

Danielle Guimarães Almeida Diniz

Obtenção, caracterização e avaliação da
citotoxicidade sobre células neoplásicas da
isotretinoína encapsulada em lipossomas e
nanocápsulas poliméricas

Orientadora:
Profa Dra. Eliana Martins Lima.

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília (Convênio
UnB-UFG-UFMS) para obtenção do
Título de Doutor.

Brasília
2008

Dedico este trabalho a um grande herói,

Meu PAI.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelos momentos de alegria, mas principalmente pelos momentos de tristeza, pois tudo posso naquele que me fortalece.

Ao meu PAI, minha MÃE e a minha madrinha Nairlete, pois eles me ensinaram a ser quem sou.

Ao meu esposo Henrique e a toda minha família, pois foram compreensivos nas minhas ausências e fortes nos meus momentos de fraqueza.

A mãe, amiga e orientadora, Dra Eliana Martins Lima, pelo apoio incondicional durante nossa jornada.

A profa Dra. Marize Campos Valadares, pela co-orientação, amizade e respeito e a toda sua equipe.

As amigas Fernanda e Dione pelo companheirismo e dedicação.

As profas Clévia e Eula, diretora e vice-diretora da faculdade de farmácia, pelo apoio e compreensão.

As amigas Karini, Carina, Luciana, Ieda, Fabricia, Patrícia e Érica pelo apoio.

A minha aluna de PIVIC, Fernanda Steger, pelo exemplo de dedicação.

E a toda equipe do laboratório de tecnologia farmacêutica da UFG.

Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade ou pela sorte, mas nunca sem trabalho.

Detoeuf

RESUMO

Os retinóides são compostos derivados da vitamina A capazes de regular o crescimento e diferenciação celular. O uso dos retinóides para o tratamento do câncer tem progredido, particularmente para os casos de leucemia, neuroblastoma, cânceres de próstata e pulmão. O uso terapêutico dos retinóides é limitado devido às graves reações adversas apresentadas e a baixa solubilidade destes compostos. A encapsulação dos retinóides em nanocarreadores, como lipossomas e nanocápsulas, pode modificar seu perfil de farmacocinética, aumentar o aporte celular e melhorar a estabilidade destes compostos. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seco e caracterizados quanto à sua estabilidade por Alves em 2005. As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As nanocápsulas de PLA foram caracterizadas quanto à estabilidade por Teixeira em 2007. O diâmetro médio dos nanocarreadores foi de 90, 169 e 170 nm para os lipossomas, nanocápsulas de PLGA e nanocápsulas de PLA respectivamente. As nanocápsulas exibiram maior eficiência de encapsulação para a isotretinoína. A citotoxicidade do fármaco, quando encapsulado, foi dose e tempo dependentes sendo possível observar redução nos valores do IC_{50} . Na avaliação da citotoxicidade tanto pelo método de azul de trypan quanto pelo MTT, foi possível observar que a nanoencapsulação promoveu aumento na atividade antiproliferativa da isotretinoína tanto em células K562 quanto em células de pacientes, quando comparada a sua forma não encapsulada. Já com 24 horas de incubação, foi observado um aumento expressivo no índice terapêutico do fármaco encapsulado quando incubado com células de pacientes. No presente trabalho também foi observada a presença de tretinoína e isotretinoína tanto dentro das células K562 quanto no meio de cultura, demonstrando a isomerização destes compostos durante a incubação. Nos ensaios de biodistribuição tissular foi possível observar que as nanocápsulas de PLGA foram rapidamente seqüestradas pelo fígado e pulmão.

Palavras-chave: Isotretinoína, lipossomas, nanocápsulas, leucemia.

ABSTRACT

Retinoic acid (RA) is the main Vitamin A related compound capable of regulating cellular differentiation and growth. The use of retinoids for the treatment of cancer has progressed, particularly for leukemia, neuroblastoma, prostate and lung tumors. Therapeutic uses of retinoids are limited due to severe adverse reactions, and also their very low aqueous solubility. Encapsulating retinoids in colloidal carriers, such as liposome and nanocapsules, can modify their pharmacokinetic profile, increase the drug uptake into neoplastic cells and also improve the stability of these compounds. Preparation methods of liposomes include the hydration of lipidic film followed by sonication. After preparation, the vesicles are characterized by size, chemical constitution, and amount of encapsulated material for Alves, 2005. Nanocapsules were prepared by solvent displacement method. After preparation, PLA nanocapsules are characterized by size, chemical constitution, and amount of encapsulated material for Teixeira, 2007. The average diameter of the nanocarriers was 90, 167 and 170 nm for liposomes, PLGA and PLA nanocapsules respectively. Nanocapsules exhibited the highest encapsulation efficiency for 13cis RA. Cytotoxicity of the drug inside the nanocarrier systems was dose and time dependent and also a marked reduction of IC_{50} for cultured cells was observed. Nanoencapsulation was able to promote an increase in the in vitro therapeutic index of 13cisRA against the proliferation of both K562 and patient myeloid leukemia cells when compared to that of free drug. With 24 hours of incubation, was noticed a significant increase in therapeutic index of encapsulated drug when incubated with patients cells. In this work it was observed the presence of tretinoin and isotretinoin both within the K562 cells as the growth medium, demonstrating the isomerization of these compounds during incubation. In tests of tissue biodistribution it was possible to see that the nanocapsules of PLGA were quickly kidnapped by the liver and lung.

Keywords: Isotretinoin, liposome, nanocapsule, leukemia.

Lista de abreviaturas e siglas

Abs	- Absorbância
AP1	-Fator de transcrição da proteína 1
CHOL	- Colesterol
EC	- Eficiência de encapsulação
FDA	- Food and Drug Administration
FE	- Fração encapsulada
HFL	- Hidratação do filme lipídico
HPLC	-cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IFN- α	- Interferon- α -2a
Ig	- Imunoglobulina
IPB	- <i>Isotonic Palitzsch Buffer</i>
ISO _A	- Isotretinoína adicionada à preparação
ISO _E	- Isotretinoína encapsulada
LC-MS-MS	-cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria
LMC	- Leucemia mieloide crônica
LUV	- Vesículas unilamelares grandes (<i>Large unilamellar vesicles</i>)
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MLV	- Vesículas multilamelares (<i>Multilamellar vesicles</i>)
NC	- Nanocápsulas
NC-ISO	- Nanocápsulas de isotretinoína
PC	- Fosfatidilcolina
PDI	- Índice de Polidispersibilidade
PLA	- Poli ácido (D,L- Lático)
PLGA	- Poli ácido (D,L- Lático)-Co-Glicolideo
RES	- Sistema retículo endotelial
SPE	- Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
SUV	- Vesículas unilamelares pequenas (<i>Small unilamellar vesicles</i>)

TPF	- Tampão Fosfato
ULV	- Vesículas unilamelares (<i>Unilamellar vesicles</i>)
UV	- Ultravioleta
VIS	- Visível
α T	- alfa-Tocoferol

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Diferentes nanocarreadores, suas aplicações, vantagens e limitações.....	5
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do PLGA para a fabricação das nanocápsulas.....	13
Tabela 3. Especificações e características físico-químicas do Poloxamer 188®(polietileno-propilenoglicol copolímero).....	14
Tabela 4. Estudos de estabilidade de dispersões de nanopartícula poliméricas em função do tempo de armazenamento.....	18
Tabela 5: Fármacos associados à nanopartículas poliméricas submetidos à avaliação clínica.....	20
Tabela 6: Fármacos associados a lipossomas aprovados para aplicação clínica ou submetidos à avaliação clínica.....	34
Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia Líquida de alta eficiência.....	49
Tabela 8. Diferentes condições de extração do analito a partir da matriz polimérica do cartucho de extração.....	51
Tabela 9. Formulações de nanocápsulas com PLGA 85:15 contendo isotretinoína (NC-ISO) obtidas com diferentes diâmetros das gotículas durante a fase de preparação da emulsão.....	56
Tabela 10. Precisão e Exatidão obtidas para a isotretinoína utilizando método cromatográfico.....	70
Tabela 11. Precisão Intermediária e Exatidão obtidas para a isotretinoína utilizando método cromatográfico.....	70
Tabela 12. Precisão e Exatidão obtidas para a tretinoína obtidas utilizando método cromatográfico.....	71
Tabela 13. Precisão Intermediária e Exatidão obtidas para a tretinoína utilizando método cromatográfico.....	71
Tabela 14. Limite de quantificação e detecção obtidos para Isotretinoína utilizando método cromatográfico.....	72
Tabela 15. Limite de quantificação e detecção obtidos para Tretinoína utilizando método cromatográfico.....	72
Tabela 16. Porcentagem de recuperação da isotretinoína, das diferentes condições de extração, a partir da matriz polimérica do cartucho de extração em fase sólida.....	75

Tabela 17. Processo de validação da extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de fígado, pulmão, baço e sangue de camundongo.....	76
Tabela 18. Processo de validação da extração em fase sólida da tretinoína a partir de amostras de fígado, pulmão, baço e sangue de camundongo.....	77
Tabela 19. Processo de validação da extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de sobrenadante e botão celular de células K562.....	78
Tabela 20. Processo de validação da extração em fase sólida da tretinoína a partir de amostras de sobrenadante e botão celular de células K562.....	78
Tabela 21. Efeito do Poloxamer sobre a formulação de nanocápsulas com incorporação da isotretinoína.....	79
Tabela 22. Estabilidade acelerada de nanocápsulas contendo isotretinoína.....	81
Tabela 23. Tamanho e PDI para NC-ISO 4, durante 9 meses de avaliação sob refrigeração a 4°C.....	84
Tabela 24. Estabilidade segundo critérios macro e microscópicos durante 9 meses de avaliação sob refrigeração a 4°C da NC-ISO 1.....	85
Tabela 25. Média de tamanho e PDI obtido para as dispersões de nanopartículas obtidos entre as amostras através do gotejamento com agulha G23.....	86
Tabela 26. Eficiência de encapsulação da isotretinoína em Nanocápsulas de PLGA....	91
Tabela 27. Comparação entre os resultados de Eficiência de Encapsulação Absoluta (EC) das amostras obtidas com as formulações contendo de 0,5 a 1,0 mg/mL de isotretinoína.....	91
Tabela 28. Eficiência de encapsulação da isotretinoína em Lipossomas.....	102
Tabela 29. Efeito da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células leucêmicas eritrocíticas K 562.....	108
Tabela 30. Efeito da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células leucêmicas de pacientes com LMC.....	116
Tabela 31. Efeito da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células K562 segundo MTT.....	120

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Diferentes tipos de carreadores.....	4
Figura 2: Número de registros internacionais de patentes depositadas via PCT envolvendo produção e utilização de nanocápsulas ou nanoesferas.....	20
Figura 3: Formas de interação entre lipossomas e células do organismo.....	23
Figura4: Fosfatidilcolina: fórmula estrutural, arranjo espacial e representações esquemáticas.....	24
Figura 5: Colesterol na membrana e sua interação com um fosfolípídeo.....	25
Figura 6: Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de bicamadas..	25
Figura 7: Agregados de lipídeos anfifílicos que se formam em presença de água. (a) Em micelas esféricas, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos estão protegidas no núcleo da esfera, onde não há água. (b) Em uma bicamada todas as cadeias laterais estão protegidas da interação com a água, com exceção daquelas que se encontram nas extremidades. (c) Quando uma bicamada bidimensional extensa se curva sobre si mesma, forma-se um lipossoma, uma vesícula fechada, tridimensional, que encerra uma cavidade aquosa.....	29
Figura 8: Hidratação do filme lipídico: O filme lipídico seco contendo o fármaco lipossolúvel é hidratado com uma solução aquosa do fármaco hidrossolúvel (A). Sob agitação o filme lipídico se desprende das paredes do balão (B) e lipossomas multilamelares são formados (C). Um tratamento posterior, por ultra-som ou extrusão, leva à obtenção de vesículas unilamelares (D). As moléculas de fármaco não encapsulado podem ser removidas por diálise, filtração em gel ou ultracentrifugação (E).....	31
Figura 9: Número de registros internacionais de patentes depositadas via PCT envolvendo produção e utilização de lipossomas.....	33
Figura10 : Estrutura molecular de retinóides.....	36
Figura11: Taxa de recuperação da isotretinoína de matrizes biológicas.....	53
Figura 12: Método de preparo das nanocápsulas de PLA e PLGA.....	55
Figura 13: Zeta Sizer Nano e autotitulado MPT-2.....	62
Figura 14: Varredura do espectro de absorção da isotretinoína por UV-VIS.....	66
Figura 15: Varredura do espectro de absorção da isotretinoína e dos componentes da formulação das nanocápsulas, como poloxamer e o óleo de soja, por espectrofotometria.....	66

Figura16: Cromatograma da isotretinoína e tretinoína obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	67
Figura 17: Curva de calibração por HPLC-UV para Isotretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	68
Figura 18: Curva de calibração por HPLC-UV para Tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	69
Figura 19: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 0,9 mL/min forno na temperatura de 50 ⁰ C.....	73
Figura 20: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min e forno na temperatura de 40 ⁰ C.....	74
Figura 21: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H ₂ O na razão de 80:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min e forno na temperatura de 50 ⁰ C.....	74
Figura 22: Distribuição de tamanho das nanocápsulas na presença (vermelho) e ausência (verde) do fármaco encapsulado.....	80
Figura 23: Fotomicrografia da dispersão de nanocápsulas demonstrando cristais de isotretinoína.....	81
Figura 24: Distribuição de tamanho da dispersão NC-ISO 1 durante ciclo de gelo e degelo, após a preparação (vermelho), 10 ciclos (verde), 15 ciclos (azul), 30 ciclos (preto).....	82
Figura 25: Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (verde), sobrenadante (azul) e precipitado ressuspensão (vermelho).....	83
Figura 26: Distribuição de tamanho da NC-ISO 1 antes e pós-centrifugação.....	84
Figura 27: Distribuição de tamanho da NC-ISO 1 ao longo de 9 meses armazenados em geladeira a 4°C.....	85
Figura28: Distribuição média de tamanho de nanocápsulas submetidas a rotaevaporação a – 500 ATM (10 min), – 600 ATM (110 min) e –600 ATM (120 min)...	86
Figura29: Distribuição de tamanho da preparação NC-ISO 1 antes da rotaevaporação (ainda no estado de nanoemulsão) e pós-rotaevaporação	87

Figura 30: Perfil de eluição das nanocápsulas contendo isotretinoína em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 360 nm.....	89
Figura 31: Perfil de fotodegradação da isotretinoína livre e encapsulada em nanocápsulas de PLGA.....	92
Figura 32: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína encapsulada.....	94
Figura 33: Compostos observados por cromatografia líquida de alta eficiência durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína encapsulada.....	93
Figura 34: Cromatograma de amostra de nanocápsula de PLGA, antes e depois de 3 horas de exposição a luz UVA (365 nm), obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	94
Figura 35: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína livre.....	95
Figura 36: Cromatograma de amostra de isotretinoína na sua forma livre, antes e depois de 3 horas de exposição a luz UVA (365 nm), obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H ₂ O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	95
Figura 37: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína livre e nanoencapsulada.....	96
Figura 38: Cinética de liberação (%) <i>in vitro</i> da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA, ao longo do tempo (0 – 24 horas).....	98
Figura 39: Perfil de eluição dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 410 nm.....	99
Figura 40: Perfil de eluição das frações de lipossomas contendo a isotretinoína encapsulada (8-13) e livre (17 a 25).....	100
Figura 41: Distribuição de tamanho de lipossomas por espalhamento de luz antes e após a cromatografia de exclusão.....	101
Figura 42: Cinética de liberação (%) <i>in vitro</i> da isotretinoína encapsulada em Lipossoma, ao longo do tempo (0 – 24 horas).....	104
Figura 43: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 24 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	105

Figura 44: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 48 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	105
Figura 45: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	106
Figura 46: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	106
Figura 47: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em células k 562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	107
Figura 48: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	107
Figura 49: Porcentagem de Isotretinoína internalizada em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.....	110
Figura 50: Porcentagem de isotretinoína e tretinoína presentes em K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.....	111
Figura 51: Porcentagem de isotretinoína e tretinoína presentes no meio de cultivo celular após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.....	111
Figura 52: Cromatograma da isotretinoína tempo zero, após 24 e 48 horas de incubação com células K562 em meio RPMI com 10% SBF, utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H ₂ O na razão de 80:20, com fluxo de 1 mL/min e forno a temperatura de 50 ⁰ C.....	112
Figura 53: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de leucoférese após 24 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	114
Figura 54: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de leucoférese após 48 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	115
Figura 55: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de	

leucoférese após 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	115
Figura 56: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas, em células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	117
Figura 57: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA, em células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	118
Figura 58: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA, em células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.....	119
Figura 59: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas em células k 562 com 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de redução do tretazolium.....	121
Figura 60: Biodistribuição da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em fígado de camundongo durante 24 horas.....	123
Figura 61: Biodistribuição da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em pulmão de camundongo durante 24 horas.....	123

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS.....	3
1.1. Nanocarreadores.....	3
1.1.1. Micro /nanopartículas Poliméricas.....	6
1.1.1.1. Métodos de obtenção de sistemas micro ou nanoencapsulados.....	7
1.1.1.1.2. Métodos de obtenção de sistemas micro ou nanoencapsulados.....	9
1.1.1.2. Componentes da Formulação.....	10
1.1.1.2.1. Polímeros.....	10
1.1.1.2.2. Fosfatidilcolina.....	15
1.1.1.2.3. Óleo vegetal biocompatível: óleo de soja.....	16
1.1.1.3. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados.....	16
1.1.1.3.1. Avaliação morfológica e distribuição de tamanho da partícula.....	16
1.1.1.3.2. Potencial Zeta (ζ).....	17
1.1.1.3.3. pH da dispersão de nanopartículas.....	18
1.1.1.3.4. Estabilidade química, físico-química, biológica e microbiológica.....	18
1.1.1.4 Aplicações.....	20
1.1.2. Lipossomas.....	22
1.1.2.1. Composição dos Lipossomas.....	25
1.1.2.2. Classificação dos Lipossomas.....	27
1.1.2.3. Estabilidade dos Lipossomas.....	27
1.1.2.3.1. Estabilidade Química.....	28
1.1.2.3.2. Estabilidade Física.....	29
1.1.2.3.3. Estabilidade Biológica.....	29
1.1.2.4. Metodologias empregadas na caracterização e preparo de lipossomas.....	31
1.1.2.4.1. Preparo dos Lipossomas.....	31
1.1.2.4.1.1. Hidratação do filme lipídico (HFL)	32
1.1.2.4.2. Determinação do diâmetro dos lipossomas.....	33
1.1.2.4.2.1. Espalhamento de luz difusa.....	33
1.1.2.4.3. Separação do fármaco encapsulado.....	34
1.1.2.5 Aplicações.....	35
1.2. Retinóides.....	36
1.2.1. Mecanismo de ação farmacológica.....	36
1.2.2. Câncer e quimioprevenção.....	38
1.2.2.1. Leucemias.....	39
1.2.2.1.1. Leucemia Mielóide Crônica.....	39
1.2.2.1.2. Tratamento Convencional da LMC.....	40
1.2.3. Mecanismo de resistência aos retinóides.....	40
1.2.4. Estabilidade.....	41
1.2.5. Isotretinoína.....	41
1.2.5.1. Posologia.....	43

