ter estrutura química similar à de um fosfolipídio, causou maior irritação. Surfatante PEG-8 oleato (Lipopeg 4DO) é usado na formulação de óleos de banho e de corpo, hidratantes e pós-barba.

Os géis, aquoso e alcoólico, de hidroxipropilcelulose, sem a presença de lipossomas e ISOTN, não causaram irritação dérmica nos coelhos durante o período de avaliação.

Os géis alcoólicos contendo 0,025 e 0,05% (m/m) de ISOTN foram não irritantes e ligeiramente irritantes para a pele dos coelhos, respectivamente, no teste de irritação primária. Porém, foram severamente irritantes no teste acumulativo. É esperado que o uso de formulações com maiores concentrações de fármacos, como a ISOTN, que causa ressecamento da pele, aumente os efeitos de irritação dérmica.

No teste de permeação (item 4.7), o maior fluxo da ISOTN e a presença de álcool nos géis alcoólicos, em relação aos lipossomais aquosos, provavelmente são as causas da maior irritação observada no teste de potencial irritativo. Apesar do gel lipossomal **Lipo\_HPC/PC** apresentar valor de fluxo próximo ao do alcoólico 0,025% (m/m), ele não causou irritação.

A grande vantagem de se utilizar formulações lipossomais em meio aquoso é evitar a presença de álcool, pois géis alcoólicos normalmente potencializam a irritação da pele quando

em presença de substâncias irritantes. O etanol altera a organização dos lipídios do estrato córneo fazendo com que o ativo entre em contato mais rápido com a circulação sanguínea, além de aumentar a perda transepidérmica de água.

Lipossomas além de biocompatíveis, são carreadores de moléculas de água (encapsuladas) e ajudam na oclusão da pele, reduzindo a perda transepidérmica de água. O aumento da hidratação da pele ajuda a evitar o ressecamento causado pela ISOTN devido à sua afinidade pelos lipídios do estrato córneo e conseqüente desorganização desta barreira. Os resultados sobre permeação indicaram que os géis aquosos lipossomais contendo ISOTN encapsulada tiveram fluxo menor do que os géis alcoólicos contendo este fármaco, podendo diminuir efeitos adversos, como irritação dérmica, por causa da liberação mais lenta. Como evidenciado no teste de potencial irritativo, géis aquosos lipossomais contendo ISOTN são menos irritantes que os alcoólicos, ambos contendo a mesma concentração de fármaco, comportamento este também verificado em outros trabalhos. Cabanas *et al.* (1992) verificaram que géis liposomais de TN foram menos irritantes para pele de coelho do que géis controle. Schafer-Korting *et al.* (1994) demonstraram a mesma tendência em testes clínicos em relação a produto convencional.

A ausência de irritação dérmica causada pelas formulações lipossomais é um resultado importante, pois muitos pacientes desistem do tratamento com ISOTN e TN devido ao poder irritativo intrínseco destes fármacos aliado às formulações convencionais que contém álcool.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram alcançados, pois foram obtidas formulações lipossomais não irritantes, com menor fotodegradação e fluxo percutâneo do que os géis convencionais. O gel contendo Lipo\_PC/PS apresentou características importantes que indicam a possibilidade de maior eficácia em relação aos géis alcoólicos: diminuiu a fotodegradação da ISOTN, apresentou menor fluxo percutâneo e maior concentração do fármaco na pele e não causou irritação dérmica. Para comparações com a suspensão Lipo\_PC/PS, as formulações Lipo\_PC (cujo valor de fluxo foi intermediário) e Lipo\_HPC/PC (cujo valor de fluxo foi o maior), ambas também não irritantes à pele, deveriam ser testadas em relação à eficácia clínica.

# **5 CONCLUSÕES**

No desenvolvimento deste projeto foram utilizadas várias técnicas para preparação de lipossomas e a que proporcionou melhor encapsulação do fármaco foi a metodologia de hidratação do filme lipídico seco.

Independentemente da quantidade inicial de fármaco adicionada, as formulações contendo apenas fosfatidilcolina saturada HPC como lipídio estrutural, causaram vazamento do fármaco com conseqüente formação de cristais de ISOTN na suspensão, visíveis ao microscópio óptico.

A encapsulação da ISOTN foi mais eficiente após aumento da fluidez das bicamadas lipídicas, através da mistura de fosfatidilcolina HPC com substâncias insaturadas ou utilizando como lipídio estrutural a fosfatidilcolina insaturada, PC.

A eficiência de encapsulação do fármaco foi maior que 98%. Valor obtido com a razão molar ISOTN/lipídios ~0,026:1 e com as seguintes formulações:

(a) lipossomas contendo fosfatidilcolina HPC com 40% mol de surfatante Lipopeg 4DO (Lipo\_HPC/DO);

(b) lipossomas de fosfatidilcolina HPC com 40% mol de fosfatidilcolina insaturada PC (Lipo\_HPC/PC);

(c) lipossomas contendo somente fosfatidilcolina PC (Lipo\_PC);

(d) lipossomas com PC e 20% mol de colesterol (Lipo\_PC/Col) ;

(e) lipossomas com PC e 10% mol de fosfatidilserina PS (Lipo\_PC/PS).

O elevado valor da encapsulação dispensa a etapa de separação do fármaco livre para testes *in vitro e in vivo*.

Estas suspensões foram estáveis durante 3 meses à 8 °C, havendo manutenção do diâmetro médio dos lipossomas (~300 nm) e da porcentagem de ISOTN encapsulada.

Análises mediante microscopia eletrônica de transmissão e de varredura das suspensões lipossomais confirmaram a estrutura lamelar e a forma esférica característica dos lipossomas.

Após exposição das formulações à radiação de lâmpada fluorescente e de UVA, os resultados indicaram que a encapsulação da ISOTN em lipossomas minimizou a fotodegradação da ISOTN em comparação com a solução etanólica. A incorporação da suspensão lipossomal contendo ISOTN em gel aquoso diminuiu a fotodegradação do fármaco em relação ao gel alcoólico (gel convencional) com ISOTN. A encapsulação da ISOTN em lipossomas protegeu o fármaco contra a fotodegradação.

