

# **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas unilamelares e microcapsulas de colágeno para a encapsulação da isotretinoína.**

**CASTRO, Núbia Cristiana<sup>1</sup>; LIMA, Eliana Martins<sup>2</sup>**

Palavras chave: Lipossoma, microesferas, isotretinoína.

## **1- INTRODUÇÃO (justificativa e objetivo)**

O estudo de sistemas nanocarreadores de fármacos tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os sistemas transportadores de fármacos tem se destacado as microparticulas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanoparticulas). Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização dos fármacos anticancerígenos (Puisseux et al, 1994; Yoo et al, 2000), principalmente através da administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico. Lipossomas tem sido utilizados como potenciais transportadores de fármacos em vez das formas de dosagens convencionais devido a vantagens únicas que incluem habilidade de proteção de degradação dos fármacos e o seu direcionamento para o sitio de ação, reduzindo assim a toxicidade e efeitos colaterais (Kinght, 1981). Como transportadoras de fármacos, as microesferas tem vantagens de liberação controlada ou prolongada, transporte passivo ou ativo para tecidos específicos e outras, as quais reduzirão notavelmente os efeitos colaterais do fármaco e aumentarão sua biodisponibilidade. Devido as vantagens desses sistemas transportadores pretende-se obter sistemas carreadores da isotretinoína que, além de atuarem no transporte de fármacos como sistemas de veiculação ao organismo, também venham a contribuir com a estabilidade deste fármaco.

## **2- METODOLOGIA**

### 2.1 Preparação dos lipossomas

Amostras de lipossomas foram preparadas empregando as metodologias de hidratação do filme lipídico (HFL). Na preparação dos lipossomas foram utilizados: (a) fosfatidilcolina na concentração de 10 mM, (b) fosfatidilcolina 10 mM e isotretinoína 2mg, (c) fosfatidilcolina na concentração de 10 mM e colesterol na concentração de 2 mM, (d) fosfatidilcolina na concentração de 10mM, colesterol na concentração de 2 mM e isotretinoína 2 mg. Lipossomas obtidos pelo método HFL foram preparados da seguinte maneira: a fase orgânica foi colocada em um balão de fundo redondo, no qual se formou um filme por evaporação do clorofórmio induzida por atmosfera de N<sub>2</sub>. O filme foi hidratado com a fase aquosa (tampão IPB - *Isotonic Palitzsch Buffer*) e levado ao agitador tipo vórtex, após 10 minutos de sonicação em processador ultrassônico (Misonix 2020) resultou em uma preparação semitransparente contendo vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de tamanho uniforme. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 05 minutos. Nas preparações dos lipossomas que continham isotretinoína todos os procedimentos anteriores foram realizados na ausência de luz.

### 2.2 Medida do diâmetro dos lipossomas

A determinação do tamanho das vesículas foi realizada empregando a técnica de espalhamento de luz em equipamento ZetaSizer Nano (Malvern, UK), técnica não invasiva, que permite a análise da distribuição e medida do tamanho das vesículas formadas neste processo de interação. Uma alíquota (1,5 mL) de cada amostra foi introduzida na cubeta do equipamento e analisada a 25°C. Em cada leitura, foi obtido o Z-average, que corresponde ao diâmetro médio aproximado dos lipossomas.

### 2.3 Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas

#### 2.3.1 Separação do fármaco livre

Lipossomas contendo o fármaco encapsulado foram separados da fração de fármaco livre por

cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Um mililitro das preparações de lipossomas foi aplicado sobre a coluna de sephadex, correspondente a 1,4% do volume da coluna. Após a aplicação, frações de 2,5 ml foram coletadas e cada fração foi submetida à leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50, Varian) em 342 nm para acompanhamento da eluição dos lipossomas e do fármaco. As frações eluídas contendo lipossomas foram combinadas e os lipossomas foram posteriormente rompidos para quantificar o fármaco encapsulado.

### 2.3.2 Cálculo da eficiência de encapsulação

A quantificação da isotretinoína encapsulada foi efetuada pela técnica de espectrofotometria, curva de calibração etanol ( $Abs = 139,15074 * Concentração + 0,07417$ , coeficiente de correlação ( $R$ ) = 0,99871). Um mL da fração encapsulada foi rompido com 2 mL de etanol e feita a leitura no espectrofotômetro, curva de calibração etanol, 342 nm. A Eficiência de Encapsulação (EC) foi calculada tanto em função da quantidade de isotretinoína originalmente adicionada na preparação dos lipossomas, quanto como razão da quantidade de fármaco encapsulado por mg de fosfatidilcolina.

## 2.4 Teste de solubilidade da isotretinoína

### 2.4.1 Teste de Solubilidade da Isotretinoína em IPB

Em 2 mL de IPB foi acrescentada isotretinoína até a formação de precipitado, posteriormente levado em banho de ultrassom por 2 horas, em seguida centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Após a remoção do fármaco precipitado, foi feita a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro e obtida a concentração através de uma curva de calibração da isotretinoína em IPB ( $Abs = 8,29893 * Concentração + 0,03462$ , coeficiente de correlação ( $R$ ) = 0,99931).