1.2.5.2. Farmacocinética.....	43
1.2.5.3. Efeitos Adversos.....	44
1.2.6. Retinóides e nanocarreadores de fármacos.....	45
2. OBJETIVOS.....	46
3.MATERIAIS MÉTODOS.....	47
3.1. MATERIAIS.....	47
3.1.1. Substâncias e Reagentes.....	47
3.1.2. Equipamentos e Utensílios diversos.....	47
3.2. MÉTODOS.....	48
3.2.1. Determinação dos parâmetros analíticos para a isotretinoína.....	48
3.2.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da isotretinoína em espectrofotômetro.....	48
3.2.1.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da isotretinoína.....	48
3.2.1.2.1. Obtenção da curva de calibração para a isotretinoína e tretinoína.....	49
3.2.1.2.2. Verificação da Precisão e Exatidão.....	50
3.2.1.2.3. Verificação dos Limites de Quantificação e Detecção.....	50
3.2.1.2.4. Verificação da Robustez.....	51
3.2.1.3 Validação de metodologia de extração em fase sólida (SPE) para determinação da isotretinoína.....	51
3.2.1.3.1.Extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de fígado, baço, pulmão e sangue.....	52
3.2.1.3.2. Extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de células K562.....	54
3.3. Preparo das nanocápsulas.....	54
3.3.1.Estudo de desenvolvimento da formulação.....	55
3.3.2 Estabilidade físico-química (envelhecimento acelerado das dispersões de nanocápsulas).....	57
3.3.2.1. Resistência à centrifugação.....	57
3.3.2.2 Resistência a ciclos de congelamento e descongelamento.....	57
3.3.3. Estabilidade físico-química (envelhecimento em longo prazo das dispersões de nanocápsulas).....	57
3.3.3.1. Aspecto macroscópico.....	57
3.3.3.2. Estudo da variação do pH.....	58
3.3.3.3. Diâmetro médio da partícula e PDI.....	58
3.3.4. Tamanho médio da partícula e Índice de polidispersibilidade (PDI).....	58
3.3.5. Fotoestabilidade.....	58
3.4. Preparo dos lipossomas.....	59
3.5.Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas e nanocápsulas.....	60
3.5.1. Separação do fármaco livre.....	60
3.5.2. Cálculo da eficiência de encapsulação.....	61
3.6. Medida do diâmetro dos lipossomas e nanocápsulas.....	61
3.6.1. Espalhamento de luz (Light Scattering).....	61
3.7. Perfil de liberação dos lipossomas e nanocápsulas.....	62
3.8. Potencial antitumoral.....	63
3.8.1. Ensaio <i>in vitro</i>	63
3.8.1.1. Linhagens celulares.....	63
3.8.1.2. Avaliação da citotoxicidade através do método de exclusão por azul.....	63

de trypan.....	
3.8.1.3. Avaliação da citotoxicidade através do método de redução do tetrazolium (MTT).....	63
3.9 Ensaio <i>in vivo</i>	64
3.9.1 Animais.....	64
3.9.2. Avaliação da biodistribuição tissular da isotretinoína nanoencapsulada.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. Parâmetros analíticos para a isotretinoína.....	66
4.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da isotretinoína em espectrofotômetro.....	66
4.1.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da isotretinoína e tretinoína.....	67
4.1.2.1. Curva de calibração para a isotretinoína e tretinoína.....	68
4.1.2.2. Verificação da precisão e exatidão.....	69
4.1.2.2.1. Isotretinoína.....	70
4.1.2.2.2. Tretinoína.....	
4.1.2.3. Verificação dos limites de quantificação e detecção para isotretinoína e tretinoína.....	71
4.1.2.3.1. Limites de quantificação e detecção para a isotretinoína e tretinoína.....	72
4.1.2.4. Verificação da robustez.....	73
4.1.3. Desenvolvimento e validação de metodologia de extração em fase sólida para determinação da isotretinoína em fígado, pulmão, baço e sangue...	75
4.1.4. Validação de metodologia de extração em fase sólida para determinação da isotretinoína em células K562.....	77
4.2. Preparo das nanocápsulas.....	79
4.2.1. Estudo de desenvolvimento da formulação.....	79
4.2.2. Estabilidade a longo prazo e acelerada.....	80
4.2.3. Tamanho médio das partículas e índice de polidispersão.....	85
4.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em nanocápsulas de PLGA.....	88
4.2.4.1. Separação do fármaco livre.....	88
4.2.4.2. Cálculo da quantidade de isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.....	89
4.2.5. Fotoestabilidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.....	91
4.2.6. Perfil de liberação da isotretinoína a partir de nanocápsulas de PLGA..	96
4.2.7. Nanocápsulas de D,L-PLA com incorporação da isotretinoína.....	98
4.3. Preparo dos lipossomas.....	99
4.3.1. Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas.....	99
4.3.1.1. Separação do fármaco livre.....	99
4.3.1.2. Cálculo da eficiência de encapsulação.....	101
4.3.2. Perfil de liberação da isotretinoína dos lipossomas.....	103
4.4. Potencial antitumoral.....	104
4.4.1. Ensaio <i>in vitro</i>	104
4.4.1.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão por azul de trypan em células K562	104
4.4.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão por azul de trypan em células de pacientes obtidas em procedimento de leucoféres.....	114

4.4.1.3. Avaliação da citotoxicidade em células K562 segundo MTT.....	120
4.5. Biodistribuição tissular.....	122
4.5.1. Avaliação da biodistribuição tissular, da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.....	122
5.CONCLUSÕES.....	124
6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	127

INTRODUÇÃO

Embora o câncer seja uma doença relativamente comum, nas últimas décadas tem se tornado um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano ocorrem cerca de 10 milhões de novos casos de câncer, sendo que a metade destes em países em desenvolvimento (STEWART, KLEIHUES, 2007). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou que em 2006 fossem esperados 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino. A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do país, o que fica bem evidenciado ao se observar a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram taxas mais baixas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA 2008).

Os tratamentos básicos para o câncer são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo a cirurgia e radioterapia consideradas como tratamentos locais e a quimioterapia como tratamento sistêmico, ambos podem ser usados isolados ou associados. Segundo Bonassa (2005), a quimioterapia é definida como o emprego de substâncias químicas isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas, entretanto, atua sem especificidade, não destruindo seletivamente e exclusivamente as células tumorais e conseqüentemente agride as células normais que possuem características semelhantes às tumorais. Os principais efeitos colaterais da quimioterapia são toxicidades hematológica, gastrintestinal, cardíaca, pulmonar, renal, dermatológica, disfunção reprodutiva, alterações metabólicas, reações alérgicas e anafilaxia. Embora bem estabelecida e apesar dos importantes sucessos conseguidos nos últimos anos, a quimioterapia permanece como objeto de pesquisas e investigações com o objetivo de ampliar e otimizar seus resultados e, descobrir novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal (SIKIC, 1996; MEN, *et al*, 1999; WANG, *et al*, 1999; ZANDWIJK, 2005).

A utilização de sistemas transportadores de fármacos no tratamento do câncer vem ampliando as expectativas e esforços de pesquisadores de todo o mundo (BRANNON-PEPPAS *et al*, 2004; KIM, 2007; ELSAYED, *et al*, 2007; PARK, 2007; TORCHILIN, 2007). Essa tecnologia atende a necessidade da administração de quimioterápicos com segurança e a diminuição da dose com otimização dos efeitos terapêuticos, permitindo assim, o aumento da seletividade do agente antitumoral, a minimização de sua toxicidade e elevação das taxas de cura em diferentes tipos de cânceres. Como exemplo de sistema transportador de fármacos, as nanopartículas têm demonstrado um grande potencial na

terapêutica de diversas patologias, com destaque para a terapia antineoplásica, já que possibilitam de maneira racional e efetiva, o aumento da eficiência terapêutica de diferentes substâncias, inclusive aquelas consideradas potencialmente tóxicas (WASAN, MORTON, 1996; SAKS, GARDNER, 1997; FENG, HUANG, 2001; MU, FENG, 2003; BRANNON-PEPPAS *et al*, 2004; KAWASAKI *et al*, 2005; ANDRESEN *et al*, 2005; ELSAYED, *et al*, 2007; PARK, 2007; TORCHILIN, 2007).

REVISÃO DA LITERATURA

1. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

1.1. NANOCARREADORES

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outras formas farmacêuticas de dosagem convencional, tais como (AZEVEDO, 2002; MOHANRAJ, CHEN, 2006; RAWAT, 2006):

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas aumentando conseqüentemente a biodisponibilidade de substâncias fracamente solúveis;
- Podem superar a resistência oferecida por algumas barreiras biológicas.

A ciência e tecnologia da nano ou microencapsulação são bons exemplos de como a aplicação técnica em determinado campo pode ser extrapolada para vários outros, incluindo o das ciências farmacêuticas. Em vinte anos, a encapsulação de substâncias em partículas pequenas tornou-se uma tecnologia de compartimentalização bem estabelecida, particularmente para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas de óleos, controle de odor e sabor, proteção de fármacos contra umidade, calor e oxidação, alteração da solubilidade, diminuição da volatilização, prevenção de incompatibilidades, tornar materiais tóxicos facilmente manipuláveis, possibilitar a liberação controlada e a vetorização de fármacos (LUZZI, PALMIERI, 1985; DONBROW, 1991; RAWAT, 2006).

Inicialmente, as microcápsulas foram obtidas com tamanhos variando de 5 a 2000 μm . Entretanto, desde 1980 existe uma segunda geração de sistemas microparticulados de dimensões muito menores e uma terceira geração de sistemas tem sido estudada com objetivo de direcionar fármacos contidos em nanopartículas e lipossomas, para sítios específicos, favorecendo a ação do fármaco no órgão ou tecido pretendido (DONBROW, 1991; LASIC, 1997; PARK, 2007).

Nos últimos anos os nanocarreadores têm sido definidos como sistemas desenvolvidos com escala abaixo de 1 μm podendo possuir diferentes constituições desde materiais biodegradáveis como polímeros naturais ou sintéticos, lipídeos ou fosfolipídeos e em alguns casos compostos organometálicos. Há diferentes tipos de nanocarreadores tais como nanocápsulas, nanoesferas, complexos lipídicos, micelas poliméricas e dendrimeros conforme demonstrado na figura 1, bem como diferentes tipos de aplicações para estes sistemas conforme demonstrado na tabela 1 (TORCHILIN, 2001; HUGHES, 2005; RAWAT, 2006; AMIJI, 2007; PARK, 2007; KIM, 2007; JABR-MILANE et al, 2008).

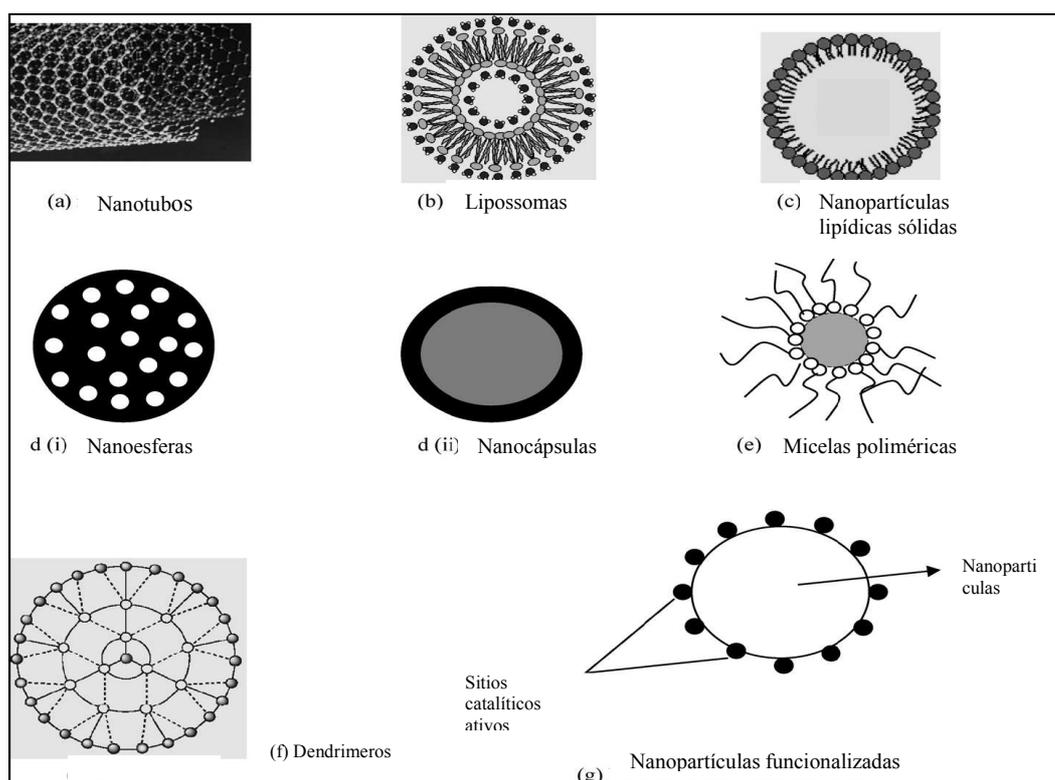


Figura 1: Diferentes tipos de carreadores (a) Nanotubos. (b) Lipossomas: vesículas com um núcleo aquoso envolvido por uma membrana lipídica. (c) Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN): carreadores coloidais submicrométricos formados a partir de lipídeos sólidos. (d) Nanopartículas poliméricas. (i) Nanoesferas: Nanopartículas com fármaco disperso numa matriz polimérica. (ii) Nanocapsulas: nanopartículas com fármaco envolto por uma membrana polimérica. (e) Micelas poliméricas: co-polímeros bloco, anfifílicos associados em solução aquosa. (f) Dendrimeros: série repetida de compostos macromoleculares que formam uma cavidade em seu interior. (g) Nanopartículas funcionalizadas: partículas monodispersas, de forma e tamanho uniformes com composição superficial definida (Modificado de Rawat, 2006).

Tabela 1. Diferentes nanocarreadores, suas aplicações, vantagens e limitações.

Sistema nanocarreador	Fármaco	Aplicações	Vantagens	Limitações	Referência
Nanocristais	Anfotericina B	Tratamento de infecções fúngicas	Adequado para fármacos fracamente solúveis utilizados para administração oral ou parenteral	Estabilidade	Muller <i>et al</i> , 2001 Keck, Muller, 2006
Nanotubos de carbono	Oligonucleotídeos Cisplatina	Terapia gênica	Aumento do volume interno para armazenagem do ativo	Tolerabilidade	Rojas <i>et al</i> , 2005. Hilder <i>et al</i> , 2008
Lipossomas	Oligonucleotídeos Anfotericina B	Antitumoral Antifúngico	Anfífilicos Biocompatíveis	Estabilidade	Ciani <i>et al</i> , 2007 Fournier <i>et al</i> , 2008
Partículas Lipídicas sólidas (SLN)	DNA Tretinoína	Terapia gênica	Biodegradáveis, fácil escalonamento, proteção à substância encapsulada	Estabilidade	Olbrich <i>et al</i> , 2001. Shah <i>et al</i> , 2007 Wong <i>et al</i> , 2007
Nanocápsulas / Nanoesferas	Citosina Arabinose B2O3/H3BO3 β-caroteno	Antitumoral Antioxidante	Diferentes tipos de substâncias podem ser encapsulados; Proteção do ativo encapsulado.	Citotoxicidade de alguns polímeros	Puri <i>et al</i> , 2007. Zhang <i>et al</i> , 2007 Ribeiro <i>et al</i> , 2008
Micelas poliméricas	Taxol Indometacina /Heparina Doxorrubicina	Antitumoral Regeneração Tecidual	Termodinamicamente estáveis	Seleção do tensoativo	Torchilin <i>et al</i> , 2001 Lee <i>et al</i> , 2008 Ye <i>et al</i> , 2008
Dendrimeros	Ceramida Doxorrubicina	Antitumoral	Fácil preparação	Biocompatibilidade Biodistribuição do polímero	Stover <i>et al</i> , 2008 Lai <i>et al</i> , 2007.
Nanopartículas funcionalizadas	Paclitaxel	Antitumoral	Alvo específico	Custo de produção	Gibson <i>et al</i> , 2007

1.1.1. MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

O termo micro ou nanopartículas é amplo e genérico sendo usado de acordo com o tamanho da partícula a que se está referindo. Partículas com tamanho menor que 1 μ m são consideradas nanopartículas, enquanto que partículas maiores são denominadas de micropartículas. Referem-se a dois tipos de estruturas diferentes micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso no interior da matriz polimérica ou cerosa. Micro/nanopartículas, ao contrário, constituem sistemas reservatórios onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser líquido ou sólido. Nesse caso a substância ativa encontra-se envolvida por uma membrana geralmente polimérica isolando o núcleo do meio externo (COUVREUR et al, 2002; GUTERRES et al, 2007).

Fármacos quando encapsulados no interior de partículas poliméricas não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico porque dependem da dissolução ou desintegração do polímero e/ou da difusão do fármaco do interior da partícula polimérica para sua liberação. Os polímeros usados para a obtenção de micro/nanopartículas podem ser divididos em três classes: polímeros solúveis em água, polímeros biodegradáveis e polímeros não biodegradáveis. As propriedades químicas e físico-químicas da partícula bem como do polímero são de grande importância e podem influenciar na elaboração de sistemas microparticulados quando se pretende a liberação controlada, prolongada ou vetorização de fármacos, uma vez que a farmacocinética do fármaco passa a ser dependente do sistema no qual ele está contido (LEE, ROBINSON, 1987; DONBROW, 1991; AHSAN, *et al* 2002; TORCHILIN, 2006).

Sistemas obtidos com polímeros hidrossolúveis são normalmente utilizados quando se pretende a liberação do fármaco em curto período já que as micropartículas constituídas por polímeros hidrossolúveis não necessitam sofrer qualquer degradação para se dissolverem no meio biológico. Ao contrário, sistemas contendo polímeros biodegradáveis necessitam sofrer algum tipo de reação no organismo. Partículas obtidas com essa classe de polímeros possibilitam maior controle na liberação de fármacos, uma vez que alguns desses polímeros podem se decompor em poucas horas, outros podem resistir à degradação durante dias ou semanas (ANDREO-FILHO, OLIVEIRA, 1999; TORCHILIN, 2006).

A preparação de nanopartículas passa a ser crucial e se concentra em dois pontos: modificações (aprimoramentos) que criem novas rotas ou melhorem outros métodos e funcionalização química das partículas. Os novos sistemas carregadores coloidais para liberação controlada e dirigida de fármacos procuram mudar a distribuição da substância ativa, aumentando a permanência na circulação sistêmica para que se alcance maior

eficácia terapêutica, com doses menores, e baixa toxicidade. Logo, o potencial terapêutico destes dispositivos biodegradáveis encapsulando o ingrediente ativo depende do tempo de circulação na corrente sanguínea e, principalmente, do destino *in vivo* do carregador, que deve ser direcionado a alvos específicos, freqüentemente designados por “drug targets” (BROOKING, DAVIS, ILLUM, 2001).

Entretanto, existe uma barreira importante para ser superada: o sistema reticuloendotelial (LOCKMAN *et al*, 2002). Após administração intravenosa de nanoesferas, assim como de outros carregadores coloidais, as proteínas do plasma conhecidas como opsoninas (imunoglobulinas IgM e IgG, relacionadas à resposta imunológica inata do organismo), são rapidamente adsorvidas na superfície das partículas. Esta opsonização leva ao rápido reconhecimento pelas células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, principalmente no baço e células de Kuppfer, no fígado) e conseqüente fagocitose das partículas, especialmente no fígado (60-90%), baço (2-20%), medula óssea (0,1-1%) e quantidades variadas nos pulmões (SHERSTOV, *et al*, 1996). Em função da existência destas barreiras, investigações estão tem sido feitas, no sentido de reduzir a captura das partículas coloidais pelo sistema reticuloendotelial e assim aumentar a concentração destes veículos no sangue e conseqüentemente no alvo desejado (KREUTER *et al*, 2002; DAVDA, LABHASETWAR, 2002).

Uma das mais promissoras, entre as várias estratégias que foram tentadas é utilizar nanopartículas que tenham em sua superfície cadeias de polímeros hidrofílicos como, por exemplo, o poli-óxido de etileno (PEO) ou PEG. Isto pode ser feito pela utilização de copolímeros-bloco como, por exemplo, PEO-PLA em que a porção hidrofóbica de ácido-poli-lático (PLA) forma a matriz polimérica enquanto que a porção hidrofílica forma a cobertura. A presença destes polímeros sobre a superfície da partícula decresce a adsorção de opsoninas e subseqüente fagocitose, ou seja, o carregador não é reconhecido pelo sistema de defesa do organismo. Uma aplicação destes sistemas é a utilização de nanopartículas sólidas que encapsulem drogas anticâncer para serem direcionadas mais facilmente ao alvo (KWON, 2002).

1.1.1.1. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE SISTEMAS MICRO OU NANOENCAPSULADOS

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para o preparo de micro ou nanopartículas, estes métodos podem ser classificados em mecânicos, físico-químicos e químicos (COUVREUR *et al*, 1995; SCHAFFAZICK *et al*, 2003; MOHANRAJ, CHEN, 2006).

Os métodos mecânicos, utilizados para obter micropartículas, são facilmente adaptáveis à produção em larga escala. Como exemplos podem ser citados os processos

de revestimento em leito fluidizado e *spray drying*. O primeiro mantém em suspensão as partículas contendo fármacos, através de um fluxo de ar contínuo. As partículas são então revestidas por atomização do material de revestimento. O tempo de exposição destas partículas ao material de revestimento determinará a espessura do filme de revestimento. Este sistema é capaz de encapsular fármacos sólidos ou líquidos adsorvidos em partículas sólidas, e o tamanho médio varia de 35 a 5000µm. Já no método de *spray drying*, o fármaco em solução ou em dispersão é atomizado juntamente com o material de revestimento solubilizado ou fundido, em uma câmara de evaporação causando rápida solidificação da superfície das gotículas atomizadas originando as partículas (BENITA, 1996; DONBROW, 1992; ANDREO-FILHO, OLIVEIRA, 1999).

Os métodos físico-químicos são basicamente representados pelos métodos de coacervação e polimerização interfacial. A coacervação pode ser simples ou complexa. A coacervação simples envolve a formação do coacervado devido a mudanças físico-químicas no meio, como alterações de pH, temperatura, força iônica, já a coacervação complexa resulta da complexação entre dois polieletrólitos de cargas opostas e a formação do coacervado pode ser dada tanto em meio homogêneo, originando partículas monolíticas (micro/nanoesferas), quanto em meio heterogêneo onde o coacervado se deposita na superfície da fase dispersa (BENITA, 1996; ANDREO-FILHO, OLIVEIRA, 1999).

No processo de evaporação do solvente (deposição interfacial de polímero pré-formado, polimerização interfacial, etc), o fármaco e o polímero são dissolvidos em um solvente orgânico volátil e emulsificados em meio aquoso contendo tensoativo. Após a emulsificação, o solvente orgânico é eliminado por agitação, aquecimento ou pressão reduzida (REIS *et al*, 2006). Esta técnica apresenta claramente vantagens quando comparada a outros métodos existentes como o uso de solventes orgânicos farmacologicamente aceitos, alta eficiência de encapsulação, alta reprodutibilidade, melhor controle do tamanho das partículas e fácil escalonamento (LAMPRECHT *et al*, 1999; SOPPIMATH *et al*, 2001; REIS *et al*, 2006; CHÉCOT-MOINARD *et al*, 2008).