A encapsulação do fármaco nos lipossomas foi comprovada por fluorescência do pireno. A presença de ISOTN encapsulada aumentou o grau de anisotropia e diminuiu a formação de excímeros do pireno, em relação aos lipossomas vazios. Estes resultados indicaram que as moléculas de pireno foram inseridas na bicamada, em locais próximos às moléculas de ISOTN. Além disso, a presença de ISOTN causou supressão da fluorescência do pireno por causa do efeito do filtro interno.

A solução contendo Renex 1000 na concentração de 3% (m/v) foi a que menos influenciou a estrutura dos lipossomas, sendo escolhida como solução receptora para manter o processo difusional nos experimentos sobre permeação cutânea.

Os géis lipossomais apresentaram menor fluxo percutâneo que os alcoólicos. Entre as formulações lipossomais, a permeação de ISOTN variou conforme a composição dos lipossomas. O maior fluxo e menor tempo de residência do fármaco na pele foram obtidos para a formulação Lipo\_HPC/PC, refletindo a T<sub>m</sub> dos lipossomas próxima à temperatura da pele. Neste caso os lipossomas atuam como agente de penetração cutâneo. Os menores valores de fluxo e maiores valores do tempo de residência foram obtidos para os géis contendo Lipo\_PC/PS e Lipo\_PC/DO: lipossomas que acumularam mais ISOTN na pele que na solução receptora e estão atuando como sistemas/reservatório para liberação contínua.

Formulações lipossomais em gel aquoso contendo ISOTN encapsulada (0,025% (m/m)) não foram irritantes para a pele do coelho, tanto nos testes de irritação primária quanto nos de irritação acumulativa, com exceção da formulação **Lipo\_HPC/DO**. Estes resultados provavelmente são reflexos do menor fluxo percutâneo. Os géis alcoólicos contendo 0,025 e 0,05% (m/m) de ISOTN foram severamente irritantes no teste acumulativo, devido à maior permeação de ISOTN pela pele e a presença de álcool.

Considerando o exposto é possível mencionar que os objetivos deste trabalho foram completamente alcançados: ISOTN foi completamente encapsulada nos lipossomas, por isso não há necessidade de separação de fármaco livre; as suspensões lipossomais desenvolvidas foram caracterizadas; a encapsulação da ISOTN nos lipossomas foi comprovada; a encapsulação diminuiu a fotodegradação do fármaco em relação ao fármaco dissolvido em

álcool; as suspensões lipossomais apresentaram menor fluxo percutâneo que os géis alcoólicos (convencionais) e a maioria das suspensões lipossomais não causou irritação cutânea. Em particular a suspensão lipo\_PC/PS reteve na pele o dobro da concentração de ISOTN sendo, portanto, uma formulação que apresenta potencial par ser usada clinicamente. *Portanto, a encapsulação do fármaco em lipossomas aumentou sua estabilidade e diminuiu efeitos adversos em relação aos produtos convencionais*.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

As formulações: Lipo\_PC/PS (que apresentou menor valor de fluxo percutâneo), Lipo\_PC (que mostrou fluxo intermediário) e Lipo\_HPC/PC (que exibiu maior fluxo) foram não irritantes à pele e, de forma semelhante, diminuíram a fotodegradação do fármaco. Estas formulações nas concentrações de 0,025% ou 0,05% (m/m) devem ser testadas, em relação à eficácia clínica, com voluntários humanos, para comparação com as formulações alcoólicas convencionais. Um dos testes que deve ser realizado é a análise de comedogenicidade das formulações (ANVISA, 2003).

Existem outras análises que também fornecem informações sobre a ação da ISOTN encapsulada em lipossomas: (a) testes com culturas de queratinócitos humanos e avaliação por imunohistoquímica para verificar a ação da ISOTN na diferenciação e proliferação celulares (Korge *et al.*, 1990; Kunchala *et al.*, 2000) (b) testes com culturas de células da glândulas sebáceas humanas (sebócitos) para verificar a capacidade de inibição do crescimento dos sebócitos e da produção de sebo no folículo piloso após aplicação do produto (Doran e Shapiro, 1990; Nelson *et al.*, 2006); (c) testes com camundongos, sem pêlos, da raça Rhino (Bonne *et al.*, 1981), que possuem glândulas sebáceas bem desenvolvidas e desenvolvem espontaneamente comedões, para monitorar mudanças nas dimensões e na histologia das glândulas sebáceas após aplicação do produto.

Podem ser realizados estudos sobre retenção do fármaco na pele, analisando o estrato córneo (técnica do *tape stripping*), epiderme (retirada após 1 min de contato com água quente) e derme após teste de permeação cutânea da pele inteira durante 24 h (Barry, 1983).

A ISOTN é utilizada, por via oral, no tratamento de alguns tipos de neoplasias (Sun e Lotan, 2002; Armstrong *et al.*, 2005). Todavia, a quantidade deste fármaco que chega às células neoplásicas é reduzida devido a sua metabolização no fígado, denominada efeito de primeira passagem (Cisneros *et al.*, 2005). Como ISOTN é pouco solúvel em água, não existem produtos para aplicação intravenosa e uma das formas de superar este obstáculo e aumentar a eficiência do tratamento é o emprego da ISOTN lipossomal (Parthasarathy e Mehta, 1998).

Suspensões lipossomais contendo ISOTN podem ser testadas, *in vitro*, em várias linhagens de células neoplásicas.

Como a ISOTN é carreada no organismo pela albumina (Sehgal *et al.,* 2006), experimentos poderão ser conduzidos avaliando a interação de ISOTN lipossomal com esta proteína.

Podem ainda ser realizados estudos sobre a localização das moléculas da ISOTN nas bicamadas lipossomais, através de NMR (Fraceto *et al.*, 2002).

# 7 REFERÊNCIAS

**Agarwal** R., Katare O.P., Vyas, S.P. Preparation and *in vitro* evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 43.

**Aguiar**, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Ruiz, C.C. On the determination of critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interf. Sci.* **258** (2003) 116.

**Ahyayauch**, H., Larijani, B., Alonso, A., Goñi, F.M. Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: influence of the acyl chain structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1758** (2006) 190.