### 2.4.2 Teste de solubilidade da Isotretinoína em NaCl 0,9%

Preparada um solução de NaCl a 0,9%, colocou-se num tubo de ensaio 2 mL, foi acrescentada isotretinoína até a formação de precipitado, posteriormente levado em banho de ultrassom por 2hs, em seguida centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Após a remoção do fármaco precipitado foi feita a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro e obtida a concentração através de uma curva de calibração da isotretinoína em NaCl 0,9% ( $Abs = 3,38710 * Concentração + 0,00794$ ;  $R = 0,99969$ ).

## 2.5 Teste de liberação in vitro

A avaliação da liberação da isotretinoína encapsulada foi realizada em um sistema de dissolução adaptado nas seguintes condições: volume de meio de dissolução de 1000 mL de IPB, temperatura 37° C e agitação constante. Foi utilizada membrana de diálise (acetato de celulose) em forma de tubo, dentro do qual foram colocados 7mL da preparação de lipossomas passados pela SEC. O tubo de diálise foi mergulhado no meio de dissolução e a liberação da isotretinoína foi avaliada em intervalos de 30 minutos durante 3 horas. A cada 30 minutos, foi coletada amostra de 1mL do interior da membrana de celulose, posteriormente os lipossomas foram rompidos com 2 mL de etanol e a leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro.

## 2.6 Preparação das microesferas

As microesferas foram preparadas com 3g de gelatina misturadas a 10 mL de água na temperatura de 60° C, posteriormente a solução gelatinosa foi gotejada em 20 mL de óleo mineral que estava a 60°C e com agitação constante. Após 10 minutos, e ainda em agitação a emulsão óleo/água foi submetida ao resfriamento por 10'. Logo em seguida foram adicionados 20 mL de acetona, mantendo a agitação por mais 15', então as microesferas foram isoladas da solução por filtração e posteriormente a remoção do óleo residual foi conseguida através de lavagens consecutivas com acetona.

### 2.6.1 Medida do diâmetro das microesferas

A medida do diâmetro das microesferas foi efetuada empregando-se um paquímetro digital, quando sua estrutura apresentava estabilidade, e já tinha atingido sua conformação padrão.

### 2.6.2 Medida da dureza das microesferas

Para medir a dureza das microesferas foi utilizado durômetro digital com acionamento manual (Nova ética).

## 2.8 Desenvolvimento da metodologia analítica por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC) para quantificação da isotretinoína encapsulada nas microesferas

A análise cromatográfica em GC foi realizada em equipamento Varian modelo 3900 com injetor automático e detector por ionização em chama (FID). Foi utilizada coluna VF-1ms (100% dimetil polisiloxano) de 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme de revestimento interno. Os parâmetros utilizados foram: hidrogênio como gás de arraste, razão de split 1:5, programação do forno da coluna de 90°C como temperatura inicial por 2 minutos, razão de aquecimento de 10°C/min até temperatura final de 200°C permanecendo por 3 minutos, temperatura do injetor de 200°C e temperatura do detector de 300°C.

## 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Obtenção dos lipossomas

**Tabela 1.** Parâmetros de tamanho das vesículas.

Constituição do lipossoma	Diâmetro médio (nm)	Desvio Padrão
PC	106,66	2,516
PC + CHOL	118,33	1,527
PC + Isotretinoína	75,38	0,311
PC + CHOL + Isotretinoína	77,66	2,081

Na análise de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina e colesterol, observou-se, assim como demonstrado por Cócera *et al* (2003), um pequeno aumento do diâmetro das vesículas em relação aos constituídos com somente PC, devido a melhores características de empacotamento da bicamada promovido pelo colesterol. O diâmetro dos lipossomas contendo a isotretinoína encapsulada permitiu observar que, na presença do fármaco, o diâmetro médio das vesículas foi reduzido, passando para 75,38 nm com DP 0,311. As características físico-químicas da isotretinoína direcionam sua localização preferencialmente na fração lipofílica dos lipossomas. A inserção deste fármaco na bicamada lipídica pode provocar alteração no ângulo de curvatura da bicamada, levando à conseqüente redução do tamanho das vesículas. De maneira semelhante, os lipossomas de PC e CHOL com isotretinoína apresentaram redução do diâmetro quando comparados aos lipossomas somente de fosfatidilcolina com colesterol, sendo o diâmetro médio de 77,666 nm com DP 2,081.