Já nos métodos químicos como polimerização interfacial ou copolimerização, que podem ocorrer no meio externo e/ou na interface, podem ser obtidas partículas do tipo reservatório (micro/nanocápsulas), sendo que o tamanho destas partículas é diretamente proporcional ao diâmetro da fase interna e do controle da reação, inicialização, propagação e término da formação da cadeia polimérica (DOMB *et al*, 2002).

1.1.1.1.2. Método de preparação das nanocápsulas biodegradáveis por deposição interfacial de polímero pré-formado.

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado através do deslocamento do solvente, primeiramente descrito por Fessi e colaboradores, em 1989, é baseado na emulsificação espontânea da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido, dentro da fase aquosa externa. Ocorre então um processo de emulsificação/solidificação usado para a fabricação das nanocápsulas. Na deposição interfacial é introduzido um óleo de natureza biocompatível miscível no solvente do polímero, mas imiscível na mistura final.

Neste método, o polímero é dissolvido juntamente com o fármaco lipossolúvel, óleo e fosfolípídeos em acetona. A mistura orgânica (solução acetona-óleo) é injetada lentamente dentro de um meio aquoso sob agitação, resultando numa emulsificação espontânea da solução oleosa na forma de nanogotículas, devido à instabilidade na interface que surge através da rápida difusão da acetona quando atravessa a interface e provoca a diminuição da tensão interfacial. Durante a evaporação da acetona ocorre a migração do polímero insolúvel através da interface óleo/água, ou seja, ele se deposita entre a água e as nanogotículas de óleo formando a membrana da nanocápsula (FESSI *et al*, 1989; O' DONNELL ET AL, 1997; SOPPIMATH *et al*, 2001; REIS *et al*, 2006).

Este método de utilização do polímero pré-formado evita o aparecimento de moléculas residuais que podem ocorrer durante a polimerização (monômeros, oligômeros, precursores da polimerização) o que pode proporcionar a cada lote fabricado maior ou menor toxicidade e requer um meticuloso processo de purificação do material coloidal após a polimerização, além do mais, moléculas de monômeros ativados podem interagir com o fármaco durante o processo de polimerização e, por exemplo, levar à desnaturação e inativação de fármacos proteicos (LAMPRECHT *et al*, 1999; REIS *et al*, 2006; CHÉCOT-MOINARD *et al*, 2008).

As propriedades farmacêuticas das micro/nanopartículas podem ser determinadas por vários fatores como natureza, solubilidade e encapsulação do fármaco; tipo de polímero (peso molecular e composição), propriedades do solvente orgânico, concentração e proporção da mistura das fases aquosa e orgânica, bem como a proporção entre os componentes de cada uma das fases (polímero / fármaco / tensoativo(s) / estabilizante(s) / aditivo(s)), natureza e concentração do(s) tensoativo(s), força mecânica de partição / agitação e outras condições como temperatura e pH (O' DONNELL *et al*, 1997; MOSQUEIRA *et al*, 2000; MU, FENG, 2003; GUINEBRETIERE *et al*, 2002; RODRIGUES *et*

al, 2003; SCHAFFAZICK *et al*, 2003; LEGRAND *et al*, 2007; CHÉCOT-MOINARD *et al*, 2008).

1.1.1.2.COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS

1.1.1.2.1.Polímeros

As propriedades químicas e físico-químicas da partícula bem como do polímero são de grande importância e podem influenciar a elaboração de sistemas micro/nanoparticulados quando se pretende a liberação controlada, prolongada ou vetorização de fármacos, uma vez que a farmacocinética do fármaco passa a ser dependente do sistema no qual ele está contido (PRISTA ET AL, 1993(B); LEGRAND *et al*, 2007; CHÉCOT-MOINARD *et al*, 2008).

Moléculas de polímeros, comumente utilizadas para a obtenção de nanopartículas, são altamente ramificadas (tridimensionais), característica responsável por muitas das suas propriedades, como densidade, dureza, flexibilidade, viscosidade, transparência, etc. Por outro lado, a existência de ligações cruzadas entre as cadeias ramificadas vizinhas e até cadeias oxidadas, modifica as propriedades dos polímeros, pois o fato dos polímeros terem cadeias muito ramificadas leva a que suas moléculas se acomodem mal umas às outras, dispondo-se sem regularidade, como numa estrutura amorfa, então este polímero obtido terá fraca cristalinidade. A cristalinidade do polímero seja ela fraca ou forte, depende do seu processo de preparação e é dada em porcentagem de material cristalino (de 10% a 55%, apresentando maior ou menor quantidade de cadeias ramificadas respectivamente). De maneira geral a textura cristalina depende da temperatura e diminui à medida que esta se aproxima do ponto de fusão do polímero. Os polímeros pré-formados e biodegradáveis comumente utilizados na obtenção de sistemas nanoparticulados são poliésteres de ácidos, sendo os mais empregados o D,L-PLA, D,L-PLGA, policaprolactona (PCL), polihidroxibutirato, polialquilcianoacrilatos e respectivos copolímeros (PRISTA ET AL, 1993 (A); DOMB *et al* , 2002).

Homopolímeros cristalinos de ácido lático não possuem boa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, entretanto polímeros amorfos de D,L- ácido lático e os copolímeros de D,L- ácido lático e glicólico com baixo teor de ácido glicólico são solúveis na maioria dos solventes orgânicos. As propriedades físico-químicas do PLGA utilizado neste trabalho para a fabricação das nanocápsulas esta descritas na tabela 2 (KIBBE, 2000; DOMB *et al*,2002).

Em meio aquoso, os poliésteres sofrem degradação hidrolítica através do rompimento de suas ligações ésteres, tornando-se ácidos hidroxicarboxílicos não tóxicos. Estes ácidos hidroxicarboxílicos são eventualmente metabolizados no organismo e eliminados como água e dióxido de carbono através da via do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (KIBBE, 2000). O processo de biodegradação do PLGA é descrito com uma sucessão de etapas quando estes são expostos aos fluidos do organismo. Inicialmente o material sofre hidratação, com a presença das moléculas da água, o processo de degradação inicia através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de monômeros solúveis e não tóxicos de ácido lático e glicólico.

A degradação prossegue por um processo enzimático, pela quebra de ligações ésteres ou clivagem hidrolítica passiva (ELKE *et al*, 2004). Terminada a hidrólise dos polímeros, tem início a oxidação a ácido lático e ácido glicólico. As unidades de ácido glicólico sofrem conversão em glicina que por sua vez é convertida em ácido pirúvico. Na presença de acetil coenzima A, o ácido pirúvico decompõe-se em citrato e ocorre liberação de dióxido de carbono. O citrato será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em dióxido de carbono e água, podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração. Dessa maneira, o material é reabsorvido e totalmente metabolizado (ALI *et al*, 1993).

A velocidade de biodegradação e características como solubilidade de sistemas formulados com poliésteres, podem ser controladas por alterações nas propriedades físico-químicas dos polímeros como cristalinidade, hidrofobicidade, estereoquímica do monômero, proporção de co-polímero e peso molecular do polímero. Os pesos moleculares variam de 2000 até mais de 100.000. Proporções de co-monômeros de ácido lático e ácido glicólico para o PLGA variam entre 85:15 a 50:50 (KIBBE, 2000). Para o co-polímero PLGA, à medida que a proporção Lactídeo/Glicolídeo é alterada diminuindo o ácido lático e aumentando ácido glicólico, por exemplo, proporções como 85:15 / 75:25 / 50:50 quantidades relativas de ácido lático e ácido glicólico, respectivamente irão determinar a cristalinidade e a taxa de hidrólise do polímero e conseqüentemente a velocidade de liberação do fármaco através da matriz polimérica (DESHPANDE *et al*, 1998; MU & FENG, 2003).

Outro tipo de polímero utilizado como agente estabilizante de sistemas nanoparticulados, capaz de proporcionar aumento na viscosidade da fase externa aquosa aumentando a estabilidade da dispersão coloidal, é um copolímero bloco não iônico, o polioxietileno-polioxipropileno, chamado comercialmente de Poloxamer 188® ou Pluronic® F-68 e suas especificações e características físico-químicas estão descritas na Tabela 3 (KIBBE, 2000; CUNHA *et al*, 2003)

As características do Poloxamer 188® em termos de peso molecular, aparência, hidrofiliicidade/hidrofobicidade e solubilidade são determinadas pelo comprimento da cadeia constituída com unidades de polioxietileno – (EO-) (porção hidrofílica) e unidades de polioxipropileno – (PO-) (porção hidrofóbica). A distribuição do peso molecular é dependente das reações que ocorrem durante a polimerização de óxido de propileno e a capacidade de solubilização do poloxamer é comandada pela sua porção hidrofóbica presente na cadeia polimérica (cerca de 20-28% de unidades de polióxipropileno–(PO-)). O Poloxamer 188® pode ser utilizado como emulsificante em emulsões oleosas intravenosas e na preparação de sistemas sólidos de dispersões, agente solubilizante, podendo aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos insolúveis em água. É útil ainda como agente de revestimento para antibióticos e revestimento e ligante para comprimidos (pode garantir uniformidade de conteúdo durante a granulação), também é usado em bases para pomadas e supositórios além de várias outras aplicações (KIBBE, 2000; QUADIR, 2006; ATTWOOD et al, 2007). Há relato do uso deste copolímero dibloco com D.L-PLA como carreador para o paclitaxel e testosterona (ZHANG *et al*, 1996; HANGAN *et al*, 1996) e com PCL para solubilização da indometacina (KIM *et al*, 1998). Vários relatos na literatura incluem copolímeros com blocos poliésteres e sua alta capacidade de solubilizar certos fármacos nestes sistemas (GAUCHER *et al*, 2005; ALIABI, LAVASANIFAR, 2006; SAVIC *et al*, 2006; ATTWOOD *et al*, 2007).

Muitas das mudanças físicas ou químicas dos polímeros são resultantes de fatores ambientais como luz, calor, umidade e atividade biológica de enzimas e ou microorganismos. Essas mudanças resultam em cisão e conseqüentemente transformações químicas e formação de novos grupos funcionais que caracterizam reações de degradação polimérica. A degradação se reflete em mudanças nas propriedades mecânicas, ópticas ou características elétricas diretamente relacionadas a erosão, descoloração, separação de fase, delaminação entre outras. Polímeros são sensíveis a fotodegradação por absorverem uma porção do espectro ultravioleta. A absorção dessa radiação altamente energética ativa elétrons que se tornam muito reativos e promovem a oxidação, clivagem ou outro tipo de degradação. A radiação UVA (315-400 nm) é a maior responsável pela degradação dos grupamentos terminais da molécula polimérica (SHAH et al, 2008).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do PLGA utilizado para a fabricação das nanocápsulas (KIBBE, 2000).

Polímero Nome genérico e químico (CAS)	Fórmula geral	Solubilidade*	Ponto de fusão (°C)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (dL/g)*	Peso molecular	Cor
PLGA Poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo) 85:15 1,4-dioxano-2,5-dione, polímero com (3S-cis)-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-dione	$[-OCH(CH_3)CO-]_x$ $[-OCH_2CO-]_y$	MeCl ₂ THF EtOAc C ₃ H ₆ O CHCl ₃	Indefinido	1,34	0,5 – 0,8 dL/g (HFIP)	50000-75000	Transparente

* MeCl₂ = cloreto de metileno, THF= tetrahidrofurano, EtOAc= acetato de etila, C₃H₆O= acetona, CHCl₃ = clorofórmio, HFIP= hexafluoroisopropanol)

Tabela 3. Especificações e características físico-químicas do Poloxamer 188[®] (polietileno-propilenoglicol copolímero) (KIBBE, 2000; RIBAS, 2007).

Nome químico	α - hidro - ω -hidroxipoli(oxietileno) copolímero bloco de poli-(oxipropileno) – poli-(oxietileno)
Peso molecular	7680-9510 (peso médio \approx 8400)
Fórmula geral	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ possui cerca de 80% de a e 20-27% de b
Viscosidade	1000cP quando fundido a 77°C
Ponto de fusão	52-55°C
Características gerais	Escamas sólidas ou grânulos brancos e cerosos. Carga aniônica. A porção polioxietilenoglicol [\approx 80%] é hidrofílica e a porção polioxipropilenoglicol é hidrofóbica
Acidez/alcalinidade	pH 5 a 7,4 para uma solução aquosa a 2,5%
Densidade	1,06 g/mL
HLB	29
Solubilidade	Livremente solúvel em etanol (95%) e água

1.1.1.2.2. Fosfatidilcolina

A fosfatidilcolina, quimicamente denominada 1,2 diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina pode ser de origem vegetal extraída da lecitina de soja purificada (p.ex.:Lipoid S100[®] concentração de pureza é \approx 99%) e de origem animal extraída de gema de ovo. Segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos, USP 30, a lecitina de soja é definida como uma mistura complexa de fosfatídeos insolúveis em acetona, os quais consistem principalmente em fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, e fosfatidilinositol combinados a várias outras substâncias como triglicerídeos, ácidos graxos, e carboidratos, quando separados de uma fonte de óleo vegetal cru (KIBBE, 2000).

A fosfatidilcolina pura (99%) é extraída com solvente orgânico e, isolada das outras classes de lipídeos usando uma serie de colunas cromatográficas. São solúveis em clorofórmio, metanol, etanol, tolueno, éter e insolúveis em água. Os fosfolipídeos naturais

decompõem-se em pHs extremos e quando aquecidas, são higroscópicos, e sujeitos a degradação microbiana (KIBBE, 2000).

Os fosfolídeos possuem grande eficiência em manter a estabilidade da emulsão, sendo utilizados na fabricação das nanocápsulas como estabilizante da fase oleosa da emulsão óleo/água formada na primeira etapa de preparação, reduzindo a energia de superfície na interface e devido à grande afinidade pela fase oleosa e aquosa (FENG e HUANG, 2001), dispõem-se na interface juntamente com o poloxamer 188[®].

1.1.1.2.3. Óleo vegetal biocompatível: Óleo de soja

O óleo de soja refinado possui composição tipicamente conhecida de ácidos graxos, apresentados como glicerídeos, sendo os principais: ácido linoleico 50-57%, ácido linolênico 5-10%, ácido oléico 17-26%, ácido palmitoleico 9-13% e ácido esteárico 3-6% (KIBBE, 2000). Emulsões contendo óleo de soja têm sido usadas como veículos para a administração oral e intravenosa de fármacos lipossolúveis como, por exemplo, os retinóides que podem ser incorporados dentro da fase oleosa (NANKERVIS *et al*, 1994).

1.1.1.3. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS.

1.1.1.3.1. Avaliação morfológica e distribuição de tamanho da partícula.

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) tem sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (POHLMANN *et al*, 2002; RODRIGUES *et al*, 2003; TEIXEIRA *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2006; JÄGER *et al*, 2007; POLETTO *et al*, 2007). Outra técnica que tem sido empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica, a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de fornecer alta resolução de superfície em nível atômico.

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersão (SANTOS-MAGALHAES *et al*, 2000; POHLMANN *et al*, 2002; RODRIGUES *et al*, 2003; TEIXEIRA *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2006; JÄGER *et al*, 2007). Outro método usualmente

empregado para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas é o espalhamento de luz difusa ou espectroscopia de correlação de fótons. Este método está baseado na propriedade das partículas em suspensão se difundirem por todas as direções e estarem em movimento permanente (movimento Browniano), espalhando o feixe de luz quando este incide sobre elas, determinando assim o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (LIMA, 1995; HOFFMANN *et al*, 1997; RODRIGUES *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2006; JÄGER *et al*, 2007)

1.1.1.3.2. Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas influenciado tanto pelas mudanças na interface com o meio dispersante quanto pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou a adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado pela medida da mobilidade eletroforética.

Os fosfolipídeos, os poloxamers e os diferentes polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta, especialmente os poliésteres, como PLA e PLGA. Os fosfolipídeos fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que os poloxamers tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. As características superficiais da partícula podem influenciar tanto a estabilidade físico-química quanto a resposta biológica do fármaco associado. Geralmente dispersões com valores de potencial zeta em torno de 30 mV, positivo ou negativo, demonstram maior estabilidade já que a repulsão entre as partículas previne a agregação (POHLMANN *et al*, 2002; GREF, COUVREUR, 2006).

Alem da calorimetria exploratória diferencial (DSC) (CALVO *et al* 1996, TEIXEIRA *et al*, 2005) da difração de raio X (CRUZ *et al*, 2006 (A)) e espectroscopia de infravermelho a determinação do potencial zeta também pode elucidar o mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas. Um exemplo disto foi o trabalho de Alonso e colaboradores (1991) em que o potencial zeta de nanoesferas de poli(cianoacrilato de butila) foi determinado para se inferir sobre o mecanismo pelo qual o fármaco e o polímero interagem, sugerindo uma interação eletrostática entre eles.

Estudos comparativos entre nanocápsulas e nanoesferas foram realizados para a proposição da organização destas partículas. Calvo e colaboradores (1996) observaram os efeitos da composição de diferentes formulações sobre os valores de potencial zeta. Foi verificado que a presença de fase oleosa nas nanocápsulas conferiu a estas um potencial zeta mais negativo em relação às nanoesferas permitindo aos autores sugerir que a

camada polimérica ao redor das gotículas de óleo seria um filme polimérico delgado. Mosqueira e colaboradores (2000) demonstraram que o óleo estaria completamente encapsulado, existindo um filme polimérico ao redor das gotículas, por não ter observado em seu trabalho alteração do potencial zeta em função da natureza do núcleo oleoso. Pohlmann e colaboradores (2002) e Jäger e colaboradores (2007) também propuseram modelos para nanocápsulas e nanoesferas utilizando além da medida do potencial zeta outras técnicas de caracterização como microscopia eletrônica e a medida da fluorescência.

1.1.1.3.3. pH da dispersão de nanopartículas

O monitoramento do pH ao longo do tempo pode fornecer informações relevantes sobre a estabilidade da dispersão de nanopartículas. A alteração do pH pode ser o indício de degradação do polímero (GUTERRES *et al*, 1995; SANTOS *et al*, 2005), no entanto, a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do polímero (CALVO *et al*, 1996; LOPES *et al*, 2000).

1.1.1.3.4. Estabilidade química, físico-química, biológica e microbiológica.

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto existem vários fatores que podem influenciar a estabilidade das suspensões coloidais (aglomeração e sedimentação) como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas às superfícies das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, estabilidade química do polímero utilizado na sua obtenção dentre outros (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

O tamanho da partícula, o potencial zeta, a distribuição de massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são parâmetros físico-químicos, já bem estabelecidos, utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões poliméricas coloidais conforme demonstrado na tabela 4 que traz alguns estudos disponíveis na literatura referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos.

Tabela 4. Estudos de estabilidade de dispersões de nanopartículas poliméricas em função do tempo de armazenamento.

Fármaco	Polímero	Sistema	Condições de armazenamento	Resultados	Referência
Indometacina	PCL	NC, NS	t.a. 6 meses	<ul style="list-style-type: none"> • EC inalterada • Diminuição do pH • Discreta redução do potencial zeta 	Calvo et al, 1996.
Indometacina	PCL, PLA	NC, NS	t.a / 50°C 3 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Redução da EC 	Pohlmann et al, 2002.
Diclofenaco	PCL EudragitS90	NC, NS	t.a. 3,5 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do pH • Redução da EC • precipitação 	Schaffazick et al, 2003.
Xantona metoxyxantona	PLGA	NC, NS	4°C 4 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de cristais com 4 meses; • Nenhuma alteração no potencial zeta e no tamanho 	Texeira et al, 2005.
Ácido Usnico	PLGA	NC	8h a 25°C e 16 h a - 18°C, 120 dias t.a. 36 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do pH • Estável 	Santos et al, 2005.
Melatonina	Eudragit S100	NC suspensão e pó	t.a. 12 meses	<ul style="list-style-type: none"> • Suspensão apresentou precipitados com 3,5 meses • Pó-estável pelos 12 meses 	Schaffazick et al, 2006.

*NC= nanocápsulas, NS= nanoesferas, t.a= temperatura ambiente, PCL= policaprolactona, EC= eficiência de encapsulação.

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada devido aos problemas de agregação das partículas, estabilidade química do polímero e do fármaco. Além disso, é importante ressaltar que formas farmacêuticas líquidas são susceptíveis a contaminação microbiológica. Estes problemas podem ser evitados ou retardados através de operações de desidratação das suspensões de nanopartículas como a liofilização (sublimação) e a nebulização (spray-drying ou aspersão)

ampliando assim as perspectivas de utilização clínica destes sistemas carreadores de fármacos (POHLMANN et al, 2002; SCHAFFAZICK et al, 2003).

1.1.1.4. APLICAÇÕES

A obtenção de micro/nanopartículas pode proporcionar desde a obtenção de formas sólidas de óleos, mascarar sabor e odor desagradáveis, proteção contra umidade, calor e oxidação, alteração da solubilidade do fármaco, diminuição da volatilização de fármacos líquidos, prevenção de incompatibilidades entre substâncias ativas na mesma formulação, aumento das características de fluxo de materiais sólidos em processo de compressão, obtenção da liberação controlada e vetorização de fármacos além do aumento da biodisponibilidade dos fármacos e redução dos seus efeitos colaterais, seja após administração local (MO & LIM, 2005), oral (MU & FENG, 2003; MULLER *et al*, 2004), retal (FAWAZ *et al*, 1996), como também o aumento da atividade terapêutica e modificação da distribuição tecidual dos fármacos pela via parenteral, além de favorecer a redução da frequência aplicações por esta via (SONG *et al*, 1997; O'HAGAN *et al*, 1998; WIN & FENG, 2006).