**Akyol**, M., Ozcelik, S. Non-acne dermatologic indications for systemic isotretinoína. *Am. J. Clin. Dermatol.* **6** (2005) 175.

Amichai, B., Grunwald, M.H. Isotretinoin in dermatology. J. Dermatol. Treatment. 11 (2000) 219.

**Amichai**, B., Shemer, A.Grunwald, M.H. Low-dose isotretinoin in the treatment of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **54** (2006) 644.

**Anabousi**, S., Bakowsky, U., Schneider, M., Huwer, H., Lehr, C-M., Ehrhardt, C. In vitro assessment of transferrin-conjugated liposomes as drug delivery systems for inhalation therapy of lung cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29** (2006) 367.

**Ananthapadmanabhan**, K.P., Goddard, E. D., Turro, N. J., Kuo, P.L. Fluorescence probes for critical micelle concentration *Langmuir* **1** (1985) 352.

**Andega**, S., Kanikkannan, N., Singh, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *J. Control. Rel.* **77** (2001) 17.

Anstey, A., Hawk, J.L.M. Isotretinoin-PUVA in women with psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **136** (1997) 798.

**ANVISA** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Habilitação de laboratórios analíticos em saúde segundo os requisitos da ISOMEC 17025 – procedimento GGLAS 02/17025: habilitação de laboratório na REBLAS. 2 ed. Revisão 01. Brasília: ANVISA (2002).

**ANVISA** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília (2003).

**Armstrong**, J.L., Redfern, C.P.F., Veal, G.J. 13-cis Retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology—is changing shape the key to success? *Biochem. Pharm.* **69** (2005) 1299.

**Attwood**, D e Florence, A.T. Surfactant systems. Their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall, London (1983).

**Balcan**, M., Anghel, D. F. The partition of ethoxylated non-ionic surfactants between two non-miscible phases. *Colloid Polym. Sci.* **283** (2005) 982.

**Bangham**, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids *J. Mol. Biol.* **13** (1965) 238.

**Barry**, B.W. Dermatological Formulations – percutaneous absorption. Marcel Dekker, New York (1983).

**Berger,** N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., Brandl, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int. J. Pharm.* **223** (2001) 55.

**Betz**, G., Aeppli, A., Menshutina, N., Leuenberger, H. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application *Int. J. Pharm.* **296** (2005) 44.

**Biltonen**, R.L., Lichtenberg, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chem. Phys. Lipids* **64** (1993) 129.

**Blaner**, W.S. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *Am. Acad. Dermatol.* **45** (2001) S129.

**Bonne**, C., Zeziola, F., Secchi, J., Saurat, J.H. A new model for the assay of comedolytic activity. *Int. J. Cosmetic Sci.* **3** (1981) 23.

**Bronaugh**, R.L., Stewart, R.F. Methods for In Vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. *J. Pharm. Sci.* **73** (1984) 1255.

**Bouwstra**, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** S1 (2002) S41.

**Bridges**, P.A., Taylor, K.M.G. An investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes. *Int. J. Pharm.* **204** (2000) 69.

**Brisaert**, M., Gabriëls, M., Matthijs, V., Plaizier-Vercammen, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26** (2001) 909.

**Bun**, H., Al-Mallah, N.R., Aubert, C., Cano, J.P. High-performance liquid chromatography of aromatic retinoids and isotretinoin in biological fluids. *Method Enzimol.* **189** (1990) 167.

**Cabanas**, R.C.T., Cabruja, C.P., Morell, E.P., Xamani, M.S. Procedimiento de obtención de liposomas de retinoides. Patente ES 2024381 (1992).

**Cevc**, G., Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* **1104** (1992) 226.

**Cevc**, G., Blume, G., Schätzlein, A., Gebauer, D., Paul, A., The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18** (1996) 349.

**Cevc**, G., Schatzlein, A., Blume, G. Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J. Control. Rel.* **36** (1995) 3.

**Cevc**, G., Schätzlein, A., Richardsen, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **1564** (2002) 21.

**Cisneros**, F.J., Gough, B.J., Patton, R.E., Ferguson, S.A. Serum levels of albumin, triglycerides, total protein and glucose in rats are altered after oral treatment with low doses of 13-cis-retinoic acid or all-trans-retinoic acid. *J. Appl. Toxicol.* **25** (2005) 470.

**Chan**, V., Mao, H.Q., Leong, K.W. Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine membrane bilayer. *Langmuir* **17** (2001) 3749.

**Cócera**, M., López, O., Coderch, L., Parra, J.L., de la Maza, A. Alterations in stratum corneum lipid liposomes due to the action of Triton X-100 ifluence of the level of ceramides on this process. *J. Control. Rel.* **68** (2000) 387.

**Cócera**, M., López, O., Coderch, L., Parra, J.L., de la Maza, A. Sublytic alterations caused by alkyl glucosides in stratum corneum lipid liposomes. *Colloids Suf. A* **176** (2001a) 167.

**Cócera**, M., López, O., Coderch, L., Parra, J.L., de la Maza, A. Solubilization of stratum corneum lipid liposomes by TritonX-100. Influence of the level of cholesteryl sulfate in the process. *Colloid. Surf. A* **182** (2001b) 15.

**Copland**, M.J., Rades, T., Davies, N.M. Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 135.

**Cranney**, M., Cundall, R.B., Jones, G.R., Richards, J.T., Thomas, E.W. Fluorescence lifetime and quenching studies on some interesting diphenylhexane membrane probes. *Biochim. Biophys. Acta* **735** (1983) 418.

**Creton**, R., Zwaan, G., Dohmen, R. High pH prevents retinoic acid induced teratogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **39** (1995) 409.

**Crommelin**, D.J.A., Schreier, H. Liposomes. Em: *Colloidal Drug Delivery Systems*. Ed. Kreuter J., Marcel Dekker, New York (1994) 73.

**Crosas**, E., Egea M.A., Reig, F. Spectroscopic techniques applied to the study of laminin fragments inserted into model membranes. *J. Colloid Interf. Sci.* **295** (2006) 264.

**Curley**, R.W., Fowble, J.W. Photoisomerization of retinoic acid and its photoprotection in physiologic-like solutions. *Photochem. Photobiol.* **47** (1988) 831.