### 3.2. Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína (ISO<sub>E</sub>) em lipossomas

Foram feitas leituras no espectrofotômetro com absorbância em 342, as frações com a isotretinoína encapsulada passada pela SEC, foram as 7,8 e 9. Para proceder ao doseamento do fármaco encapsulado, as frações foram reunidas e 1mL das vesículas foram rompidas empregando-se etanol na proporção de 1:2. A eficiência de encapsulação foi calculada para as amostras de lipossomas preparadas com concentração determinada de 2mg/mL de isotretinoína. Nos lipossomas preparados com 2 mg de isotretinoína, comparou-se a diferença entre os lipossomas preparados com PC e com PC mais CHOL. Não foram observadas diferenças significativas, sendo a eficiência de encapsulação do lipossoma preparado com 10 mM de fosfatidilcolina de 1,286mg em 8 ml e o lipossoma formado de 10mM de fosfatidilcolina com 2mM de CHOL de 1,164 mg, também em 8 mL.

### 3.4 Teste de solubilidade da isotretinoína em IPB e NaCl

Através da análise em espectrofotômetro e das curvas de calibração da ISO<sub>E</sub> em IPB e NaCl, a isotretinoína apresentou uma solubilidade média de 0,401 mg/mL em IPB (DP 0,001) e 1 mg/mL em NaCl (DP 0,012).

### 3.5 Estudo de liberação in vitro

No estudo realizado empregando como meio de dissolução o próprio tampão constituinte da preparação dos lipossomas (IPB), não foi observada liberação do fármaco, o que pode ser decorrente da isotonicidade do tampão. Brisaert *et al* (2001) também identificaram esta situação no teste de liberação in vitro da tretinoína encapsulada em lipossomas. Mesmo após três horas

de ensaio, a concentração de isotretinoína encapsulada nos lipossomas permaneceu constante. Estes resultados reafirmam o alto grau de interação da isotretinoína com os fosfolipídeos da bicamada lipídica, o que dificulta sua liberação. A solubilidade da isotretinoína é outro fator que deve ser ressaltado, uma vez que por ser insolúvel em água e apresentar baixa solubilidade tanto no tampão, o meio de dissolução não contribui para que o fármaco deixe o ambiente lipídico. Este teste também é indicativo de que lipossomas contendo isotretinoína encapsulada representam uma formulação de relativa estabilidade do ponto de vista da manutenção do material encapsulado, uma vez que foi demonstrado que não ocorre vazamento da isotretinoína pra o meio externo da formulação, demonstrando eficiência na retenção do fármaco.

### 3.6 Obtenção de microesferas

As microesferas de gelatina preparadas apresentaram diâmetro médio de 0,65 mm (DP = 0,11). Com a utilização do durômetro não foi possível medir a dureza das microesferas, pois sua elasticidade levou a mudanças na sua conformação de esférica para achatada. As microesferas obtidas apresentam uma excelente morfologia e homogeneidade, confirmando a sua possível utilização como sistemas carreadores de fármacos.

## 4-CONCLUSÃO / COMENTÁRIOS FINAIS

- A cromatografia de exclusão demonstrou ser uma técnica simples e eficaz na separação das frações contendo o fármaco encapsulado e livre, possibilitando seu emprego em análises quantitativas posteriores, mesmo com a diluição promovida na amostra..
- A localização da isotretinoína na bicamada lipídica, provoca aumento do ângulo de curvatura da membrana lipossomal. Diminuindo o diâmetro do lipossomas com a isotretinoína encapsulada.
- A eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas (utilizando-se 10 mM de fosfatidilcolina) foi de aproximadamente 1,2 mg do fármaco, originando uma preparação com grandes potenciais para aplicação terapêutica.
- Obtenção de microesferas de gelatina com diâmetro médio de 0,65 mm.

## 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHIJS, V.; PLAIZIER – VERCAMMEN, J. *Lipossomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation*. Int. J. Pharma. and Biomedical Analysis, v. 26, p. 909 – 917, 2001

CÓCERA, M.; LÓPEZ, O.; CODERCH, L.; PARRA. J.L.; MAZA, A. *Permeability investigations of phospholipid liposomes by adding cholesterol*. Colloid and Surfaces. Amsterdam, v. 221, p. 9 - 17, 2003

KINGHT, C. G. *Lipossomes from physical structure to therapeutic applications*. Elsevier, Amsterdam, 1981.

PUISEX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P. ; DEVISSAGUET, J. P. ; DUBERT, C. ; FATTAL, E. ; FESSI, H. ; VAUTHEIR, C. ; BENITA, S. *Em polimeric biomaterials* : Dimitriu, S., ed; Marcel Dekker; New York, 1994, cap. 16.

YOO, H. S.; LEE, K.H.; OH J, E.; PARK, T. G. *In vitro and in vivo anti – tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin – PLGA conjugates*. J, Controlled Release, v. 68, p. 419 – 431, 2000.

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Faculdade de Farmácia - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, [nubiaccastro@yahoo.com.br](mailto:nubiaccastro@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Orientador/ Faculdade de Farmácia/UFG, [emlima@farmacia.ufg.br](mailto:emlima@farmacia.ufg.br)