Nos últimos 20 anos, sistemas carreadores poliméricos tem sido extensivamente estudados para o controle e liberação de fármacos pela sua eficácia e seletividade das formulações (FESSI et al, 1989; GUTERRES et al, 1995; SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000; COUVREUR et al, 2002; TEIXEIRA et al, 2005; REIS et al, 2006; SCHAFFAZICK et al, 2003; COUVREUR, VAUTHIER, 2006(B), GUTERRES et al, 2007). Estes sistemas podem ser administrados por diferentes rotas que incluem a via endovenosa, podendo veicular uma variedade de substâncias por esta via, como por exemplo, corantes biomarcadores fluorescentes e fotossensibilizantes (SAXENA *et al*, 2004), antineoplásicos, citostáticos e imunossupressores (WANG *et al*, 1997; WIN & FENG, 2006; COUVREUR *et al*, 2006(A)), antibióticos (PAGE-CLISSON *et al*, 1998; SANTOS-MAGALHÃES *et al*, 2000), proteínas (SONG *et al*, 1997; RIBEIRO *et al*, 2005; CHUNG *et al*, 2006), a via ocular, oral, intraperitoneal, intramuscular pulmonar, subcutânea e cutânea (BARRAT, 2000). Foram comercialmente introduzidas apenas em 1995 pela L'Oreal paris no mercado cosmético (GUTERRES et al, 2007). O interesse pelo emprego desta tecnologia pode também ser evidenciado pelo número de patentes registradas nas bases internacionais na última década (Figura 2) e a grande potencialidade de medicamentos que podem vir a ser submetidos à avaliação clínica visto que até o momento apenas dois foram submetidos (Tabela 5) [COUVREUR, VAUTHIER, 2006(A), COUVREUR, VAUTHIER, 2006(B), MUNDARGI *et al*, 2008].

Tabela 5: Fármacos associados à nanopartículas poliméricas submetidos à avaliação clínica

Princípio Ativo	Nome do produto	Indicação Terapêutica
Acetato de Buserelin	Suprecur [®] MP	Câncer de Prostata
Paclitaxel	Abraxan [®]	Câncer de mama
Doxorrubicina	Transdrug [®]	Câncer de mama, Sarcoma de Kaposi, câncer ovariano.
Risperidona	Risperidal [®] Consta	Antipsicótico
Acetato de Leuprolide	Lupron [®] Depot	Câncer de Prostata

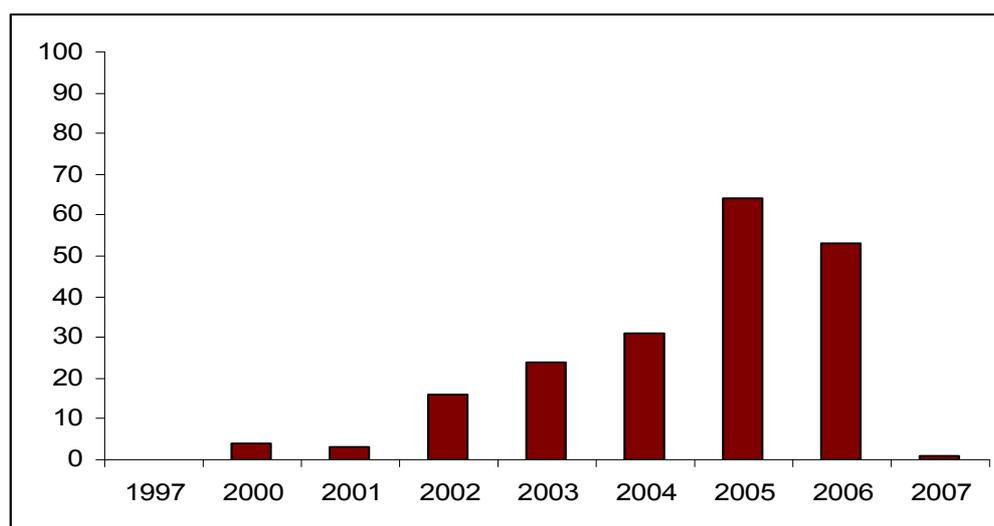


Figura 2: Número de registros internacionais de patentes depositadas via PCT envolvendo produção e utilização de nanocápsulas ou nanoesferas. Fonte: WIPO database (Dezembro/2007).

1.1.2. LIPOSSOMAS

Descobertos há quarenta anos por Alec Bangham e colaboradores, os lipossomas podem ser definidos como estruturas esféricas, com dimensões variando entre alguns nanômetros a alguns micrômetros de diâmetro, em que uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos em forma de vesículas. Os sistemas lipossomais são constituídos basicamente por fosfolipídeos, esteróis e um antioxidante, resultando em estruturas uni e multilamelares formadas espontaneamente quando os fosfolipídeos são dispersos na fase aquosa. Substâncias com variadas características de hidro e lipofilia podem ser encapsuladas em lipossomas, seja na bicamada lipídica ou no compartimento aquoso interior (LASIC *et al*, 1989; GREGORIADIS, 1995).

Devido à similaridade da estrutura entre a bicamada lipídica e a membrana celular, os lipossomas são capazes de interagir efetivamente com as células, permitindo o direcionamento do fármaco ao órgão alvo e, portanto, com menor toxicidade que o fármaco livre (FARREL *et al* 1997; MCPHAIL *et al*, 2000).

Os lipossomas são amplamente estudados para os mais diversos fins, entre os quais transporte de fármacos. Apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que, quando alcançam o tecido alvo, podem liberar doses concentradas de medicamento, aumentando a eficácia do tratamento (AOKI *et al*, 1997). Os lipossomas modificam as propriedades farmacocinéticas, o tempo de trânsito na circulação sangüínea e o metabolismo do fármaco encapsulado (AOKI, *et al*, 1997; SHARMA, 1997, PHARTHASARATHY, 1998; SOU *et al*, 2007). Entretanto, o grande desafio na utilização de lipossomas reside na sua estabilidade frente às condições adversas encontradas nos meio fisiológicos, além das dificuldades de armazenamento e preparo (WEINSTEIN, LESERMAN, 1984; VEMURI, *et al*, 1995(A); ISHIHARA *et al*, 2002; SAPRA, ALLEN, 2003; ANDERSON, *et al*, 2004; MARCELINO, 2007).

As várias aplicações terapêuticas dos lipossomas têm mostrado resultados positivos, destacando-se: terapia antimicrobiana de infecção por vírus, bactérias e protozoários; tratamento de vários tipos de câncer; terapia genética; terapia de reposição de enzimas em disfunções metabólicas hereditárias; terapias de reposição hormonal; desintoxicação de tecidos com depósitos metálicos; tratamento de artrite; tratamentos oftálmicos e dermatológicos; substituto de sangue em emergências; vacinas; etc (WEINSTEIN, LESERMAN, 1984; FIELDING, 1991; GREGORIADIS, 1995; SAPRA, ALLEN, 2003; GOYAL *et al*, 2005; TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2007).

A utilização de lipossomas como transportadores para a liberação de fármacos apresenta muitas vantagens, dentre as quais citam-se (MACHY, LESERMAN, 1987):

- Lipossomas podem ser programados para a liberação controlada de fármacos durante um período prolongado de tempo.
- Lipossomas têm uma tendência natural a ligar-se a determinados tipos de tecidos e células. Lipossomas são pequenos o bastante para escaparem da circulação sanguínea para o tecido nos quais o endotélio capilar esteja danificado.
- Lipossomas são quimicamente similares a outras células que circulam no sangue, de modo que são biologicamente compatíveis com outras células e também fáceis de serem metabolizados pelo organismo.
- Lipossomas conjugados com anticorpos ligam-se às células alvo com maior avidéz que a forma solúvel destes mesmos anticorpos.
- Lipossomas apresentam-se como método útil para proteger produtos lábeis biologicamente ativos, como proteínas e peptídeos, frente à sua inativação ou degradação no organismo. Lipossomas também podem prevenir o efeito tóxico de certas substâncias antes que elas atinjam o sítio de ação.
- A possibilidade de direcionar seletivamente os lipossomas para tipos celulares específicos através do emprego de anticorpos, hormônios, carboidratos ou outros ligantes abrem novas perspectivas para o transporte de fármacos encapsulados.

A interação dos lipossomas com células do organismo é a base de sua aplicação no transporte de fármacos. Essas interações podem ser de quatro tipos: intercâmbio molecular entre a parede dos lipossomas e as membranas celulares, adsorção dos lipossomas à superfície das células, fusão de membranas, endocitose ou fagocitose e, dependem do tipo de célula, do tipo de lipossoma e das condições experimentais (Figura 3) [PUISIEUX, 1983; WEINSTEIN, LESERMAN, 1984; TORCHILIN, LEVCHENTO, 2003 (A); TORCHILIN, *et al*, 2003 (B)].

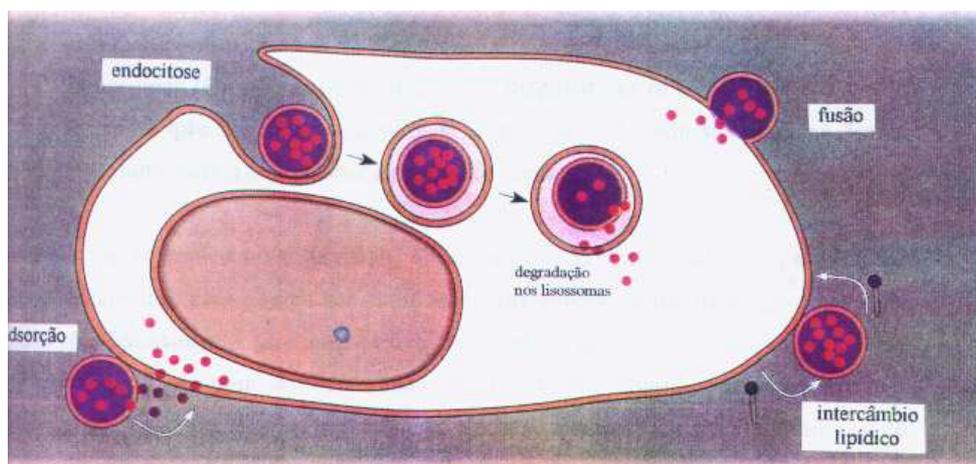


Figura 3: Formas de interação entre lipossomas e células do organismo.

Fonte: www.bio.davidson.edu (Dezembro 2007)

Desde sua descoberta há quarenta anos por Alec Bangham e colaboradores os lipossomas vêm cumprindo cada vez mais a sua promessa como veículos para o transporte de fármacos com as mais diversas aplicações. A encapsulação de certos fármacos, como antineoplásicos, antivirais, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitários, em lipossomas pode aumentar sua eficácia na ordem de 35 a 40 vezes e/ou reduzir de modo significativo sua cardio-, nefro-, gastro-, ou hepatotoxicidade (LASIC, 1989; LIMA, OLIVEIRA, 2002).

Em alguns casos, a encapsulação em lipossomas elevou a eficácia terapêutica do fármaco entre 700 a 1800 vezes em comparação com o fármaco livre (OSTRO, CULLIS, 1989). Dentre as várias classes de fármacos com potencial aplicação para a encapsulação em lipossomas, os retinóides ocupam lugar de destaque. Os retinóides são uma classe de compostos envolvidos em uma variedade de processos biológicos, como a visão, embriogênese, controle de crescimento epitelial e diferenciação celular (CORTESI *et al*, 1994). Em razão de sua atividade sobre a proliferação e diferenciação celular, os retinóides têm demonstrado grande eficácia na prevenção do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e no crescimento de cânceres estabilizados, principalmente no sistema hematopoiético (SPORN, 1976; LOTAN, 1980 (A); LOTAN *et al*, 1980(B)).

A isotretinoína tem demonstrado efeito inibidor da carcinogênese em modelos experimentais com animais de laboratório e em culturas de células, inibindo também a proliferação de várias linhagens de células neoplásicas, como por exemplo, células de leucemia mielóide, leucemia linfocítica, melanoma e adenocarcinoma mamário (SPORN *et al*, 1976; HARISIADIS *et al*, 1978; LOTAN, 1980(A); LOTAN *et al*, 1980(B); BREITMAN *et*

al, 1981; SUN *et al*, 2002). Entretanto, o uso terapêutico dos retinóides encontra algumas limitações, devido aos relatos dos problemas relacionados à sua estabilidade e aos seus efeitos adversos, principalmente quando empregados topicamente em doses elevadas ou administrados sistemicamente (CORTESE *et al*, 1994).

1.1.2.1 COMPOSIÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Lipossomas são constituídos basicamente por fosfolipídeos, esteróis e um antioxidante (VEMURI *et al*, 1995 (A)). Os fosfolipídeos podem ser de natureza sintética ou natural. Dentre os sintéticos o mais utilizado é o cloreto de dioctadecildimetil-amônio (DODAC) (CARMONA-RIBEIRO *et al*, 1983; CARMONA-RIBEIRO *et al*, 1984) e dentre os naturais utiliza-se principalmente a fosfatidilcolina (PC) (Figura 4).

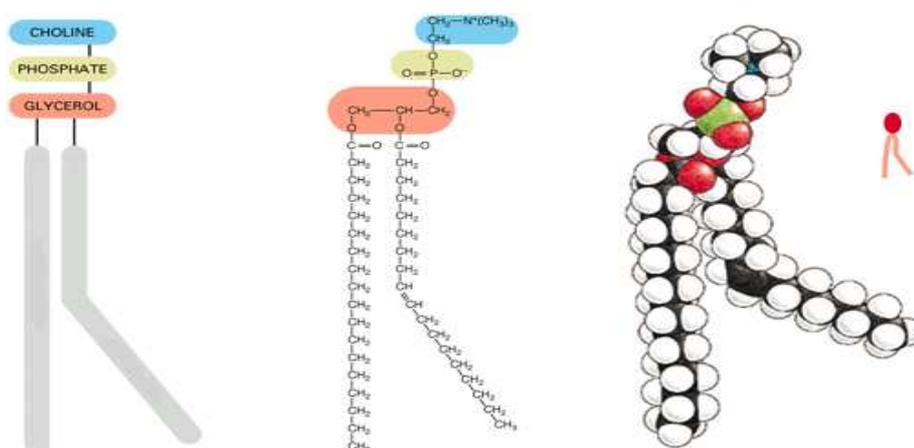


Figura 4: Fosfatidilcolina: Fórmula estrutural, arranjo espacial e representações esquemáticas. Fonte: www.uic.edu (Dezembro 2007).

O colesterol, esteróide utilizado na preparação de lipossomas, tem como objetivo melhorar as características de empacotamento da bicamada. Devido à estrutura de sua molécula e às suas propriedades lipofílicas, o colesterol modula a fluidez da membrana fosfolipídica, reduz a permeabilidade a partir da bicamada e melhora a estabilidade da membrana na presença de fluidos biológicos (Figura 5). Lipossomas isentos de colesterol interagem rapidamente com as proteínas do plasma, as quais extraem os fosfolipídeos da membrana dos lipossomas provocando sua instabilidade física (WEINER *et al*, 1989; VEMURI *et al*, 1995 (A); FANG *et al*, 1997; CÓCERA *et al*, 2003).

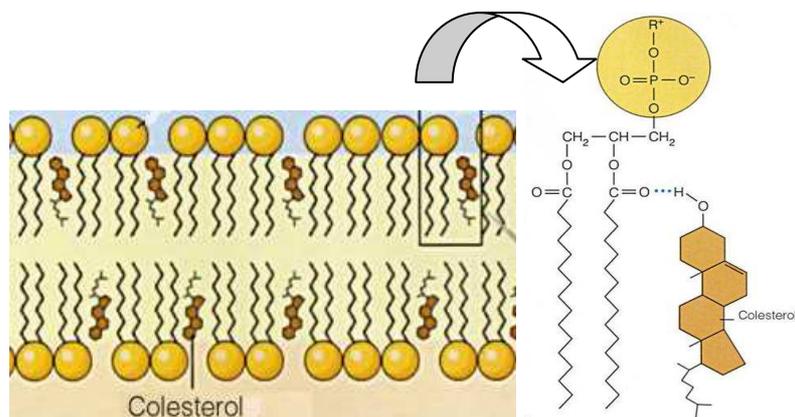


Figura 5: Colesterol na membrana e sua interação com um fosfolípido. Fonte: Alves, 2005.

1.1.2.2. CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas podem ser classificados a partir do método de preparação, número de bicamadas presentes na vesícula ou pelo tamanho. Quando os lipossomas são descritos de acordo com o número de bicamadas, são classificados como vesículas unilamelares (ULV) ou vesículas multilamelares (MLV). Quanto ao método de preparação são descritos como vesículas de evaporação em fase reversa, vesículas de injeção de éter (EIV), entre outros. E quanto ao tamanho, os lipossomas são classificados em vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV). A descrição dos lipossomas através do número de lamelas e tamanho é mais comum que a classificação pelo método de preparação (Figura 6) (Vemuri *et al*, 1995 (A)).

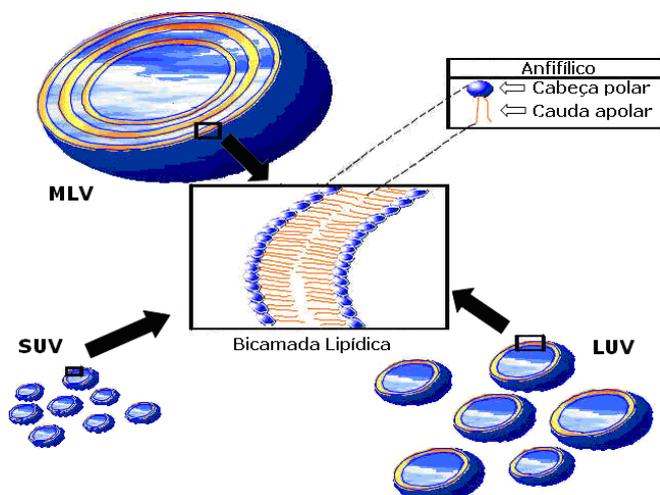


Figura 6: Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de bicamadas. Fonte: Lima, 1995.

1.1.2.3 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

A estabilidade dos lipossomas é fundamental em todos os passos da sua produção e administração, desde o armazenamento até a liberação do fármaco (VEMURI *et al*, 1995 (A)). Um dos maiores problemas que comumente limitam a utilização dos lipossomas é sua estabilidade (SHARMA *ET al*, 1997). Os fatores que alteram a estabilidade dos lipossomas podem ser subdivididos em físicos, químicos e biológicos, os quais estão intimamente relacionados entre si (LASIC, 1998; SAMUNI *et al*, 2000). Dependendo da sua composição, as formulações finais dos lipossomas podem apresentar um baixo tempo de meia vida, em parte devido à instabilidade física e química (SHARMA *et al*, 1997). Outros fatores que devem ser levados em consideração quanto ao estudo da estabilidade são as características da formulação e as condições do meio ambiente. As características da formulação são descritas como: pH, estado de tamponamento, força iônica e solventes. Os fatores do meio ambiente que exercem influência na estabilidade são: temperatura, luz, oxigênio e metais pesados. Estes fatores podem iniciar reações químicas e físicas, como por exemplo, mudanças na distribuição de tamanho das vesículas, oxidação e hidrólise dos lipídeos (VEMURI *et al*, 1995 (A)).

1.1.2.3.1. Estabilidade química

O principal componente das formulações de lipossomas é o lipídeo. Os fosfolipídeos são sensíveis à hidrólise na ligação éster e contêm ácidos graxos insaturados que podem sofrer reações oxidativas. Os produtos destas reações podem causar mudanças na permeabilidade da bicamada e alterar o tempo de meia vida dos lipossomas (VEMURI *et al*, 1995 (A); SAMUNI *et al*, 2000; HEURTAULT *et al*, 2003).

A peroxidação e a hidrólise lipídica são as duas maiores formas de degradação lipídica. A degradação oxidativa dos lipídeos em geral pode ser minimizada pela proteção das preparações lipídicas da exposição à luz; pelo armazenamento em baixas temperaturas, pela adição de antioxidantes como o alfa-tocoferol ou butil hidroxitolueno (BHT) e pela adição de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) à formulação lipídica para remover metais pesados. A hidrólise lipídica leva à formação de liso-fosfatidilcolina (lyso-PC). A presença do lyso-PC acentua a permeabilidade dos lipossomas, o que prejudica a integridade da formulação (VEMURI *et al*, 1995 (A); SAMUNI *et al*, 2000).

O perfil da estabilidade química da molécula do fármaco pode ser inteiramente diferente do perfil da estabilidade da preparação de lipossomas. Desta forma, é essencial o

desenvolvimento de protocolos de estabilidade também para o estudo da integridade do fármaco por um determinado período de tempo (VEMURI *et al*, 1995 (A)).

A maioria dos problemas de instabilidade é mais pronunciada em lipossomas que contém moléculas de baixo peso molecular e fármacos solúveis em água. Para reverter a instabilidade de fármacos solúveis em água, faz-se necessário a conversão da droga polar para uma pró-droga lipofílica com a subsequente incorporação em lipossomas (GULATI *et al*, 1998).