**de la Maza**, A., Parra, J.L. Alterations in phospholipid bilayers caused by oxyethylenated nonylphenol surfactants. *Arch. Biochem. Biophys.* **329** (1996) 1.

**de la Maza**, A., Parra, J.L. Vesicle to micelle phase transitions involved in the interaction of sodium cholate with phosphatidylcholine liposomes. *Colloids Surf. A* **127** (1997) 125.

**de la Maza**, A., López, O., Coderch, L., Parra, J.L. Interactions of oxyethylenated nonylphenols with liposomesmimicking the stratum corneum lipid composition. *Colloids Surf. A* **145** (1998) 83.

**de Paula**, E., Schreier, S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1240** (1995) 25.

**de Paula**, E., Schreier, S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic membrane interaction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29** (1996) 877.

**Demacker**, P.N.M., van Sommeren-Zondag, D.F., Stalenhoef, A.F.H., Stuyt, P.M.J., van 't Laar, A. Ultracentrifugation in swinging bucket and fixed-angle rotors evaluated for isolation and determination of high-density lipoprotein subfractions HDL2 and HDL3. *Clin. Chem.* **29** (1983) 656.

**Deo**, N., Somasundaran, P., Itagaki, Y. Mechanisms of solubilization of mixed liposomes: preferential dissolution of liposome components. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44** (2005) 1181.

**Desai**, T.R., Finlay, W.H. Nebulization of niosomal all-trans-retinoic acid: an inexpensive alternative to convencional liposomes. *Int. J. Pharm.* **241** (2002) 311.

**Doran**, T., Shapiro, S.S. Retinoids effects on sebocyte proliferation. *Method Enzimol.* **190** (1990) 335.

**Draize**, J.H. Woodard, G., Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin, and mucous membranes. *J. Phamacol. Exp. Ther.* **83** (1944) 377.

**Draize**, J.H. Dermal Toxicity. Appraisal of the safe chemicals in foods, drugs and cosmetics. The Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas (1965) 46.

**du Plessis**, C., Weiner, N., Muller, D.G. The influence of in vivo treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. *Int. J. Pharm.* **103** (1994a) R1.

**du Plessis**, J., Ramachandran, C., Weiner, N., Müller, D. G. The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. *Int. J. Pharm.* **103** (1994b) 277.

**Effendy**, I., Weltfriend, S., Patil, S., Maibach, H.I. Differential irritant skin responses to topical retinoic acid and sodium lauryl sulphate: alone and in crossover design. *Br. J. Dermatol.* **134** (1996) 424.

**El Maghraby**, G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 63.

**El Maghraby**, G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *Int. J. Pharm.* **276** (2004) 143.

**El Maghraby,** G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J. Pharm. Pharmacol.* **58** (2006) 415.

**Engelke**, M., Klockmann, H.-C., Diehl, H.A. Gramicidin affects the transverse and lateral distribution of pyrene and pyrene derived probes in lipid bilayers. *Spectrochim. Acta A* **52** (1996) 85.

**Engelke**, M., Bojarski, P., Blob, R., Diehl, H. Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: Comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophys. Chem.* **90** (2001) 157.

**European Pharmacopeia**. 3<sup>a</sup> ed. Strasbourg: Council of Europe (1997).

**Fang**, J.-Y., Wu, P.-C., Huang, Y.-B., Tsai, Y.-H. In vitro permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types. *Int. J. Pharm.* **126** (1995) 119.

Fang, J-Y., Hong, C-T. Chiu, W-T., Wang, Y-Y. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int. J. Pharm.* **219** (2001a) 61.

**Fang**, J-Y., Yu, S-Y., Wu, P-C., Huang, Y-B., Tsai, Y-H. In vitro skin permeation of estradiol from various proniosome formulations. *Int. J. Pharm.* **215** (2001b) 91.

**Fang**, J.-Y., Hwang, H., Huang, Y.L. Liposomes as vesicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Curr. Nanosci.* **2** (2006) 55.

Fang, N., Wang, J., Mao, H.Q., Leong K.W., Chan, V. BHEM-Chol/DOPE liposome induced perturbation of phospholipid bilayer. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **29** (2003) 233.

**Foldvar**i, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm. Sci.Techn. Today* **3** (2000) 417.

**Fortin-Ripoche**, J.P., Martina, M.S., Gazeau, F., Menager, C., Wilhelm, C., Bacri, J.C., Lesieur, S., Clement, O. Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: Feasibility. *Radiology* **239** (2006) 415.

**Fraceto**, L.F., Pinto, L.M.A., Franzoni, L., Braga, A.A.C., Spisni, A., Schreier, S., de Paula, E. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys. Chem.* **99** (2002) 229.

**Franz**, T.J. Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. *J Invest. Dermatol.* **64** (1975) 190.

**Fuchs**, F. J. Ultrasonic cleaning: fundamental theory and application. Blackstone-NeyUltrasonics, maio (2002). <u>www.blackstone-ney.com</u> - 26/01/07.

**Galembeck**, E., Alonso, A., Meirelles, N.C. Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants. *Chemico-Biolog. Inter.* **113** (1998) 91.

**Galla**, H.J., Sackmann, E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. *Biochim. Biophys. Acta* **339** (1974) 103.

**Galla**, H.J., Hartmann, W. Excimer-forming lipids in membrane research. *Chem. Phys. Lipids* **27** (1980) 199.

Gollnick, H., Schramm, M. Topical drug treatment in acne. *Dermatology* **196** (1998) 119.

**Goni**, F.M., Alonso, A. Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508** (2000) 51.

**Gregoriadis**, G., Leathwood, P.D., Ryman, B.E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* **14** (1971) 95.

**Gregoriadis**, G. Liposome Technology. 3vols. 1<sup>a</sup>. ed. CRC Press, Boca Raton (1983).

**Gregoriadis**, G. Liposome Technology. 3vols. 2<sup>a</sup>. ed. CRC Press, Boca Raton (1993).

Gregoriadis, G. Liposome Technology. 3vols. 3<sup>a</sup>. ed. CRC Press, Boca Raton (2006).