1.1.2.3.2. Estabilidade física

Os lipossomas são vesículas formadas por substâncias anfifílicas, apresentando fosfolipídeos dispersos em uma quantidade excessiva de água. Preparações de lipossomas que apresentam uma heterogeneidade em seu tamanho representam um potencial problema em sua estabilidade física. A distribuição média em tamanho dos lipossomas é determinada pelo tempo e maneira de preparação e pode ser alterada durante o armazenamento (VEMURI *et al*, 1995 (A)).

A instabilidade física pode ainda ser causada pelo vazamento do fármaco encapsulado na vesícula, e/ou agregação ou fusão das vesículas para formar grandes partículas. Estes processos influenciam a performance *in vivo* da formulação, podendo afetar o índice terapêutico do fármaco (SHARMA *et al*, 1997).

Muitas tentativas têm sido realizadas para otimizar a estabilidade dos lipossomas. Entre elas, a modificação da superfície dos lipossomas é um método atrativo para melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* do sistema (TAKEUCHI *et al*, 2000). A estrutura dos lipossomas pode ser reforçada por vários métodos, entre eles, pela polimerização dos fosfolipídeos com um dieno ou um radical acrilato (ISHIHARA *et al*, 2002), pela combinação com polímeros (SUNAMOTO *et al*, 1987) e pela complexação iônica com polieletrólitos naturais (ISHIHARA *et al*, 2002).

A introdução de um grupo hidrofóbico em polímeros solúveis em água como uma âncora para a membrana lipossomal foi investigada por vários pesquisadores (SUNAMOTO *et al*, 1987; WOODLE *et al*, 1992; ISHIHARA *et al*, 2002). A superfície dos lipossomas revestidos com polissacarídeos tendo uma fração colesterol como uma âncora para fixação de cadeias polissacarídicas melhora a estabilidade dos lipossomas, e, além disso, confere uma especificidade à célula alvo (SUNAMOTO *et al*, 1987; ISHIHARA *et al*, 2002). Entretanto, polímeros hidrofóbicos com grupos modificados podem induzir instabilidade aos lipossomas devido à interpenetração do grupo hidrofóbico na membrana lipossomal (SAVVA *et al*, 1999; ISHIHARA *et al*, 2002). Por outro lado, polímeros solúveis

em água capazes de interagir com a superfície da membrana lipossomal têm se mostrado adequados para a estabilização dos lipossomas (ISHIHARA *et al*, 2002).

1.1.2.3.3. Estabilidade biológica

A estabilidade biológica pode ser determinada pelo tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea, o que está diretamente relacionado com a presença de agentes que interagem com os lipossomas (LASIC, 1997; LASIC, 1998). A compatibilidade sanguínea é um importante fator na avaliação dos lipossomas como carreadores de fármacos na corrente circulatória, uma vez que as células sanguíneas iniciam o processo de coagulação imediatamente quando em contato com materiais estranhos (ISHIHARA *et al*, 2002).

Uma ampla variedade de fármacos tem sido incorporada ou associada a lipossomas, um excelente sistema de liberação de fármacos para aplicações sistêmicas, devido ao seu tamanho coloidal, sua facilidade de controle da superfície e propriedades de membrana, sua ampla capacidade carreadora e sua biocompatibilidade (CEH *et al*, 1997; TAKEUCHI *et al*, 2000).

Para exercer atividade terapêutica, faz-se necessário que o sistema carreador contendo o fármaco permaneça tempo suficiente na corrente sanguínea, a fim de atingir o alvo. Entretanto, quando lipossomas são administrados *in vivo*, são rapidamente removidos da corrente circulatória através das células fagocitárias do sistema retículo endotelial (RES) (SENIOR, 1987; SEMPLE *et al*, 1998; TAKEUCHI *et al*, 2000). Algumas pesquisas têm demonstrado que algumas propriedades físicas e químicas dos lipossomas, como, tamanho, composição lipídica, características da superfície (hidrofobicidade, carga, fluidez) e revestimento da superfície exercem influência no tempo de circulação dos lipossomas (ISHIDA *et al*, 1997; SEMPLE *et al*, 1998; TAKEUCHI *et al*, 2000).

Embora o mecanismo exato dos efeitos destes fatores não seja profundamente conhecido, sabe-se que várias proteínas plasmáticas são adsorvidas na superfície lipossomal, sendo a principal forma de eliminação destes carreadores da circulação sistêmica (CHONN *et al*, 1992; TAKEUCHI *et al*, 2000).

O tamanho e a composição lipídica são determinantes na permanência dos lipossomas na circulação. Quanto ao tamanho, à redução do diâmetro dos lipossomas implica em um menor reconhecimento pelo RES e quanto à sua composição lipídica, a inclusão de fosfolípidos saturados e esteróis (colesterol), que reduzem a fluidez da membrana, resultam em uma maior permanência destas preparações na circulação sanguínea (NAGAYASU *et al*, 1999).

A modificação da superfície dos lipossomas é uma das possíveis formas para aumentar o seu tempo de circulação, com baixo reconhecimento pelo RES. Tem sido descrito que formulações contendo gangliosídeos GM1, polietilenoglicol e derivados do ácido glucônico incorporados nos lipossomas, conduzem a uma prolongada meia vida plasmática da formulação administrada por via intravenosa, através da redução do seu reconhecimento pelo RES (ALLEN *et al*, 1987; NAMBA *et al*, 1990 TAKEUCHI *et al*, 2000, TORCHILIN, 2006).

O revestimento polimérico empregando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) é um método alternativo para a modificação da superfície dos lipossomas, conferindo proteção às vesículas contra a opsonização e mecanismos de eliminação. Além disso, consiste em um método de extrema simplicidade através da mistura da suspensão lipossomal com a solução polimérica, não promovendo qualquer ligação química entre o polímero e a molécula lipídica (GABIZON *et al*, 1997; TAKEUCHI *et al*, 2000; TORCHILIN, 2006).

A presença de grupos inertes na superfície dos lipossomas reduz as interações com macromoléculas e desta forma estabilizam estas vesículas. A estabilidade biológica e coloidal dos lipossomas foi drasticamente aumentada pelo seu revestimento com polímeros hidrofílicos inertes, impedindo a penetração e adsorção de opsoninas e promovendo um baixo reconhecimento dos lipossomas pelas células do sistema retículo endotelial. Estes lipossomas revestidos de longa permanência na circulação sangüínea são chamados de lipossomas estericamente estabilizados e exibem uma meia vida mais extensa comparados aos chamados lipossomas convencionais. Devido a esta habilidade de se evadirem das defesas do sistema imune, eles também são referidos como “lipossomas secretos” (Stealth Liposomes) (SHARMA *et al*, 1997; FARRELL *et al*, 1997; LASIC, 1998; TORCHILIN, 2006).

Lipossomas catiônicos permanecem por um tempo maior na corrente sangüínea do que os lipossomas ácidos e neutros, já que as formulações catiônicas conseguem escapar da fagocitose. O mecanismo de fuga dos lipossomas catiônicos está relacionado à interação destes com as células do sangue (AOKI *et al*, 1997). Os lipossomas catiônicos exibem elevada afinidade pela membrana das células, podendo ser usados para a liberação de material genético exógeno intracelularmente via fusão com a membrana das células (SHARMA *et al*, 1997).

1.1.2.4. METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DE LIPOSSOMAS

1.1.2.4.1 Preparo dos lipossomas

Dependendo da característica dos lipídeos utilizados e de sua geometria, a qual está diretamente relacionada com a natureza dos grupos polares e cadeias anfifílicas, três tipos de agregados podem se formar quando lipídeos anfifílicos são dispersos em água (Figura 7).

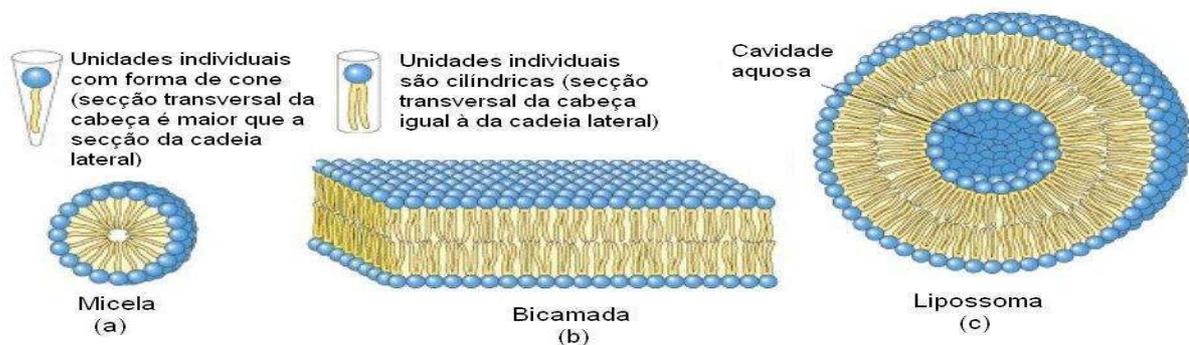


Figura 7: Agregados de lipídeos anfifílicos que se formam em presença de água. (a) Em micelas esféricas, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos estão protegidas no núcleo da esfera, onde não há água. (b) Em uma bicamada todas as cadeias laterais estão protegidas da interação com a água, com exceção daquelas que se encontram nas extremidades. (c) Quando uma bicamada bidimensional extensa se curva sobre si mesma, forma-se um lipossoma, uma vesícula fechada, tridimensional, que encerra uma cavidade aquosa. Fonte: kvhs.nbed.nb.ca/phospholipid (Dezembro 2007).

Os diferentes métodos de preparação de lipossomas em geral diferem entre si pelo modo de dispersão dos fosfolipídeos na fase aquosa. Como consequência, levam à formação de vários tipos de vesículas, as quais diferem pelo tamanho, estrutura e capacidade de encapsulação (VEMURI *et al*, 1995 (A); LIMA, 1995; LASIC, 1989). São exemplos de metodologias de preparação: hidratação do filme lipídico, sonicação, extrusão, microfluidização, desidratação-reidratação, congelamento-descongelamento, injeção de etanol, injeção de clorofórmio, evaporação de fase reversa, infusão de éter e remoção de detergente, entre outros (LIMA, 1995).

1.1.2.4.1.1. Hidratação do filme lipídico (HFL)

A preparação de vesículas multilamelares por hidratação de filme lipídico foi primeiramente descrita em 1965 por Bangham *et al*, consistindo até hoje em um método básico de preparação de lipossomas contendo substâncias ativas (Figura 8).

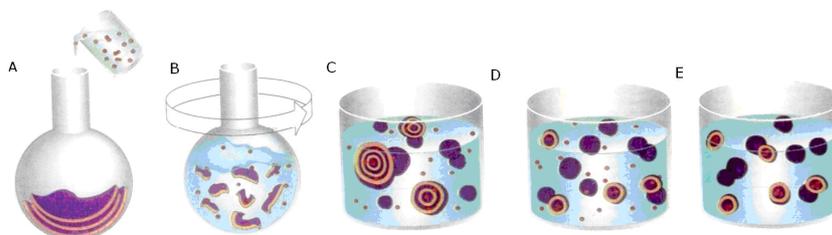


Figura 8: Hidratação do filme lipídico: O filme lipídico seco contendo o fármaco lipossolúvel é hidratado com uma solução aquosa do fármaco hidrossolúvel (A). Sob agitação o filme lipídico se desprende das paredes do balão (B) e lipossomas multilamelares são formados (C). Um tratamento posterior, por ultrassom ou extrusão, leva à obtenção de vesículas unilamelares (D). As moléculas de fármaco não encapsuladas podem ser removidas por diálise, filtração em gel ou ultracentrifugação (E). Fonte: www.avantilipids.com (Dezembro 2007).

1.1.2.4.2. Determinação do diâmetro dos lipossomas

A determinação e o controle do diâmetro dos lipossomas são imprescindíveis, uma vez que a eficiência de encapsulação de um fármaco e o seu comportamento *in vivo* (passagem através de barreiras e capturação celular) estão diretamente relacionados ao tamanho das vesículas (MATSUZAKI *et al*, 2000; ALVES, 2005).

Várias técnicas permitem determinar de maneira exata o diâmetro dos lipossomas. São exemplos, espalhamento de luz clássico por análise espectrofotométrica, dinâmica do espalhamento de luz e a microscopia eletrônica (Lima, 1995).

1.1.2.4.2.1. Espalhamento de luz difusa (*light scattering*)

Este método está baseado na propriedade das partículas em suspensão se difundirem por todas as direções e estarem em movimento permanente (movimento Browniano), espalhando o feixe de luz quando este incide sobre elas. A intensidade do espalhamento de luz detectada está diretamente relacionada à velocidade de difusão das partículas, determinada por seu tamanho, que ocorre tanto mais rápida quanto menor forem as partículas. Em um dado ponto, a medida da luz difundida através de uma preparação de vesículas varia com o tempo, representando na verdade a soma de

numerosas ondulações difundidas individualmente através das partículas. A análise de tais flutuações permite medir o coeficiente de difusão (D) das partículas, o qual pode ser utilizado para determinar diâmetro hidrodinâmico (d(H)) médio considerando-se as vesículas como esferas perfeitas [Lima, 1995; Dynamic Light Scattering, disponível em www.malvern.co.uk].

1.1.2.4.3. Separação do fármaco encapsulado

Após a preparação dos lipossomas contendo o fármaco, é possível identificar a presença fármaco tanto nos lipossomas (fração encapsulada), como também dissolvido na forma livre no meio aquoso (fração não encapsulada). Para que possam ser empregados como sistemas de liberação controlada, na maioria dos casos, é necessária a remoção completa do fármaco livre. Vários métodos têm sido empregados para separação da fração livre do fármaco. Dentre estes se destacam a cromatografia de troca iônica, a ultrafiltração e a cromatografia de exclusão por tamanho (JEDERSTRÖM *et al*, 1981; VEMURI *et al*, 1995(B)).

A cromatografia de exclusão por tamanho é o método mais utilizado devido a sua simplicidade, adaptabilidade a vários tipos de preparações, reprodutibilidade e aspecto quantitativo. Além disso, como esta técnica não promove alterações na amostra, permite que as frações coletadas possam ser submetidas a análises posteriores (JEDERSTRÖM *et al*, 1981; GRABIELLE-MADELMONT *et al*, 2003; ALVES, 2005). Pode-se também determinar a fração de fármaco encapsulado tratando-se a formulação com detergente capaz de promover a ruptura dos lipossomas e completa liberação do fármaco no meio aquoso circundante, a partir do qual se realiza um ensaio quantitativo (VEMURI *et al*, 1995 (A)).

A cromatografia de exclusão por tamanho (ou SEC – *Size Exclusion Chromatography*), também denominada permeação em gel ou filtração em gel, é um tipo de cromatografia líquida, na qual a separação das moléculas fundamenta-se na diferença de tamanho (ou peso molecular) dos compostos presentes na amostra segundo sua passagem através de uma coluna cromatográfica preenchida com uma matriz porosa empacotada, sendo as moléculas eluídas em ordem decrescente de tamanho. Na coluna de filtração em gel, as moléculas da amostra sofrem uma partição entre o eluente (fase móvel) e a facilidade de acesso aos poros da matriz (fase estacionária). As moléculas pequenas são capazes de penetrar nos poros da matriz, o que promove um retardo na sua eluição, enquanto que moléculas maiores escapam aos poros da matriz, sendo eluídas mais rapidamente pela fase móvel. O fato de a separação depender somente do tamanho

molecular promove uma seletividade única e aumenta consideravelmente a resolução quando combinadas com outras técnicas de cromatografia.

O volume da amostra é um dos mais importantes parâmetros da cromatografia de exclusão, sendo expresso como uma porcentagem do volume total da coluna. O emprego de pequenos volumes ajuda a evitar sobreposição dos picos de separação, sendo indicado para boa resolução um volume de amostra de 0,5-5% do volume total da coluna (*Gel Filtration*, disponível em www.chromatography.amershambiosciences.com).

1.1.2.5 APLICAÇÕES

Os lipossomas foram primeiramente descritos por Bangham, Standinsh, and Watkins in 1965 como vesículas de bicamada lipídica fechada. Desde então, a tecnologia dos lipossomas tem evoluído rapidamente para sistemas empregando uma ampla variedade de aplicações. O desenvolvimento de produtos fundamentados na tecnologia da encapsulação em lipossomas para aplicação terapêutica nos últimos 15 anos tem resultado na aprovação de diversos medicamentos para uso clínico (Tabela 6) (GOYAL *et al*, 2005; TORCHILIN, 2005; COUVREUR, VAUTHIER, 2006(b)). O crescente interesse pelo emprego desta tecnologia pode também ser evidenciado pelo número de patentes envolvendo a preparação de lipossomas registradas nas bases internacionais na última década (Figura 9).

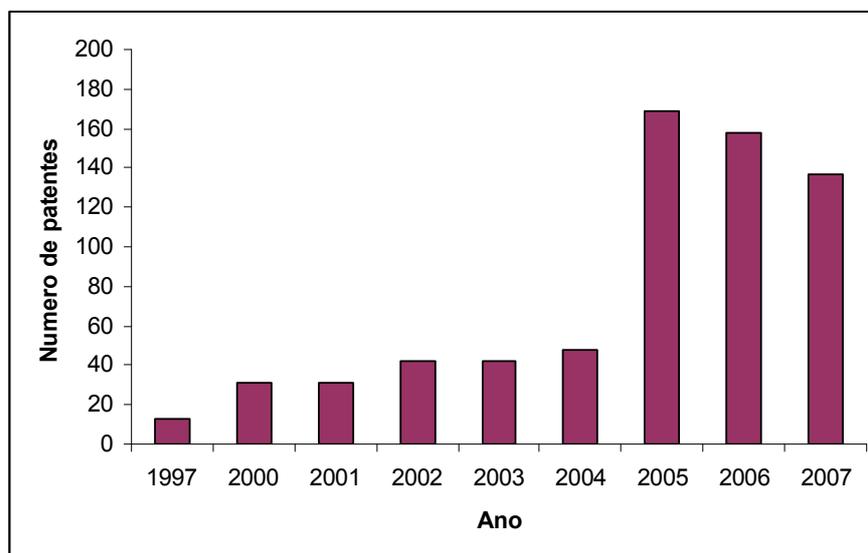


Figura 9: Número de registros internacionais de patentes depositadas via PCT envolvendo produção e utilização de lipossomas. Fonte: WIPO database (Dezembro/2007).

Tabela 6: Fármacos associados a lipossomas aprovados para aplicação clínica ou submetidos à avaliação clínica (GOYAI *et al*, 2005; TORCHILIN, 2005; COUVREUR, VAUTHIER, 2006(A) COUVREUR, VAUTHIER, 2006(B)).

Princípio Ativo	Nome do produto	Indicação Terapêutica
Daunorrubicina	DaunoXome [®]	Sarcoma de Kaposi
Doxorrubicina	Mycet [®] Doxosome Doxil [™]	Associação na terapia de câncer de mama recorrente
Doxorrubicina em PEG-lipossomas	Doxil/Caelyx [®]	Sarcoma de Kaposi refratário; câncer ovariano; câncer de mama recorrente
Anfotericina B	Ambisome [®] Amphotec [®] Amphocil [®]	Infecções fúngicas
Citarabina	DepoCyt [®]	Meningite linfomatosa
Vincristina	Onco TCS [®]	Linfoma não Hodgkin's
Lurtotecan	NX211 [®]	Câncer ovariano
Nistatina	Nyotran [®]	Agente antifúngico tópico
All-trans-Ácido Retinóico	Altragen [®]	Leucemia promielocítica aguda, linfoma não Hodgkin's, Sarcoma de Kaposi, carcinoma nas células renais.
Compostos de platina	Platar [®]	Tumores sólidos
Amicacina	Amikacin	Infecções bacterianas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , e <i>Enterobacter</i> .
HLA-B7 Plasmideo	Allovectin-7 [™]	Melanoma

1.2. RETINOIDES

1.2.1. MECANISMO DE AÇÃO FARMACOLÓGICA

De acordo com a definição da IUPAC e da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB), *retinóides* é o termo empregado para designar uma classe de compostos cuja estrutura química consiste em quatro grupos isoprenóides unidos de modo cabeça-cauda. O esqueleto dos retinóides naturais é constituído por um anel não

aromático de seis átomos de carbono com uma cadeia lateral poliprenóide que é, com poucas exceções, terminada com um grupo funcional constituído de carbono e oxigênio (figura 10). O metabolismo e o catabolismo dos retinóides provocam o rearranjo destas três partes estruturais do esqueleto dos retinóides justificando a existência de vários análogos com efeitos biológicos potencialmente diversos (IUPAC-IUB, 1983; GUNDERSEN, BLOMHOFF, 2001).

Sporn e Roberts sugeriram, em 1985, que os retinóides fossem definidos como uma classe de substâncias que pode iniciar uma resposta biológica pela ligação e ativação de um receptor específico ou um conjunto de receptores. Entretanto, o mecanismo de ação destes compostos permaneceu desconhecido até 1987, quando foram descobertos receptores nucleares para o ácido retinóico (GIGUERE, *et al.* 1987; PETKOVICH, *et al.* 1987; BRAND, *et al.* 1988; UMESONO, *et al.* 1988; MANGELSDORF, *et al.* 1990; MANGELSDORF, *et al.* 1991; LEVIN, *et al.* 1992). Os receptores para o ácido retinóico, identificados como membros de uma superfamília de receptores intranucleares, atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, sendo ativados pelos isômeros e metabólitos do ácido retinóico. Estes receptores foram classificados em RAR α,β,γ e RXR α,β,γ com base em diferenças entre os aminoácidos que compõem sua estrutura, resposta frente aos diferentes retinóides e habilidade em modular a expressão de genes específicos. Estas alterações podem resultar no aumento ou redução da expressão destes nos diferentes tipos de tecidos ou células malignas (MANGELSDORF, *et al.* 1990; MANGELSDORF, *et al.* 1991; HEYMAN, *et al.* 1992; BOEHM, *et al.* 1994; LEHMANN *et al.*, 2001; DAVIDOVICI *et al.*, 2007; XU, 2007).