**Griffiths**, C.E.M., Maddin, S., Wiedow ,O., Marks, R., Donald, A.E., Khalon, G. Treatment of photoaged skin with a cream containing 0.05% isotretinoin and sunscreens. *J. Dermatol. Treatment* **16** (2005) 79.

**Gundersen**, T.E., Blomhoff, R. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J. Chromatography A* **935** (2001) 13.

**Hait**, S. K., Moulik, S. P. Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor–acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile–lipophile balance and other parameters of the surfactants. *J. Surfact. Detergents* **4** (2001) 303.

Han, C.H., Wiedmann, T.S. Spectral properties and ion dissociation behavior of retinoids I. Aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* **172** (1998) 241.

**Hofland**, H.E.J., Bouwstra, J.A., Bodde, H.E., Spies, F., Junginger, H.E. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small-angle X-ray scattering studies. *Br. J. Dermatol.* **132** (1995) 853.

**Hope**, M., Nayar, R., Mayer, L.D., Cullis, P.R. Reduction of lipossome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques. Em: *Liposome Technology*, vol. 1. Ed. Gregoriadis G., CRC Press, Boca Raton (1993).

**INCQS**- Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde. Manual de qualidade: ensaio de irritação cutânea primária. Rio de Janeiro Fundação Oswaldo Cruz, no. 65.3330.003 (2002).

**loele**, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G., Ragno, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoína in liposome formulations. *Int. J. Pharm.* **293** (2005) 251.

**loffe**, V., Gorbenko, G.P. Lysozyme effect on structural state of model membranes as revealed by pyrene excimerization studies. *Biophys. Chem.* **114** (2005) 199.

**Ishii**, F., Takamura, A., Ishigami, Y. Procedure for preparation of lipid vesicles (liposomes) using the coacervation (phase separation) technique. *Langmuir* **11** (1996) 483.

**Jacobs**, M., Martin, G.P., Marriott, C. Effects of phosphatidylcholine in the topical ioavailability of corticosteroids assessed by the human skin blanching assay, *J. Pharm. Pharmacol.* **40** (1988) 829.

Jones, M.N. Surfactants in membrane solubilisation. Int. J. Pharm. 177 (1999) 137.

**Jung**, S., Otberg, N., Thiede, G., Richter, H., Sterry, W., Panzner S., Lademann, J. Innovative Liposomes as a Transfollicular Drug Delivery System: Penetration into Porcine Hair Follicles. *J. Invest. Dermatol.* **126** (2006) 1728.

**Kalyanasundaram**, K., Thomas, J.K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 2039.

**Kamm**, J.J.J. Toxicology, carcinogenicity, and teratogenicity of some orally administred retinoids. *Am. Acad. Dermatol.* **6** (1982) 652.

**Kim**, Y.H., Ghanem, A.H., Mahmoud, H., Higuchi, W.I. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin mechanism(s) of action. *Int. J. Pharm.* **80** (1992) 17.

**Kirjavainen**, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., Suhonen, T.M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, Moönkkönen, J. Interaction of liposomes with human skin in vitro—the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1304** (1996)179.

**Klammt**, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., Bernhard, F. Evaluation of detergents for the soluble expression of a-helical and b-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.* **272** (2005) 6024.

**Knepp**, V.M., Hinz, R.S., Szoka, F.C., Guy, R.H. Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. I. Investigations of transdermal potential. *J. Control. Rel.* **5** (1988) 211.

**Korge**, B., Stadler, R., Mischke, D. Effect of retinoids on hyperproliferation – associated keratins K6 and K16 in cultured human keratinocytes: an quantitative analysis. *J. Invest. Dermatol.* **95** (1990) 450.

**Kunchala**, S.R., Suzuki, T., Murayama, A. Photoisomerization of retinoic acid and its influence on regulation of human keratinocyte grown and differentiation. *Indian J. Biochem. Biophys.* **37** (2000) 71.

**Lachman**, L., DeLuca, P., Akers, M.J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. Em: Teoria e prática na indústria farmacêutica. Ed. Lachman L. *et al.*, Trad. Pinto J.E. e Fernandes A.I., vol 2. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (2001) 1277.

**Lakowicz**, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2<sup>a</sup> ed. Kluwer Academic, New York, (1999).

**Langner**, M., Hui, S.W. lodide penetration into lipid bilayers as a probe of membrane lipid organization. *Chem. Phys. Lipids* **60** (1991) 127.

Lasch, J. Interaction of detergents with lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995) 269.

Lasic, D.D. Liposomes. Am. Scientist 80 (1992) 20.

Lasic, D.D. Liposomes: from physics to applications. Elsevier Science, Amsterdam (1993).

Lauer, A. C., Ramachandran, C., Lieb, L. M., Niemiec, S., Weiner, N.D. Targeted delivery to the pilosebaceous unit via liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18** (1996) 311.

Lee, S.C., Yuk, H.G., Lee, D.H., Lee, K.E., Hwang, Y.I., Ludescher, R.D. Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35** (2002) 358.

**Lehman**, P.A., Slattery J.T., Franz, T.J. Percutaneous-absorption of retinoids - influence of vehicle, light exposure, and dose. *J. Invest. Dermatol.* **91** (1988) 56.

Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71 (1971) 525.

**Leyden**, J. J. Topical treatment of acne vulgaris: retinoids and cutaneous irritation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **38** (1998) S1.

**Li-Jen Chen**, L-J., Lin, S-Y., Chern, C-S., Wu, S-C. Critical micelle concentration of mixed surfactant SDS/NP(EO)<sub>4</sub> o and its role in emulsion polymerization. *Colloids Surf. A* **122** (1997) 161.

Lichtenberg, D., Robson, R.J., Dennis, E.A. Solubilization of phospholipids by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **737** (1983) 285.

**Lichtenberg**, D. Characterization of the solubilization of lipid bilayer by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **821** (1985) 470.

**Lichtenberg**, D., Opatowski, E., Kozlov, M. M. Phase boundaries in mixtures of membraneforming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1508** (2000)1.

Liu, R.S.H., Asato, A.E. Photochemistry and synthesis of stereoisomers of vitamin A *Tetrahedron* **40** (1984) 1931.