O ácido *all-trans*-retinóico liga-se com afinidade semelhante aos três tipos de receptores RAR (HEYMAN, *et al.* 1992; LEVIN, *et al.* 1992; CHANDRARATNA, 1996; LEHMANN *et al.*, 2001). Por outro lado, o ácido 9-*cis*-retinóico apresenta elevada afinidade para ligação a ambos os grupos de receptores RAR e RXR. Entretanto, ainda não se pode afirmar que o ácido 9-*cis*-retinóico seja o ligante fisiológico para RXR (KITAREEWAN, *et al.* 1996; NAPOLI, 1999; DRAGNEV *et al.*, 2001; DAVIDOVICI *et al.*, 2007), uma vez que outros metabólitos do retinol também agem como ligantes que ativam fatores de transcrição nesta família de receptores e ainda, os ácidos *all-trans*-retinóico, 9-*cis*-retinóico e 13-*cis*-retinóico são isômeros geométricos, podendo sofrer interconversão *in vivo* (CHANDRARATNA, 1996; KLAASSEN, *et al.* 1999).

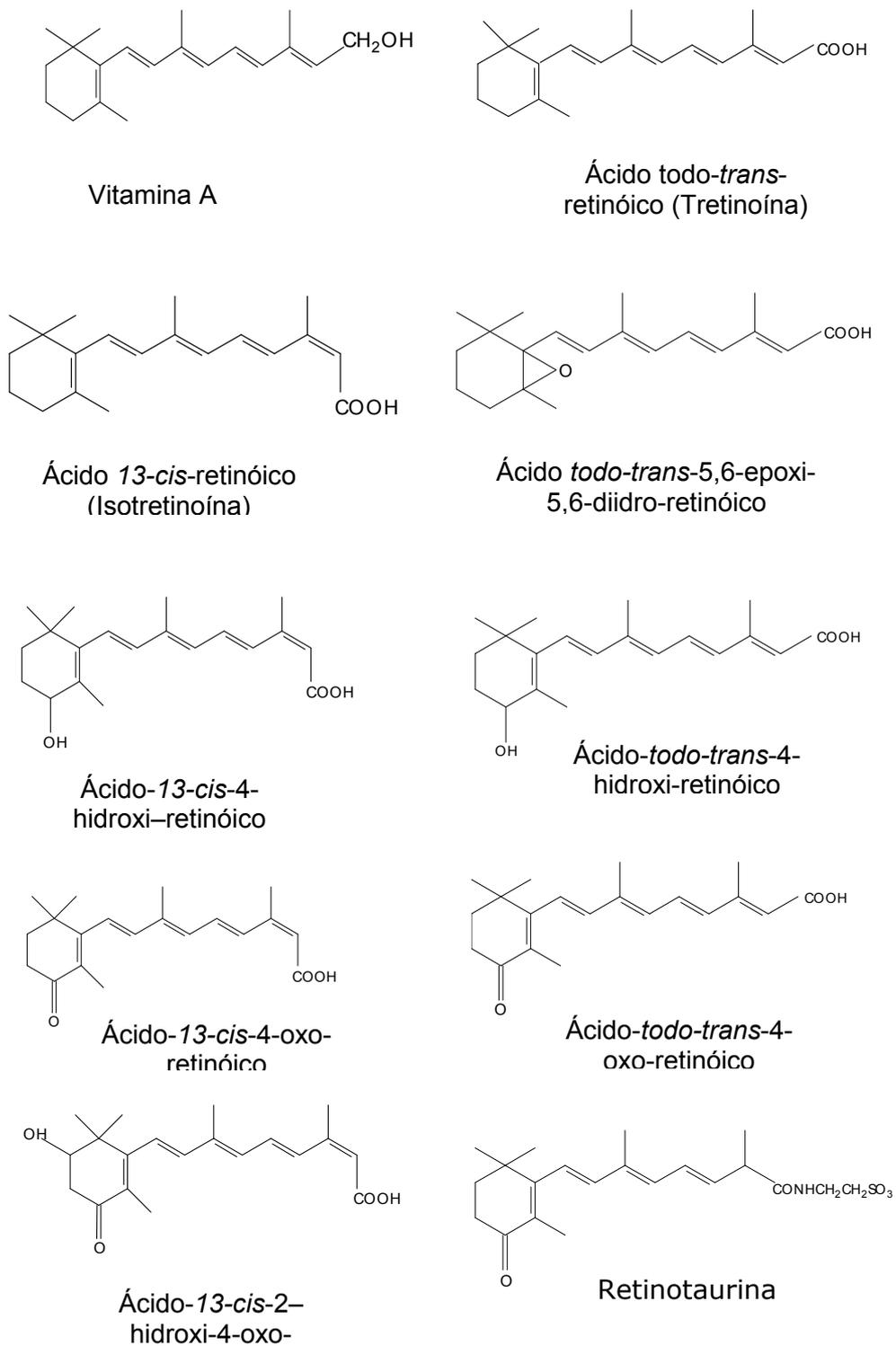


Figura 10 : Estrutura molecular de retinóides.

Os retinóides estão envolvidos na proliferação e diferenciação de vários tipos celulares durante o desenvolvimento fetal e também ao longo da vida, como resultado da ativação do complexo retinóide-receptor (SPORN, ROBERTS, 1985). Por outro lado, a ativação deste complexo pode bloquear a ação de outros fatores de transcrição como o AP1, cuja expressão mostra-se exacerbada em várias condições hiperproliferativas e inflamatórias (NAGPAL, *et al.* 1995; CHANDRARATNA, 1996).

Como resultado dos mecanismos de ação genômica e não genômica dos retinóides, seus diferentes efeitos biológicos são dependentes da expressão dos receptores específicos, do tipo e concentração dos compostos retinóides presentes na célula, da expressão das proteínas de ligação e das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos retinóides *in vivo* e *in vitro* (KLAASSEN, *et al.* 1999; NAPOLI, 1999).

1.2.2. Câncer e quimioprevenção:

O uso dos retinóides na terapia do câncer tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, devido sua capacidade de inibir a proliferação de células cancerígenas e induzir a diferenciação de células malignas, fazendo destes compostos um dos mais proeminentes grupos de agentes quimiopreventivos (ORTIZ *et al.*, 2002; SUN, LOTAN, 2002).

A aplicação na terapia do câncer pode ser exemplificada pela utilização bem sucedida da tretinoína no tratamento da leucemia promielocítica aguda e da isotretinoína no tratamento de leucemia mielóide crônica juvenil e linfomas de células T cutâneas. Numerosos estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado o efeito sinérgico de retinóides associados a outros agentes quimioterápicos. A combinação da tretinoína e isotretinoína com interferon- α -2a (IFN- α), tamoxifeno, cisplatina, paclitaxel tem mostrado resultados positivos *in vitro* e *in vivo* contra células derivadas de câncer da cabeça e pescoço, mama, pulmão, células ovarianas e cervicais, contra leucemia mielóide crônica e mielomas múltiplos avançados (ORTIZ *et al.*, 2002., KANG *et al.*, 2004; GARATTINI *et al.*, 2007). Em 2004 Lara-Jimenez e colaboradores conseguiram demonstrar que o ácido retinóico induz a apoptose em células leucêmicas observando a cura em 75% dos pacientes com APL (Leucemia promielocítica aguda).

São inúmeras as evidências de que os retinóides podem ser úteis na prevenção do desenvolvimento de vários tipos de neoplasias entre elas o neuroblastoma, o carcinoma celular escamoso cutâneo em indivíduos de moderado a alto risco e carcinoma celular escamoso na cabeça e pescoço apesar de limitações como toxicidade e resistência adquirida, (HONG *et al.*, 1990; MOON *et al.*, 1997; REYNOLDS *et al.*, 2003, SMITH & SABA,

2005). Dragnev *et al* em 2000, através de estudos clínicos e pré-clínicos utilizando retinóides como agentes de prevenção do câncer, reportaram que derivados da vitamina A possuem atividade no tratamento específico de lesões pré-malignas e redução da incidência de tumores primários e secundários principalmente em pacientes com câncer na cabeça, pescoço, pulmão e fígado, porém não ainda se sabe como os retinóides irão prevenir câncer primário nestes sítios.

O desenvolvimento de retinóides com menor toxicidade e mais efetivos, que atuam somente em receptores específicos, aumentam as chances de utilizar esta classe de compostos como quimioprevenção em indivíduos de alto risco (DI GIOVANNA, 1998), doses de até 0,5mg/Kg/dia de isotretinoína, via oral, podem ser usadas com segurança em pacientes com Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva para uso em longo prazo com possível quimioprevenção do câncer (FINE *et al*, 2004)

Silver *et al* em 2003, notaram que a associação em longo prazo da isotretinoína com a quimioterapia convencional (α -2- β interferon e methotrexate) foi capaz de estabilizar o epitélio e diminuir a progressão da doença no controle da papilomatose respiratória recorrente, já Duvic *et al*, 2003 trouxeram evidências de maior resposta e melhor tolerância ao tratamento de linfoma cutâneo de células T, através de um estudo em longo prazo com regimes combinados incluindo a isotretinoína oral na terapia. Combinações retinóides-não retinóides bem como com outras classes de agentes quimiopreventivos são promissoras para diminuir a incidência de tumores malignos do trato respiratório e digestivo (SMITH & SABA, 2005).

1.2.2.1 LEUCEMIAS

As leucemias são doenças proliferativas de curso progressivo e irreversível do tecido hematopoiético. As células leucêmicas crescem à custa das células normais às quais terminam por substituí-las, levando a deficiência e finalmente à falência da medula óssea. Estas células leucêmicas são quase sempre liberadas ao sangue circulante e o ritmo de liberação está relacionado ao estágio e o tipo de leucemia. Uma série de observações e estudos tem demonstrado, de modo cada vez mais convincente, que as leucemias dos mamíferos são em sua maioria causadas por vírus do tipo RNA. Os fatores genéticos também possuem importância na eclosão das leucemias, demonstrando alta incidência em indivíduos com defeitos cromossômicos (LORENZI, 2003)

1.2.2.1.1 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) foi descrita como forma independente de leucemia há 150 anos, em pacientes que morreram em consequência de intensa leucocitose e hepato-esplenomegalia. É uma doença mieloproliferativa clonal das células pluripotentes da medula óssea e constitui 14% de todas as leucemias, com uma incidência anual de 1,6 casos por 100 mil indivíduos (KANTARJIAN, *et al*, 1999).

O clone anômalo originado dessa célula se expande e infiltra o parênquima medular, de modo lento, mas progressivo, em detrimento da proliferação das células normais. O achado da anomalia cromossômica, denominada de translocação t(9:22), presente em mais de 90% de casos de LMC típica, é sugerido como uma possível origem da doença. Sabe-se que várias situações podem levar a essa alteração cromossômica tais como: radiações, intoxicações por drogas (benzeno) e infecção virótica (BARBOZA, 2000, LORENZI, 2003; TALLMAN, 2004).

Com o progresso da biologia molecular, foi possível demonstrar que a anomalia cromossômica t(9:22) (q34;q11) surgia da translocação entre as partes dos cromossomos 9 e 22, as chamadas bandas q34.1 e q11.21 respectivamente. Isso dá origem a um cromossomo 9 atípico, denominado 9q+, e a um cromossomo 22 também atípico, 22q-, denominado de Ph₁ (cromossomo Filadélfia), presente na maioria dos casos de LMC (BARBOZA, 2000; TALLMAN, 2004; DEWALD *et al*, 2004). Embora observado em outras leucemias e até mesmo em condições neoplásicas não hematopoiéticas o cromossomo Filadélfia tem sido reconhecido como marcador citogenético da LMC e sua detecção tem implicações no diagnóstico, prognóstico e na terapêutica da doença. A célula leucêmica apresenta uma mieloproliferação contínua resultante, provavelmente, de três mecanismos principais: alteração da adesão das células progenitoras às células estromais e à matriz extracelular, manutenção de um sinal mitogênico constante e resistência à apoptose (BERGANTINI *et al*, 2005).

Preferencialmente, a LMC incide na quarta e quinta décadas de vida, predominando ligeiramente no sexo masculino. Raramente incide antes dos 20 anos de idade. Na infância e adolescência, a doença tem evolução clínica mais severa, cursando com quadro de hemorragias, que é muito raro na forma adulta (KANTARJIAN, *et al*, 1999; LORENZI, 2003).

A doença evolui de forma lenta, mas progressiva. Com frequência o diagnóstico ocorre em média cerca de 2 meses após a doença já ter se instalado. As características de evolução crônica da LMC costumam persistir por tempo médio de 3 a 5 anos. Sistemáticamente, a doença evolui para uma fase de agravamento e termina por se

transformar numa forma leucêmica mielóide aguda. São descritas 3 fases da LMC, sendo estas, fase crônica, fase de aceleração e fase de agudização (LORENZI, 2003).

1.2.2.2. Tratamento Convencional da LMC

O tratamento baseia-se no emprego de quimioterápicos capazes de promover a mielossupressão. Os fármacos comumente utilizados são a hidroxiuréia, interferon alfa e o mesilato de imatinibe. Entretanto a única modalidade terapêutica considerada curativa tem sido os transplantes alogênico de medula óssea, cujo sucesso depende de múltiplos fatores que incluem idade, a fase clínica da doença e a histocompatibilidade entre o doador e o receptor (BERGANTINI et al, 2005).

Apesar dos avanços terapêuticos que incluem o mesilato de imatinibe, o transplante de medula óssea e a infusão de linfócito do doador, que possibilitou o aumento significativamente a perspectiva de vida dos portadores de LMC, mecanismos biológicos que privilegiam a seleção das células hematopoiéticas malignas sobre as células normais na LMC tem sido responsáveis pelo insucesso terapêutico em muitos casos, essas mudanças provocam alterações no processo de apoptose celular e escape das células leucêmicas à resposta imune (BERGANTINI et al, 2005).

1.2.3. Mecanismos de resistência aos retinóides

A resistência a multidrogas tem sido o maior problema na quimioterapia de alguns fenotipos de células malignas. Muitos fatores, ainda não bem esclarecidos, podem influenciar a resistência como a expressão aberrante de proteínas e receptores nucleares para os retinóides bem como o aumento do seu catabolismo intracelular e seqüestro por proteínas citoplasmáticas. Entretanto, o maior mecanismo responsável pela resistência a multidrogas tem sido reconhecidamente a atividade da P-glicoproteína (Pgp) relacionada ao transporte de diferentes compostos através da membrana celular (WARRELL, 1993; KIZAKI et al, 1996; GALLAGHER, 2002; ORTIZ et al, 2002; STROMSKAYA et al, 2005).

A atividade da Pgp, em células leucêmicas, demonstrou ser regulada pelos receptores $RAR\alpha$, sendo, portanto induzida pelos retinóides que apresentam maior afinidade por este subtipo de receptor, diminuído assim a concentração intracelular do fármaco.

Através de avaliações clínicas e citogenéticas de alguns autores como Warrell (1993), Kizaki e colaboradores (1996) e Gallagher (2002) foi possível observar a

existência de dois tipos de resistência a tretinoína em pacientes com leucemia promielocítica aguda; a resistência primária e a resistência secundária adquirida, estando envolvidos no mecanismo de resistência tanto elementos sistêmicos como aumento do catabolismo, seqüestro por CRABP, bem como elementos celulares que limitam a entrada no núcleo ou diminuem o transporte nuclear através da expressão de proteínas aberrantes, ou diminuem a concentração intracelular através do catabolismo intra-celular ou por efluxo celular via Pgp.

1.2.4. ESTABILIDADE

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem em velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de várias condições, tais como, a concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou da presença de catalizadores. A decomposição das substâncias ativas nas formas farmacêuticas ocorre através de vias como hidrólise, oxidação e redução, rancemização, descarboxilação e fotólise (LACHMAN *et al*, 2001; TONNESEN, 2001).

A decomposição por oxidação e redução de fármacos é responsável pela instabilidade de um número considerável de preparações farmacêuticas, como por exemplo, esteróides, vitaminas e antibióticos. Estas reações são mediadas por radicais livres ou por oxigênio molecular. A forma mais comum de decomposição oxidativa que ocorre nas preparações farmacêuticas é a autooxidação que envolvem radicais livres num processo em cadeia. Normalmente, reações de autooxidação podem ser definidas como reações de um material com oxigênio molecular, produzindo a cisão de ligações covalentes de forma que cada átomo ou grupo envolvido retenha um dos elétrons da ligação covalente original. Estes radicais são bastante insaturados retendo facilmente elétrons de outras substâncias, oxidando-as (LACHMAN *et al*, 2001; TONNESEN, 2001).

A decomposição de fármacos, como resultado da absorção da radiação luminosa, tem recebido cada vez mais atenção devido à estrutura química complexa de muitos fármacos, constituindo parte integral dos testes de estabilidade sob condições forçadas, segundo o FDA (Food and Drug Administration). As características intrínsecas de fotoestabilidade de fármacos e produtos devem ser avaliadas para demonstrar que a exposição adequada à luz não resulta em mudanças inaceitáveis (LACHMAN *et al*, 2001; TONNESEN, 2001; IOLE *et al*, 2005).

Os retinóides são compostos instáveis, apresentando sensibilidade ao oxigênio, altas temperaturas e luz. Estudos sobre a estabilidade da isotretinoína por métodos de microcalorimetria, calorimetria exploratória diferencial, espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cristalografia revelaram a ocorrência de

modificações físicas e químicas nas características do fármaco, em razão de exposição ao oxigênio atmosférico, luz, umidade e altas temperaturas (TAN *et al*, 1992; TAN *et al*, 1993; BERBENNI *et al*, 2001).

Os estudos cristalográficos da estrutura do ácido retinóico e seus isômeros demonstraram a existência de diferentes formas geométricas dos cristais entre os compostos. Na ausência de oxigênio estas substâncias sofrem apenas mudanças físicas com o decorrer do tempo. A decomposição dos retinóides na presença de ar atmosférico resulta em grande número de produtos, originados principalmente da cisão oxidativa do sistema conjugado de dupla ligação. O estágio de degradação depende da pressão parcial de oxigênio, sendo acelerado com a presença de luz e altas temperaturas, e ocorre sem nenhuma seletividade por uma dupla ligação em particular. A radiação UVA de maior contribuição para fotodegradação dessa classe de compostos (TASHTOUSH *et al*, 2008).

O aparecimento de componentes amorfos está diretamente relacionado à existência de um processo oxidativo que muda a estrutura molecular, induzindo uma perda parcial do empacotamento cristalino (MALPEZZI, *et al* 1998).

1.2.5. ISOTRETINOÍNA

1.2.5.1. POSOLOGIA

O uso oral de 0,6 a 0,75 mg/kg/dia de isotretinoína por 16 a 35 semanas produz excelente resposta em pacientes com acne vulgar. Estes resultados foram comprovados por Al-Kahawajan em 1996, em um grupo de 156 pacientes dos quais 85% apresentavam acne severa ou moderada resistente à terapia convencional e 15% apresentavam acne cística nodular, sendo que em ambos os casos houve completa remissão da doença.

O uso terapêutico da isotretinoína, no tratamento da acne severa e resistente às terapias convencionais, varia de 0,5 a 2 mg/Kg/dia por 16 a 24 semanas (ALLEN, BLOXHAM, 1989; WHITE, 1999; MARTINDALE, 2007; DRUGDEX, 2008).

A concentração de 1 μ Mol foi capaz de promover a diferenciação celular em níveis próximos a 100% em cultura de células de leucemia promielocítica humana conforme demonstrado por Breitman e colaboradores, em 1981. Ainda segundo estes autores, a isotretinoína e o ácido *all-trans*-retinóico (tretinoína) exercem atividade semelhante. Warrel *et al* (1991) propuseram a dose oral de 45mg/Kg/dia de tretinoína como sendo capaz de promover a indução da diferenciação celular na leucemia promielocítica aguda, dose esta relata também pelo Martindale, compendio farmacêutico, em 2007.

1.2.5.2 FARMACOCINÉTICA

O perfil farmacocinético da isotretinoína é análogo ao da vitamina A. Após administração oral, o pico de concentração plasmática da isotretinoína é atingido em cerca de 2 a 4 horas. Aproximadamente 20% da isotretinoína são absorvidos quando administrada com estômago vazio, aumentando para 40% quando em presença de alimento (NANKERVIS, 1995; WHITE, 1999; MARCUS, COULSTON, 2001). Isotretinoína e tretinoína são interconvertidas *in vivo*, e cerca de 20% a 30% da dose de isotretinoína são aparentemente metabolizados nesta rota. O principal metabólito da isotretinoína é a 4-oxo-isotretinoína que é excretada pela bile após ser conjugada com o ácido glicurônico, possuindo meia-vida média de eliminação de 25 horas. Com a administração repetida, a concentração de equilíbrio é estabelecida em 5 a 7 dias (BRAZZELL, COLBURN, 1982; AHFS- DRUG INFORMATION, 1998; MARCUS, COULSTON, 2001).

Estudos farmacocinéticos realizados em animais recebendo doses orais de isotretinoína marcada indicam que esta substância lipofílica possui distribuição tissular de 15 minutos com máximo de 1 hora e declínio até níveis não detectáveis em um período de 24 horas em muitos tecidos, tais como o hepático, renal, ovariano, adrenal e glândulas lacrimais (ALLEN, BLOXHAM, 1989; AHFS-DRUG INFORMATION, 1998; DRUGDEX, 2008). A isotretinoína é excretada pela via urinária, sendo possível detectar na urina a presença de quantidades baixas de isotretinoína não conjugada. Entretanto, a excreção de cerca de 50 a 74% da isotretinoína administrada ocorre nas fezes, como resultado de uma absorção incompleta, eliminação biliar ou recirculação enteroepática (ALLEN, BLOXHAM, 1989).

1.2.5.3. EFEITOS ADVERSOS

A maioria das reações adversas envolve a pele e membranas mucosas, sistema nervoso, músculo-esquelético, hematopoiético e linfático, gastrointestinal, cardiorespiratório e genitourinário. Quando administrada no primeiro trimestre de gestação, a isotretinoína pode ocasionar abortos espontâneos ou má formação do feto, sendo esta também observada quando a gestação ocorre dentro de quatro meses após o término do tratamento (LEBOWITZ *et al*, 1988; MARTINDALE, 2007). Devido à isotretinoína ser um análogo da Vitamina A, a maioria dos efeitos colaterais é similar aos encontrados na síndrome de hipervitaminose A (ELLIS *et al*, 2001).

As reações adversas envolvendo o sistema nervoso central apresentam-se na forma de dores de cabeça severas, pseudotumor cerebral (papiloedema e/ou aumento da pressão por elevação do fluído cerebrospinal), depressão, síndrome do dissulfiram,

diminuição da libido, impotência e insônia (LEBOWITZ *et al*, 1988; BIGBY *et al*, 1998; MARTINDALE, 2007). Na pele há vários relatos de casos envolvendo erupções cutâneas papulares clinicamente similares a pitiríases rubra papilar, infecção por *Varicella zoster*, reações vasculares com febre e petéquias, eritema noduloso, eritema multiforme, distrofia das unhas, leucoderma, exacerbação da acne, calcificação dos cistos faciais e alteração da textura do cabelo (BIGBY *et al*, 1998; MARTINDALE, 2007).

Os efeitos hematológicos são clinicamente visualizados pelo aumento da porcentagem de sedimentação dos eritrócitos, contribuindo conseqüentemente para o decréscimo dos eritrócitos e leucócitos e o aparecimento de trombocitopenia. A isotretinoína também pode causar a diminuição da concentração de hemoglobina e do hematócrito, ocorrendo sangramentos, hematomas, agranulocitose principalmente em pacientes com hemofilia A. (BIGBY *et al*, 1998, ALLEN, BLOXHAM, 1989; MARTINDALE, 2007).

O mecanismo pelo qual a isotretinoína induz o aparecimento de pancreatite é relatado como efeito da hipertrigliceremia, já que este fármaco aumenta os níveis de triglicérides, de colesterol LDL e diminui os níveis sanguíneos de colesterol HDL. Hipertrigliceremia e hipercolesterolemia induzidas são doses dependentes e ocorrem em cerca de 25% dos pacientes em uso do fármaco, o que contribui para o desenvolvimento de pancreatite em pacientes com história prévia de hiperlipidemia gestacional (BIGBY *et al*, 1998, MACCARTER *et al*, 1992), náuseas, vômitos, sangramentos gastrintestinais, anorexia, perda de peso e colite ulcerativa (BARTH *et al*, 1993; MARTINDALE, 2007).

Entre os efeitos oculares freqüentemente observados encontram-se conjuntivites, cataratas, distúrbios visuais, opacidade da córnea e decréscimo da visão noturna, além de fotossensibilidade (LEBOWITZ *et al*, 1988). Efeitos geniturinários podem ser observados, como proteinúria, hematúria, hiperuremia, uretrite e desordens menstruais, tais como amenorréia e menorragia (MARTINDALE, 2007).

Apesar dos diversos efeitos adversos relatados, a isotretinoína apresenta-se como alternativa favorável no tratamento de patologias relacionadas com a regulação da diferenciação epitelial e, no caso dos retinóides, a utilização de vesículas fosfolipídicas promove uma redução na toxicidade, aumenta a solubilidade do fármaco em meio aquoso, e fornece considerável estabilidade à preparação (NASTRUZZI *et al*, 1990; MANCONI *et al*, 2002).

1.2.6. RETINÓIDES E NANOCARREADORES DE FÁRMACOS.

O uso terapêutico da isotretinoína, apesar dos interessantes efeitos farmacológicos mencionados anteriormente, apresenta-se limitado devido à variedade de efeitos adversos que caracterizam o perfil de atividade dos retinóides. A elevada toxicidade, destacando-se o potencial teratogênico, e a baixa estabilidade química são fatores limitantes da aplicação na terapêutica dos retinóides. Além disso, a natureza hidrofóbica dos retinóides dificulta a administração pelas vias oral e intravenosa, requerendo a utilização de formulações oleosas ou soluções aquosas contendo tensoativos (CORTESE *et al*, 1994).

A associação e ou inclusão dos retinóides, relatados até o momento, empregando principalmente a tretinoína, em diferentes tipos de sistemas de liberação modificada como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, ciclodextrinas, niossomas e nanopartículas poliméricas podem melhorar a solubilidade (MONTASSIER *et al*, 1997; BRISAERT AND PLAIZIER VERCAMMEN, 2000; YAP *et al*, 2005; LIN *et al*, 2007), a estabilidade físico-química e fotoestabilidade (BRISAERT AND PLAIZIER VERCAMMEN, 2000; BRISAERT *et al*, 2001; MANCONI *et al*, 2003; LIM *et al*, 2004; IOELE *et al*, 2005; SAHA *et al*, 2007; TRICHARD *et al*, 2007; OURIQUE *et al*, 2008) a biodisponibilidade e eficácia (ZUCCARI *et al*, 2005; LIN *et al*, 2007; SAHA *et al*, 2007; TRICHARD *et al*, 2007) bem como potencializar seus efeitos citotóxicos, antineoplásicos e anti-proliferativos (NASTRUZZI *et al*, 1989; DIAZ *et al*, 2006).

No sentido de otimizar a aplicação dos retinóides na terapêutica, o emprego de vesículas lipídicas e nanopartículas poliméricas como sistemas transportadores de fármacos apresenta-se como alternativa viável para a redução dos problemas relacionados a especificidade, solubilidade e estabilidade dessa classe de compostos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar nanocápsulas de PLGA contendo isotretinoína e, avaliar em modelos *in vitro*, o efeito da encapsulação da isotretinoína em lipossomas e nanocápsulas sobre a atividade antitumoral.

Objetivos específicos:

- ❖ Padronizar o método de obtenção e formação de nanocápsulas de PLGA com diâmetro inferior a 200 nm e baixo índice de polidispersão;
- ❖ Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas de PLGA contendo isotretinoína;
- ❖ Obter lipossomas de fosfatidilcolina contendo isotretinoína encapsulada;
- ❖ Determinar a eficiência de encapsulação da isotretinoína nas formulações;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade dos nanosistemas pelo teste de exclusão por Azul de Tripán, utilizando a linhagem leucêmica eritromieloblastóide K562 e células de pacientes com LMC provenientes de leucoferese;
- ❖ Avaliar a biodistribuição tissular da isotretinoína após administração intravenosa de nanocápsulas de PLGA em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Substâncias e Reagentes

- Isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinoico) SIGMA (USA)
- Tretinoína (ácido all-*trans*-retinoico) SIGMA (USA)
- Poloxamer® 188 ICI (França) – PM 8400
- PLGA 85:15 – DL lactídeo 15mol% - SIGMA (USA) – Viscosidade inerente 0,57g/dL
- Fosfatidilcolina de soja – Lipoid® S100 (100% PC) – Lipoid GMBA (Alemanha)
- Colesterol - Avanti Polar Lipids (lote CH-33)
- Óleo de soja - Sigma Aldrich® (St.Louis, USA)
- Fosfato de potássio monobásico anidro PA – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Hidróxido de sódio PA – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Acetona – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Metanol – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Acetonitrila – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Álcool Etilico – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Ácido Acético Glacial – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Hidróxido de Amônia – Merck® (Darmstadt, Alemanha)
- Água ultra-pura Milli-Q®
- Meio RPMI – Sigma (USA)
- Tampão Fosfato pH 7,4
- Soro Bovino Fetal – GIBCO
- Tampão IPB pH 7,2

3.1.2. Equipamentos e Utensílios Diversos

- Evaporador Rotativo TECNAL® TE-210 acoplado a um banho termostaticado e refrigerador TECNAL® TE 184 e a Bomba de vácuo TECNAL® TE 0581
- Centrífuga SIGMA® 3-18K
- Agitador de tubos - Vórtex Phoenyx® AP 56
- Balança analítica Gehaka® AG-200
- Zeta Sizer Malvern® Nanoseries 50
- Espectrofotômetro CARY UV-VISIBLE VARIAN®
- HPLC - Bomba quaternária (ProStar 240), com amostrador automático(ProStar 410) e detector ultravioleta (ProStar 325)VARIAN®.
- Coluna de vidro (capacidade 35mL) com gel de Sephadex® G-50;

- Coluna OmniSpher C 18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)- Varian lote 27-26-M03
- Microscópico óptico Leica® DME
- pH-metro digital Gehaka® PG 18000
- Mini incubadora com agitador orbital, MA 410, Shaker Marconi®
- Câmara fechada com luz UVA – λ 365nm TECNAL® TE 540
- Cartucho de extração em fase sólida Strata™-X 33 μ m, C18, 1 cc (Phenomenex)
- Tubos falcon - TPP
- Garrafa para cultivo celular – TPP
- LC-MS-MS - Bomba quaternária (ProStar 240), com amostrador automático(ProStar 410) acoplado a um detector de espectrometria de massas (1200 MS) VARIAN®.
- Processador ultrassônico marca Misonix, modelo XL 2020.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA A ISOTRETINOÍNA.

3.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da isotretinoína em espectrofotômetro.

Foi realizada uma varredura de espectros de absorvância no intervalo de comprimento de onda de 200 nm a 500 nm de uma solução de isotretinoína em solvente adequado (etanol: tampão IPB na proporção 7:3 para os lipossomas e etanol: tampão fosfato na proporção de 5:1 para nanocápsulas de PLGA) na concentração de 0,004 mg/mL.

A análise espectrofotométrica no UV-VIS foi realizada obedecendo as condições limites de absorvância de 0,2 a 1,5, com caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.1.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da isotretinoína.

Amostra padrão de isotretinoína foi diluídas com metanol, separadamente, em quantidade suficiente para obter uma solução com concentração de 1 mg/mL. Foram avaliadas diferentes condições cromatográficas: fases móveis, temperatura da coluna e volume de injeção, conforme demonstrado na Tabela 7, para determinar as condições de melhor desempenho do método que garantisse a separação de possíveis subprodutos,

facilmente encontrados quando se trabalha com retinóides, obtendo-se picos simétricos em tempo de retenção favorável.

Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia Líquida de alta eficiência.

Fase Móvel	Proporção (v/v)	Fluxo (mL/min)	Modo	Detector	Temperatura	Volume de injeção
Acetonitrila: Acetato de Amônio	95:5	1,0	Isocrático	UV-VIS	Ambiente	20 µL
Acetonitrila: Ácido acético 0,5%	85:15	1,0	Isocrático	UV-VIS	50°C	50 µL
Acetonitrila: Ácido acético 0,5%	85:15	1,0	Isocrático	UV-VIS	50°C	30 µL
Acetonitrila: Ácido acético 0,5%	70:30 98:2 70:30	0,3	Gradiente	Espectrômetro de Massa	30°C	10 µL
Acetonitrila: Ácido fórmico 0,5%	70:30	0,3	Isocrático	Espectrômetro de Massas	Ambiente	10 µL

Após cada um dos métodos terem sido testados e avaliados quanto à simetria e resolução dos picos, tempo de retenção e largura da base do pico, o método de escolha foi submetido, posteriormente, ao procedimento de validação baseado nos critérios de aceitação da Resolução - RE nº. 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de linearidade, seletividade, especificidade, robustez, precisão e exatidão.

3.2.1.2.1. Curva de calibração para isotretinoína e tretinoína.

Para construção das curvas foram preparadas 7 soluções de isotretinoína e tretinoína em metanol utilizando padrão com teor de 99,9%. Inicialmente foram preparadas, separadamente, solução-mãe de 1 mg/mL tanto de isotretinoína quanto de tretinoína. Estas

soluções foram seqüencialmente diluídas, e combinadas, obtendo-se os seguintes pontos de concentração para cada uma das substâncias: 50 µg/mL; 25µg/mL; 5µg/mL; 1µg/mL; 0,5µg/mL; 0,1µg/mL e 0,05µg/mL.

As leituras em triplicata das áreas obtidas após injeção das soluções foram realizadas em cromatógrafo líquido (Varian), equipado com detector de UV-VIS, coluna de fase reversa, C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) e as condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel de acetonitrila e ácido acético 0,5% na proporção de 85:15, em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 30µL, temperatura da coluna de 50°C e tempo de corrida de 10 minutos. As curvas de calibração foram construídas a partir das médias das áreas dos picos versus as concentrações de isotretinoína e tretinoína respectivamente.

3.2.1.2.2. Verificação da precisão e exatidão.

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade.

Para avaliar a repetibilidade, foram realizadas em HPLC nove determinações de três concentrações, baixa, média e alta com três réplicas cada para cálculo da média das áreas, do desvio padrão e do desvio padrão relativo. A precisão intermediária foi realizada por outro analista em dia diferente; as análises também foram realizadas com nove determinações de três concentrações, baixa, média e alta com três réplicas cada e os resultados obtidos foram tratados estatisticamente.

A exatidão foi determinada pela verificação da proximidade dos resultados obtidos das amostras de isotretinoína e tretinoína em relação ao valor verdadeiro obtido através do padrão.

3.2.1.2.3. Verificação dos limites de quantificação e detecção.

Os limites de quantificação e detecção foram determinados pela análise em HPLC de soluções contendo concentrações decrescentes dos fármacos até o menor nível determinável e detectável, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis. As soluções com concentrações decrescentes estabelecidas foram: 0,04 µg/mL; 0,035 µg/mL; 0,030 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,020 µg/mL e 0,015 µg/mL.

3.2.1.2.4. Verificação da Robustez.

Para avaliar a robustez do método, pequenas variações nos parâmetros analíticos do método cromatográfico foram realizadas para avaliar a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas. Os parâmetros analíticos avaliados foram pH da fase móvel, de 3,9 foi modificado para 4,1, o fluxo inicial de 1mL/min foi alterado para 0,9 mL/min, a temperatura da coluna de 50°C foi alterada para 40°C. A proporção da fase móvel também foi modificada de 85:15 (v/v) para 80:20 (v/v).

3.2.1.3. Validação de metodologia de extração em fase sólida (SPE) para determinação da isotretinoína.

Para desenvolvimento do método de extração da isotretinoína das diferentes matrizes biológicas propostas neste trabalho, foram realizados estudos para otimização das condições de extração, utilizando cartucho Strata™ - X 33 µm, C18, 1 cc.

Inicialmente, para otimizar as diferentes variáveis envolvidas no processo de extração como: força de extração dos eluentes, volumes de eluição, volumes de lavagem, pH da amostra, diferentes condições foram testadas na ausência das matrizes biológicas para avaliar a taxa de recuperação dos analitos, conforme demonstrado na Tabela 8.

Para todas as amostras foi adotado como procedimento padrão condicionar os cartuchos com 1 mL de metanol e posteriormente equilibrá-los com 1 mL de água. Depois de condicionados, 500 µL de uma solução padrão de concentração conhecida foram aplicados juntamente com 500 µL de PBS para padronizar as condições de extração do analito da matriz polimérica existente no cartucho. Definida a melhor condição de remoção dos analitos, o procedimento foi realizado na presença das matrizes teciduais e validados quanto à taxa de recuperação e precisão conforme descrito no item 4.2.1.4.1.

3.2.1.3.1. Extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de fígado, baço, pulmão e sangue.

Tabela 8. Diferentes condições de extração do analito a partir da matriz polimérica do cartucho de extração.

Teste de Extração	Solvente Lavagem (v/v)	Nº. e volume de Lavagens	Solvente Eluição (v/v)	Nº. e volume de Eluições
1	CH ₃ OH	1 x 1,0 mL	ACN:H ₂ O (85:15)	1 x 1,0 mL
2	CH ₃ OH:NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL	ACN:NH ₃ OH (85:15)	1 x 1,0 mL
3	CH ₃ OH	1 x 1,0 mL	ACN:H ₂ O (50:50)	1 x 1,0 mL
4	CH ₃ OH:NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL	ACN:NH ₃ OH (50:50)	1 x 1,0 mL
5	H ₂ O	1 x 1,0 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL
6	NH ₃ OH	1 x 1,0 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL
7	NH ₃ OH	1 X 0,5 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL
9	NH ₃ OH	1x 1,0 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (80:20)	1 x 1,0 mL
10	NH ₃ OH	1x 0,75 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (85:15)	1 x 1,0 mL
11	NH ₃ OH	1x 0,75 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (90:10)	1 x 1,0 mL
12	NH ₃ OH	1x 0,75 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (95:5)	1 x 1,0 mL
13	NH ₃ OH	2x 0,75 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (90:10)	1 x 1,0 mL
14	NH ₃ OH	1x 0,75 mL	CH ₃ OH: NH ₃ OH (90:10)	1 x 1,0 mL
			CH ₃ OH (100%)	1 x 1,0 mL
15	-----	-----	CH ₃ OH (100%)	2 X 1,0 mL

* CH₃OH= Metanol; NH₃OH= hidróxido de amonio

Para extração do analito, os tecidos de camundongo, foram pesados separadamente, e triturados em gral. Do material triturado foi pesado 1 grama de tecido, ao qual foi acrescentado 1,5 mL de metanol para digestão tecidual. A mistura foi homogeneizada em vortex por três minutos e, posteriormente centrifugada a 5000 rpm durante 3 minutos. Do sobrenadante, 500 µL foram coletados e aplicados no cartucho de extração em fase sólida. Novamente a amostra foi submetida a centrifugação, por 5000 rpm, durante 3 minutos, sendo desprezado o eluído desta etapa do processo.

O cartucho foi então lavado apenas uma vez com 750 µL de uma solução de hidróxido de amônio 10 mM e o resíduo da lavagem desprezado. Em seguida o analito foi extraído da matriz através de 2 eluições sucessivas com 1 mL cada, sendo a primeira

constituída por uma mistura de 9:1 metanol:hidróxido de amônio 10 mM e a segunda com 100% de metanol.

Para validar a taxa de recuperação e a precisão na presença das diferentes matrizes, o mesmo procedimento foi adotado em quintuplicata, utilizando tecidos de animais não tratados, aos quais foram adicionadas quantidades conhecidas do fármaco, para posterior avaliação da recuperação. Para determinar a recuperação máxima (100%), o acréscimo de quantidade conhecida do padrão foi realizado ao final do procedimento conforme ilustrado na figura 11.

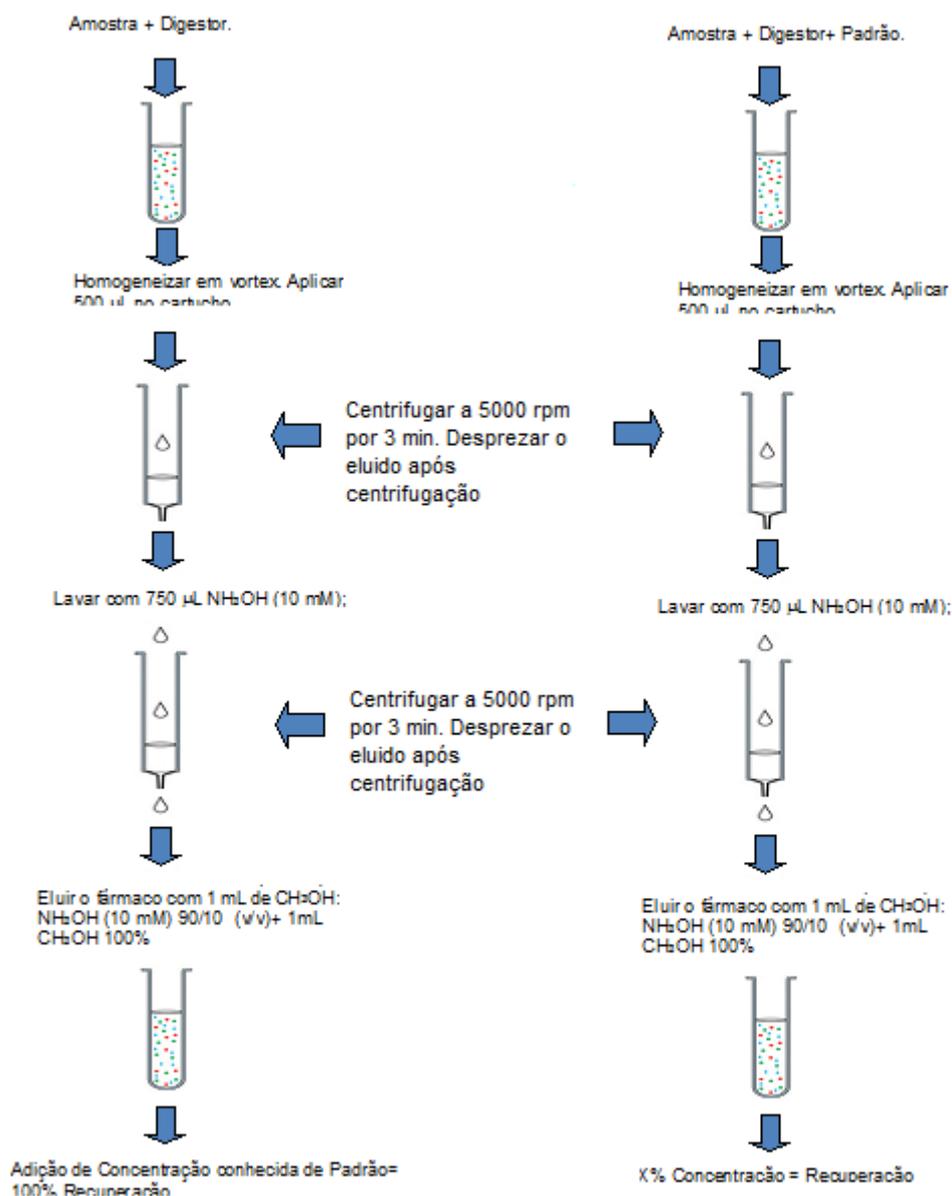


Figura 11. Otimização da taxa de recuperação da isotretinoína de matrizes biológicas.