**Lopes**, P.S. Membranas no Estudo de Permeação Cutânea. *Cosmetics & Toiletries* (edição em português) **12** (2000) 63.

**López**, O., de la Maza, A., Coderch, L., López-Iglesias, C., Wehrli, E., Parra, J.L. Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipids liposomes by Triton X-100. *FEBS Letters* **426** (1998) 314.

**Ma**, L.D., Magin, R.L, Dunn, F. The effects of A23187 on the phospholipid phase transition of large unilamellar vesicles (LUV) as detected by ultrasound spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1022** (1990)17.

**Maddin**, S., Lauharanta, J., Agache, P., Burrows, L., Zultak, M., Bulger, L. Isotretinoin improves the appearance of photodamaged skin: Results of a 36-week, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42** (2000) 56.

**Maier**, O., Oberle, V., Hoekstra, D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids* **116** (2002) 3.

**Malheiros**, S.V.P.M., de Paula, E., Meirelles, N.C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1373** (1998) 332.

**Manconi,** M., Valenti, D., Sinico, C., Lai, F., Loy, G., Fadda, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin: II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int. J. Pharm.* **260** (2003) 261.

**Manosroi,** A., Wongtrakul, P., Manosroi, P., Sakai, H., Sugawara, F., Yuasa, M., Abe, M. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids. Surf. B* **30** (2003) 129.

**Manson,** T.J. Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry. Royal Society of Chemistry, Cambridge (1989).

**Marmottant**, P., Hilgenfeldt, S. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature* **43** (2003) 153.

**Marro**, D., Guy, R.H., Delgado-Charro, M.B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. *J. Control. Rel.* **70** (2001) 213.

**Martines**, M.A.U., Davolos, M.R., Jafelicci Jr, M. O efeito do ultra-som em reações químicas. *Quim. Nova* **23** (2000) 251.

Masini, V., Bonte, F., Meybeck, A., Wepierre, J. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 17.

**Mathias**, J.H. Fluorescence study of premicellar aggregation in cationic gemini surfactants. *Langmuir* **17** (2001) 6148.

**Memoli**, A., Annesini, M.C., Petralito, S. Surfactant-induced leakage from liposomes: a comparison among different lecithin vesicles. *Int. J. Pharm.* **184** (1999) 227.

**Meybeck**, A., Michelon, P., Montastier, C., Redziniak, G. Pharmaceutical composition, in particular dermatological or cosmetic, comprising hydrous lipidic lamellar phases or liposomes containing a retinoid or a structural analogue a carotenoid. Patente US 5,034,228 (1991).

**Mezei**, M., Gulasekharam, V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.* **34** (1982) 473.

**Mezei**, M. Liposomes and the skin. Em: Liposomes in drug delivery. vol.2. Ed. Gregoriadis G. *et.al.*, Harwood Academic Publishers, Chur (1993) 125.

**Mohammed**, A.R., Weston, N., Coombes, A.G., Fitzgerald, M., Perrie, Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimization of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int. J. Pharm.* **285** (2004) 23.

**Montenegro**, L., Panico, A.M., Bonina, F. Quantitative determination of hydrophobic compound entrapment in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes by differential scanning calorimetry. *Int. J. Pharm.* **138** (1996) 191.

Moulik, S. P. Micelles: self-organized surfactant assemblies. Curr. Sci. 71 (1996) 368.
**Müller**, H-J, Luznat, M., Galla, H-J. Lateral diffusion of small solutes and partition of amphipaths in defect structures of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **856** (1986) 283.

**Naeff**, R., Delmenico, S., Corbo, M., Ondracek, J., Floether, J. Liposome-based topical tretinoin formulation. Patente WO9830215A (1998).

**Naik**, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *PSTT* **3** (2000) 318.

**Nankervis**, R., Davis, N.H., Shaw, P.N. Intestinal lymphatic transport of three retinoids in the rat after oral administration: effect of lipophilicity and lipid vehicle. *Int. J. Pharm.* **130** (1996) 57.

**Napoli**, J.L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1440** (1999) 139.

**Nelson**, A.M., Gilliland, K.L., Cong, Z., Thiboutot, D.M. 13-*cis* Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* **126** (2006) 2178.

**Nerurkar,** M.M., Ho, N.F., Burton. P.S., Vidmar. T.J., Borchardt, R.T. Mechanistic roles of neutral surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* **86** (1997) 813.

New, R.R.C. Liposomes- a practical approach. Oxford University Press, New York (1990).

**New**, R. R. C. Influence of Liposome characteristics on their properties and fate. Em: Liposomes as tools in basic research and industry. Ed. Philippot J.R e Schuber, F. CRC Press, London (1995) 3.

**Noy** N. The ionization behavior of retinoic acid in aqueous environments and bound to serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1106** (1992) 152.

**Ogiso**, T., Niinaka, N., Iwaki, M. mechanism for enhancement effect of lipid disperse system on percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.* **85** (1996) 57.

**Ogue**, S., Takahashi, Y., Onishi, H., Machida, Y. Preparation of double liposomes and their efficiency as an oral vaccine carrier. *Biol. Pharm. Bull.* **29** (2006) 1223.

**Oliveira Filho**, J. Estrutura e função da pele. Em: Manual de Dermatologia. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Cucé L.C.e Neto C.F., Atheneu, São Paulo (2001).

**Orfanos**, C.E., Zouboulis, Ch. C. Oral retinoids in the treatment of seborrhoea and acne. *Dermatology* **196** (1998)140.

**Ortiz**, A., Aranda, F.J., Villalaín, J., Gómez-Fernández, J.C. Influence of retinoids on phosphatidylethanolamine lipid polymorphism. *Biochim. Biophys. Acta* **1112** (1992) 226.

**Ostrowsky**, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chem. Phys. Lip.* **64** (1993) 45.

**Parthasarathy**, R., Mehta, K.I. Altered metabolism of all-trans-retinoic acid in liposome encapsulated form. *Cancer Lett.* **134** (1998) 121.

Patel H. Liposomes as a controlled-release system. Biochem. Soc. Trans. 13 (1985) 513.

**Patel**, V.B., Misra, A., Marfatia, Y.S. Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications. *Pharm. Dev. Tech.* **5** (2000) 455.

**Partearroyo**, M.A., Alonso, A., Goñi, F.M., Tribout, M., Paredes, S. Solubilization of Phospholipid Bilayers by Surfactants Belonging to the Triton X Series: Effect of Polar Group Size. *J. Colloid Interface Sci.* **178** (1996) 156.

**Patist**, A.,. Bhagwat, S.S, Penfield, K.W., Aikens, P., Shah, D.O. On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. *J. Surfact. Deterg.* **3** (2000) 53.

Pawson, B.A. History of retinoids. J. Am. Acad. Dermatol. 6 (1982) 577.

**Peck**, G.L., DiGiovanna, J.J. Synthetic Retinoids in Dermatology. Em: The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. Ed Sporn M. B. *et al.*. Raven Press, New York (1994) 631.

**Peppas**, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., Zhang, J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **02** (2000) 9.

**Pola**, A., Michalak, K., Burliga, A., Motohashi, N., Kawase, M. Determination of lipid bilayer/water partition coefficient of new phenothiazines using the second derivative of absorption spectra method. *Eur. J. Pharm. Sci* **21** (2004) 421.

**Pons**, M., Foradada, M., Estelrich, J. Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int. J. Pharm.* **95** (1993) 51.

**Preté**, P.S.C., Gomes, K., Malheiros, S.V.P., Meirelles, N.C., de Paula, E. Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ether series, *Biophys. Chem.* **97** (2002) 45.

**Priev**, A., Zalipsky, S., Cohen, R., Barenholz, Y. Determination of Critical Micelle Concentration of Lipopolymers and Other Amphiphiles: Comparison of Sound Velocity and Fluorescent Measurements. *Langmuir* **18** (2002) 612.

**Redelmeier,** T.E., Kitson, N. Dermatological Applications of liposomes. Em: Liposomes: rational design. Ed. Janoff A.S., Marcel Dekker, New York (1999) 289.

Roos, T.C., Jugert, F.K., Merk, H.F., Bickers, D.R. Retinoid Metabolism in the Skin. *Pharmacol. Rev.* **50** (1998) 315.

**Rouse**, G.A., Siakotos, N., Fleischer, S. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **1** (1966) 85.

Sampaio, S.A.P., Rivitti, E.A. Dermatologia. 2<sup>a</sup>. ed., Artes Médicas, São Paulo (2000).

Santos, M.C., Castanh, M.A.R.B. Teaching light scattering spectroscopy. *Biophys. J.* **71** (1996) 1641.

Santos, N.C., Castanho, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim. Nova* 25 (2002) 1181.

**Santos**, N.C., Prieto, M., Castanho, M.A.R.B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta* **1612** (2003) 123.

**Schafer-Korting**, M., Korting, H.C., Ponce-Poschl, E. Liposomal tretinoin for complicated acne vulgaris, *Clin. Invest.* **72** (1994) 1086.

**Schreier**, H., Bouwstra. J. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *J. Control. Rel.* **30** (1994) 1.

**Schreier**, S., Malheiros, S.V.P., de Paula, E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1508** (2000) 210.

**Sehgal,** V.N., Srivastava, G., Sardana, K. Isotretinoin – unapproved indications/uses and dosage:a physician's reference. *Int. J. Dermatol.* **45** (2006) 772.

**Šentjurc**, M., Vrhovnik, K., Kristl, J.J. Liposomes as a topical delivery system: a role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Control. Rel.* **59** (1999) 87.

Sharata, H.H., Kartz, K.H. Liposomes. Int. J. Dermatol. 35 (1996) 761.

**Shimizu**, K., Tamagawa K., Takahashi, N., Takayama, K., Maitani, Y. Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture. *Int. J. Pharm.* **258** (2003) 45.

**Silvander**, M., Bergstrand, N., Edwards, K. Linkage identity is a major factor in determining the effect of PEG-ylated surfactants on permeability of phosphatidylcholine liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **126** (2003) 77.

**Simonetti,** O., Ferretti, G. Offidani, A.M., Gervasi, P., Curatola, G., Bossi, G. Plasma membrane fluidity of keratinocytes of normal and psoriatic skin:a study using fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). *Arch. Dermatol. Res.* **288** (1996) 51.

**Singh**, M., Griffiths, C.E.M. The use of retinoids in the treatment of photoaging. *Dermatol. Therapy* **19** (2006) 297.

**Singh**, P., Sihorkar, V., Jaitely, V., Kanaujia, P., Vyas S.P. Pilosebaceous unit: anatomical considerations and drug delivery opportunities. *Indian J. Pharmacol.* **32** (2000) 269.

**Sinico**, C., Manconi, M., Peppi, M., Laia, F., Valentia, D., Fadda, A.M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. *J. Control. Rel.* **103** (2005) 123.

**Skoog**, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. Princípios de Análise Instrumental. 5<sup>a</sup> ed. Trad. Caracelli I. *et. al.*, Porto Alegre, Bookman (2002).

**Socaciu**, C., Lausch, C., Diehl, H.A. Carotenoids in DPPC vesicles: membrane dynamics. *Spectrochim. Acta A* **55** (1999) 2289.

**Socaciu**, C., Jessel, R., Diehl, H. A. Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem. Phys. Lipids* **106** (2000) 79.

**Somerharju**, P. Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids* **116** (2002) 57.

**Stillwell**, W., Ricketts, M., Hudson, H., Nahmias, S. Effect of retinol and retinoic acid on permeability, electrical resistance and phase transition of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **688** (1982) 653.

**Stillwell**, W., Wassall, S. Interactions of retinoids with phospholipid membranes: optimal spectroscopy. *Method Enzimol.* **189** (1990) 373.

Storm, G., Crommelin, J.A. Liposomes: quo vadis? *PSTT* 1 (1998) 19.

**Sun**, S-Y., Lotan, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Critical Rev. Oncol. Hematol.* **41** (2002) 41.

Suslick, K.S. Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects. VCH, New York (1988).

Suslick, S.K. The chemical effects of ultrasound. Scient. American 2 (1989) 80.

**Suslick**, K.S., Didenko, Y., Fang, M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., McNamara III, W.B., Mdleleni, M.M., Wong, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Phil. Trans. Roy. Soc. A* **357** (1999) 335.

**Suzuki**, K., Okumura, Y. GPI-linked proteins do not transfer spontaneously from erythrocytes to liposomes. New aspects of reorganization of the cell membrane. *Biochemistry* **39** (2000) 9477.

**Tadini** K.A., Gaspar, L.R., Campos, P.M.B.G.M. Epidermal effects of tretinoin and isotretinoin: influence of isomerism. *Pharmazie* **61** (2006) 453.

**Taghipour**, K., James, M. Efficacy and safety of long-term, low-dose isotretinoin for treatment of acne vulgaris. *Br. J. Dermat.* **155** S1 (2006) 42.

**Takemura**, T., Chihara, K., Becker, R.S., Das, P.K., Hug, G.L. Visual Pigments. 11. Spectroscopy and photophysics of retinoic acids and all-trans-methyl retinoate *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 2604.

**Taylor**, K.M.G, Morris, R.M. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochim. Acta* **248** (1995) 289.

**Taylor**, K.M.G., Craig, D.Q.M. Physical methods of study: differencial scanning calorimetry. Em: Liposome; a practical approach. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Torchilin V. e Weissing V., New York. Oxford University Press (2003) 79.

**Thielitz**, A., Krautheim, A., Gollnick, H. Update in retinoid therapy of acne. *Dermatol. Therapy* **19** (2006) 272.

**Thompson**, A.K., Haisman, D., Singh, H. Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *J. Agric.*. *Food Chem.* **54** (2006) 6390.

Thomson, A. J. Fluorescence spectra of retinyl polyenes. J. Chem. Phys. 51 (1969) 4106.

**Torchilin** V., Weissig V. Liposome - a practical approach. 2<sup>a</sup> ed. Oxford University Press, New York (2003).

**Torchilin**, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 145.

**Touitou** E., Junginger, H. E., Weiner, T., Nagai, T. and Mezei, M. Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *J. Pharm. Sci.* **83** (1994) 1189.

**Touitou**, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Rel.* **65** (2000) 403.

**Tschan**, T., Steffen, H., Supersaxo, A. Sebaceous-gland deposition of isotretinoin after topical application: an in vitro study using human facial skin. *Skin Pharmacol.* **10** (1997) 126.

**van Balen**, G.P., Martinet, C.M., Caron, G., Bouchard, G., Reist, M., Carrupt, P.-A., Fruttero, R., Gasco, A., Testa, B. Liposome/Water Lipophilicity: Methods, Information Content, and Pharmaceutical Applications. *Med. Res. Rev.* **24** (2004) 299.

van den Bergh, B.A.I., de Vries, I.S., Bouwstra, J.A. Interactions between liposomes and human stratum corneumstudied by freeze-substitution electron microscopy *Int. J. Pharm.* **167** (1998) 57.

van den Bergh, B. A. I., Vroom, J., Gerritsen, H., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: Electron microscopy and two-photon excitation microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1461** (1999) 155.

**van Kuijk-Meuwissen**, M. E. M. J., Junginger, H. E., Bouwstra, J. A. Interactions between liposomes and human skin in vitro, a focal laser scanning microscopy study. *Bioch. Biophys. Acta* **1371** (1998) 31.

Verma, D.D., Fahr, A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *J. Control. Rel.* **97** (2004) 55.

Villanova, J.C.O., Consigliere, V.O. Aspectos farmacotécnicos dos lipossomas: produção, caracterização e estabilidade. *Rer. Bras. Cien. Farm.* **36** (2000) 179.

**Vrhovnik**, K., Kristl, J., Sentjurc, M., Šmid-Korbar, J. Influence of liposome bilayer fluidity on the transport of encapsulated substance into the skin as evaluated by EPR. *Pharm. Res.* **15** (1998) 525.

Walker, R.B., Smith, E.W. The role of percutaneous enhancers. *Adv. Drug. Del. Rev.* **18** (1996) 295.

Walters, K.A. Dermatological and transdermal formulations. Marcel Dekker, New York (2002).

**Wassal**, S.R., Phelps, T.M., Albrecht, M.R., Langsfrod, C.A., Stillwell, W. Electron spin resonance study of the interaction of retinoids with a phospholipid model membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **939** (1988) 393.

**Wassall,** S., Stillwell, W. Interactions of retinoids with phospholipid membranes: electron spin resonance. *Method Enzimol.* **189** (1990) 383.

Wen A.H., Choi, M.K., Kim, D.D. Formulation of liposome for topical delivery of arbutin. *Arch. Pharm. Res.* **29** (2006) 1187.

**Wilkerson**, V.A. The chemistry of human epidermis ii. the isoelectric points of the stratum corneum, hair, and nails as determined by electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **112** (1935) 329.

**Williams**, A.C. Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice. Pharmaceutical Press, London (2003).

www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html. Acesso 06/01/2007.

**Yamamoto**, H., Liljestrand, H.M. Partitioning of selected estrogenic compounds between synthetic membrane vesicles and water: effects of lipid components. *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 1139.

**Yarosh**, B.D. Liposomes in investigative dermatology. *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.* **17** (2001) 203.

**Yokouchi,** Y., Tsunoda, T., Imura, T., Yamauchi, H., Yokoyama, S., Sakai, H., Abe, M. Effect of adsorption of bovine serum albumin on lipossomal membrane characteristics. *Colloids. Surf. B* **90** (2001) 157.

**Zatz**, J.L. Scratching the surface: rationale and approaches to skin permeation. Em: Skin Permeation, Fundamentals and Applications. Ed. Zatz J.L. Allured Publishing Cop., Wheaton (1993) 11.

**Zellmer**, S., Pfeil, W., Lasch, J., Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* **1237** (1995) 176.

**Zhang**, H.W., Zhang, L., Sun, X., Zhang, Z.R. Successful transfection of hepatoma cells after encapsulation of plasmid DNA into negatively charged liposomes *Biotech. Bioeng.* **96** (2007) 118.

**Zouboulis**, C.C. Isotretinoin Revisited: Pluripotent Effects on Human Sebaceous Gland Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126** (2006) 2154.

## 8 ANEXO









OE = unidades de óxido de etileno