3.2.1.3.2. Extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de células K 562.

Para extração do analito, a partir de cultura de células K562, inicialmente foram separados botão celular e o meio de cultura sobrenadante. Ao botão celular foi acrescentado 1 mL de metanol, homogeneizado em vortex por três minutos e, posteriormente sonificado em ultra-som por 1 minuto. Em seguida, foram aplicados 500 µL no cartucho de extração em fase sólida. A amostra foi submetida a centrifugação, por 5000 rpm, durante 3 minutos, sendo desprezado o eluído desta etapa do processo.

O analito foi extraído da matriz através de 2 eluições sucessivas com 1 mL cada, constituída por 100% de metanol.

Do meio de cultura sobrenadante foram retirados 500 µL e aplicados no cartucho de extração em fase sólida. A amostra foi submetida a centrifugação por 5000 rpm durante 3 minutos, sendo desprezado o eluído deste etapa do processo e os analitos foram extraídos da matriz através de 2 eluições sucessivas com 1 mL cada, com 100% de metanol.

Para validar a taxa de recuperação e a precisão na presença tanto do botão celular quanto do meio de cultura sobrenadante, o mesmo procedimento foi adotado em quintuplicata, utilizando botão celular e sobrenadantes, aos quais foram adicionados concentração conhecida do fármaco, para posterior avaliação da recuperação. Para determinar a recuperação máxima de 100%, o acréscimo de quantidade conhecida do padrão foi realizado ao final do procedimento.

3.3 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS

Nanocápsulas contendo isotretinoína foram obtidas partindo-se do método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores (1989) com algumas modificações nas concentrações dos componentes da formulação e utilização metanol e acetona na proporção de 1:1 para dissolver a fosfatidilcolina. A fase interna (orgânica), constituída de PLGA 85:15 ou D,L-PLA, fosfolípido de soja, óleo de soja e isotretinoína foi inicialmente preparada em temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). O polímero foi dissolvido em 7 mL de acetona, o óleo de soja e isotretinoína em 10 mL de acetona, a fosfatidilcolina foi dissolvida em uma mistura de 5mL de metanol e 5 mL de acetona. A fase externa (aquosa) foi preparada com adição do tensoativo hidrofílico poloxamer 188® em tampão fosfato pH 7,4. Após as dissoluções, as soluções orgânicas foram misturadas e introduzidas lentamente na solução aquosa (fase aquosa), previamente preparada e

mantida sob agitação moderada antes e depois da adição da fase orgânica. A adição da fase orgânica à fase aquosa foi realizada através de gotejamento com fluxo uniforme e contínuo. O produto dessa agitação foi uma nanoemulsão que permaneceu sob agitação magnética por um período de 30 minutos a fim de que as nanocápsulas fossem formadas de forma homogênea após a evaporação do solvente e precipitação do polímero em volta das gotículas da emulsão. A acetona e o metanol, os quais são rapidamente difundidos através da fase aquosa, foram então removidos em rotaevaporador sob pressão reduzida de aproximadamente 600ATM a 40°C, originando uma dispersão coloidal. Esta dispersão coloidal foi concentrada para um volume final de 10mL pela remoção da água sob as mesmas condições (SANTOS *et al*, 2005) (Figura 4). As nanocapsulas formadas foram avaliadas quanto à forma e dimensões tanto por espalhamento de luz quanto por microscopia eletrônica de varredura e, o conteúdo de fármaco encapsulado determinado por espectroscopia de Ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).



Figura 12: Método de preparo das nanocápsulas de PLA e PLGA pelo método de deposição do polímero pré-formado.

3.3.1. Estudo de desenvolvimento da formulação.

Durante o estudo de pré-formulação diferentes condições experimentais foram testadas para posteriormente avaliar, através do método cromatográfico descrito no item

4.2.1.2 a quantidade máxima de isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.

Foram variadas as concentrações de alguns dos constituintes da formulação como o fármaco e o tensoativo hidrofílico. Durante a fase de introdução da fase orgânica na fase aquosa foi utilizado gotejamento, através de uma seringa com agulha G23 (Gauge 23) que corresponde à medida do diâmetro interno de 0,3175 mm anteriormente padronizado para nanocápsulas de PLA por Teixeira (2007).

Concentrações de 0,5 a 0,7 mg/mL de isotretinoína foram incorporadas em cada processo na intenção de avaliar a eficiência máxima de encapsulação para uma formulação estável de nanocápsulas.

A Tabela 9 descreve algumas das formulações e as variações introduzidas durante os ensaios de otimização do método e processo de obtenção das nanocápsulas contendo isotretinoína.

Tabela 9. Formulações de nanocápsulas com PLGA 85:15 contendo isotretinoína (NC-ISO) obtidas com diferentes diâmetros das gotículas durante a fase de preparação da emulsão.

Componentes das formulações NC-ISO	Formulações				
	1	2	3	4	5
PLGA 85:15 (0,57dl/g) (mg)	150	150	150	150	150
PC L100 99% (mg)	150	150	150	150	150
Óleo de soja (mg)	100	100	100	100	100
Isotretinoína (mg)	5	5	5	6	7
Metanol (mL)	5	5	5	5	5
Acetona (mL)	22	22	22	22	22
Tampão fosfato pH 7,4	50	50	50	50	50
Poloxamer (mg)	150	125	75	150	150

3.3.2 Estabilidade físico-química (envelhecimento acelerado das dispersões de nanocápsulas)

A dispersão de nanocápsulas obtida após a evaporação do solvente orgânico foi avaliada quanto à estabilidade físico-química através da utilização dos testes de envelhecimento acelerado (para escolha da melhor formulação durante o processo de otimização) e envelhecimento em longo prazo (para o acompanhamento da estabilidade da formulação selecionada em tempo real). Estes testes tiveram como objetivo principal submeter as preparações às condições de estresse para simular processos de esterilização, transporte e armazenamento. Nos ensaios de estabilidade acelerada, a dispersão foi analisada seguindo as metodologias descritas abaixo adaptadas de Santos *et al*, 2005.

3.3.2.1. Resistência à centrifugação

Cerca de 2 mL da amostra da dispersão de nanocápsula foi submetida à centrifugação a 2500 rpm, durante 1h, na temperatura de 25°C.

3.3.2.2. Resistência a ciclos de congelamento e descongelamento.

Alíquotas de 1mL da dispersão foram congeladas durante 16h a -18°C e descongeladas por 8h a 25°C. As amostras foram então avaliadas quanto ao diâmetro médio das partículas por espalhamento de luz a cada ciclo.

3.3.3. Estabilidade físico-química (envelhecimento em longo prazo das dispersões de nanocápsulas)

As amostras foram avaliadas imediatamente após a sua obtenção, e em intervalos de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias. Nestes intervalos de tempo, foram investigados os seguintes parâmetros: aspectos macro e microscópicos, variações de pH e tamanho médio de partícula, seguindo as metodologias descritas abaixo:

3.3.3.1. Aspecto macroscópico.

As características organolépticas das formulações foram analisadas, observando visualmente o aparecimento de mudanças no aspecto geral, tais como: coloração, translucência azulada, deposição de resíduos e/ou cristais de cor laranja da isotretinoína, formação de grumos, cremagem ou nata sobrenadante, gotículas de óleo aderidas ao vidro, floculação ou separação de fases (SANTOS *et al*, 2005).

3.3.3.2. Estudo da variação do pH.

A variação do pH foi analisada utilizando-se um potenciômetro digital equipado com um eletrodo de vidro e um sensor de temperatura. O aparelho foi previamente calibrado com tampões de pH 4,0; 7,0 e 10. Alíquotas de nanocápsulas foram colocadas em béquer para que eletrodo introduzido permitisse a leitura imediata do pH das formulações.

3.3.3.3. Diâmetro médio da partícula e PDI.

As dispersões foram armazenada em geladeira ($4,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) e monitoradas por espalhamento de luz ao longo do tempo quanto à manutenção do tamanho médio das partículas e PDI (TEIXEIRA *et al*, 2005).

3.3.4. Tamanho médio da partícula e índice de polidispersibilidade (PDI)

Cerca de 1 mL das dispersões obtidas foram introduzidas em cubeta apropriada e avaliadas quanto ao diâmetro médio das partículas e seu respectivo índice de polidispersão (PDI) por técnica de espalhamento de luz a 25°C em equipamento Zetasizer (Malvern).

3.3.5. Fotoestabilidade.

Inicialmente 1 mL da dispersão de nanocápsulas, contendo 0,5 mg de isotretinoína, foi diluída em tampão fosfato pH 7,4 quantidade suficiente para 25 mL. Esta diluição foi submetida à radiação UVA com comprimento de onda fixo em 365 nm. Alíquotas de 0,5

mL foram coletadas, para avaliação da fotoestabilidade com intervalos de 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 minutos de exposição. Este procedimento foi realizado em duplicata.

Para avaliar os níveis de fotodegradação do fármaco, o polímero foi precipitado da dispersão de nanocápsulas com a adição de álcool etílico na proporção de 1:5 e, em seguida as amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro de membrana de PVDF com poro de 0,45 µm e analisados por HPLC segundo método descrito no item 4.4.3.

Para padronizar a proporção de álcool utilizada na precipitação do polímero, diferentes testes de extração do fármaco a partir das nanocápsulas foram realizadas seguindo proporções entre o volume de nanocápsulas e o volume de álcool etílico de 1:3, 1:4 e 1:5.

Para avaliar a estabilidade do fármaco livre frente à exposição UVA, uma solução de isotretinoína em etanol foi exposta às mesmas condições experimentais que as nanocápsulas. Assim, de uma solução de 3,3 µg/mL de isotretinoína em etanol foram coletadas alíquotas de 1 mL ao final dos intervalos de 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 minutos de exposição e, filtradas em filtro de membrana de PVDF com poro de 0,45 µm e analisados por HPLC segundo método descrito no item 4.4.3. Este procedimento foi realizado em duplicata.

3.4 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados empregando o método de hidratação do filme lipídico seco. Foram utilizados na preparação de lipossomas, fosfatidilcolina na concentração de 40 mM, colesterol na concentração de 0,04 mM e 5 mL de uma solução de isotretinoína em clorofórmio na concentração de 2 mg/mL.

Os lipossomas obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico foram preparados da seguinte maneira: a fase orgânica (constituída pelos componentes estruturais do lipossoma dissolvidos em clorofórmio) foi colocada em um balão de fundo redondo, no qual formou-se um filme por evaporação do clorofórmio induzida por atmosfera de nitrogênio. O filme foi hidratado com fase aquosa (*tampão IPB – Isotonic Palitzch Buffer*) e levado ao agitador tipo vortex, obtendo-se uma dispersão leitosa formada por uma mistura heterogênea de vesículas multilamelares (MLV) e fragmentos de bicamada que, após sonicação em processador ultrasonico resultou em uma preparação semitransparente contendo vesículas unilamelares pequenas (SUVs)

Após sonicação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 05 minutos para promover a remoção de qualquer vestígio de titânio oriundo da sonda de sonicação. O perfil de formação e a caracterização físico-química dos lipossomas foram avaliados por Alves em 2005.

3.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA EM LIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS

3.5.1. Separação do fármaco livre

Lipossomas e nanocápsulas contendo o fármaco encapsulado foram separados da fração de fármaco livre por cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando uma coluna de vidro de 35 cm x 2 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex G-50 Fine. Para preparar a coluna, 4g de sephadex G-50 Fine foram hidratados com tampão IPB ou tampão fosfato, para lipossomas e nanocápsulas respectivamente, por 4 horas na temperatura ambiente. Posteriormente, o sephadex hidratado foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos para a remoção de ar. O material foi aplicado lentamente pelas paredes da coluna evitando a formação de bolhas, obtendo-se uma coluna empacotada com sephadex de 30 cm de altura para os lipossomas, correspondente a um volume de 94,2 ml e de 15 cm de altura para as nanocápsulas, correspondente a um volume de 47, 1 ml. Um mililitro das preparações de lipossomas ou 0,5 mL de nanocápsulas foram aplicados sobre a respectiva coluna de sephadex, correspondente a cerca de 1,4% do volume da coluna, quantidade esta adequada para uma boa resolução, evitando-se qualquer perturbação da parte superior da coluna, e eluído com devido tampão. Após a aplicação, frações de 2,5 mL e 1,5 mL foram coletadas para os lipossomas e nanocápsulas respectivamente e cada fração foi submetida à leitura de absorvância em espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50) em 360 nm para acompanhamento da eluição dos lipossomas, das nanocápsulas e do fármaco não encapsulado. As frações eluídas contendo lipossomas e nanocápsulas foram combinadas separadamente e foram posteriormente rompidas para quantificar o fármaco encapsulado. O volume total das frações foi medido e registrado. As alíquotas correspondentes às frações nas quais eluíram as nanocápsulas foram reunidas e, a 1 mL deste volume foram acrescentados 5 mL de etanol PA para promover a precipitação do polímero. Na seqüência, esta mistura foi homogeneizada em vórtex e então centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos para remoção do polímero precipitado. Após a separação do sobrenadante, este foi filtrado em filtro de membrana de PVDF com poro de 0,45 μ m e analisados por HPLC segundo método

descrito no item 4.4.3, para calcular a concentração de fármaco encapsulado, e eficiência de encapsulação.

As alíquotas correspondentes às frações nas quais eluíram os lipossomas também foram reunidas e, a 1 mL deste volume foram acrescentados 2 mL de etanol PA para rompimento das vesículas lipídicas, esta mistura foi homogeneizada em vortex, filtrada em filtro de membrana de PVDF com poro de 0,45 µm e analisados por HPLC segundo método descrito no item 4.4.3 para calcular a concentração de fármaco encapsulado, e eficiência de encapsulação.

3.5.2. Cálculo da eficiência de encapsulação.

A quantificação da isotretinoína encapsulada foi efetuada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. Os cálculos foram efetuados com base nas respectivas curvas de calibração através da leitura das amostras resultantes do rompimento dos lipossomas e das nanocápsulas presentes nas frações contendo fármaco encapsulado. A Eficiência de Encapsulação (EC) foi calculada de duas formas:

- a. Porcentagem de isotretinoína encapsulada em relação à quantidade de isotretinoína originalmente adicionada à formulação:

$$EC_1 = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ISO}_E\text{)} \times 100}{\text{Total de fármaco adicionado (ISO}_A\text{)}}$$

- b. Razão Molar entre a isotretinoína incorporada no nanosistema e a concentração do componente estrutural das nanocápsulas ou lipossomas:

$$EC_2 = \frac{\text{Mol de fármaco encapsulado (ISO}_E\text{)}}{\text{Mol de fosfatidilcolina nos lipossomas}}$$

$$EC_2 = \frac{\text{Mol de fármaco encapsulado (ISO}_E\text{)}}{\text{Mol do Polímero}}$$

3.6. MEDIDA DO DIÂMETRO DOS LIPOSSOMAS DE NANOCÁPSULAS

3.6.1. Espalhamento de luz (*Light Scattering*).

A determinação do tamanho das partículas foi realizada empregando a técnica de espalhamento de luz em equipamento ZetaSizer Nano (Figura 13), técnica não invasiva, que permite a análise da distribuição e medida do tamanho das vesículas formadas neste processo de interação.

Uma alíquota (1,0 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 e das nanocápsulas. A distribuição do tamanho das partículas foi determinada utilizando o índice de polidispersibilidade, o qual é medido pela extensão da distribuição do tamanho das vesículas na amostra [Muller *et al*, 2004].



Figura 13: Zeta Sizer Nano e autotitilador MPT-2.

3.7. PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E NANOCÁPSULAS.

Os perfis de liberação da isotretinoína das preparações de nanocápsulas e lipossomas foram determinados como a concentração de isotretinoína liberada dos sistemas para o meio receptor (tampão fosfato pH 7,4 a 37°C) em função do tempo.

A avaliação da liberação da isotretinoína encapsulada foi realizada através de um sistema de diálise adaptado em mini-incubadora com agitação orbital, nas seguintes

condições: volume de 50 mL de meio receptor, temperatura 37° C e agitação constante (≈ 77 rpm).

Foram utilizadas membranas de diálise de acetato de celulose (Cellu Sep®), tubulares, de 6,37 mm de diâmetro e 50 µm de espessura e poro de 12.000-15.000, onde foram inseridos 1 mL de lipossomas ou da dispersão de nanocápsulas. O tubo de diálise foi mergulhado no meio de receptor e a liberação da isotretinoína avaliada em intervalos de tempo durante 48 horas. A cada tempo foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio receptor, sendo o meio receptor repostado nas mesmas condições de volume e temperatura.

As alíquotas retiradas foram analisadas por HPLC segundo método descrito no item 4.4.3 para determinar o conteúdo de isotretinoína liberado.

3.8. POTENCIAL ANTITUMORAL

3.8.1. ENSAIOS *IN VITRO*

3.8.1.1. LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular K562 foi mantida em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com soro bovino fetal (Cultilab) e 2 mM de L-glutamina. Semanalmente estas células foram expandidas para congelamento e realização dos experimentos.

Para avaliação da citotoxicidade pelos métodos de azul de trypan e MTT a linhagem celular K562 foi incubada com concentrações equimolares do fármaco em estudo (de 21,3 a 0,16 µM), na sua forma livre e encapsulada tanto em lipossomas quanto nanocápsulas, por um período de 24, 48 e 72 horas.

3.8.1.2. Avaliação da citotoxicidade através do método de exclusão por azul de trypan.

Após incubação das células da linhagem K562 do fármaco livre e encapsulado, durante 24, 48 e 72 horas em estufa úmida com 5% de CO₂, as células foram avaliadas quanto a viabilidade através, de uma diluição (1:10) no Azul de Trypan e a contagem das células inviáveis em câmara hemocitométrica.

3.8.1.3. Avaliação da citotoxicidade através do método de redução do tetrazolium (MTT).

Neste teste, tanto a proliferação como a citotoxicidade celulares podem ser avaliadas através de um sistema de oxi-redução mitocondrial. Desta forma, o tetrazolium é reduzido através das células viáveis, formando o sal de formazan, o qual será solubilizado para a leitura das células viáveis através de ELISA a 570 nm (absorbância máxima). As células da linhagem celular K-562 foram incubadas na forma encapsulada e livre e em seguida, as mesmas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar, por 24, 48 e 72 horas. Após este período, 10 µL a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada a placa de cultura e incubada por mais 4 horas. Logo após, foi adicionado DMSO para solubilização do MTT. Após 24 horas foi realizada leitura em ELISA a 570 nm e a citotoxicidade celular para cada sistema calculada da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância por well}}{\text{Média da absorbância do controle}} \times 100$$

A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) foi definida como a concentração do fármaco que resulta em 50% de morte celular sendo obtida através de uma curva dose-resposta (MOSMANN, 1983).

3.8.1.4. Determinação da concentração intracelular da isotretinoína.

Para determinar a quantidade de isotretinoína internalizada pelas células da linhagem K562, 0,250 mL de cada sistema e de solução alcoólica do fármaco livre foram adicionados a 2,75 mL de suspensão celular contendo 1x10⁶ células por mL e, incubados por 24, 48 e 72 horas. Ao final do respectivo tempo de incubação o botão celular e o sobrenadante do meio de cultivo foram separados e submetidos ao procedimento de extração conforme descrito no item 4.2.1.4.2. A concentração inicial de isotretinoína foi de 56,4; 36,9; 87,02 e 17,85 µg para lipossomas, nanocápsulas de PLGA, nanocápsulas de PLA e fármaco livre respectivamente. A concentração internalizada foi expressa em porcentagem.

3.9. ENSAIOS *IN VIVO*.

3.9.1. ANIMAIS.

Foram utilizados camundongos machos swisses, de 6 a 8 semanas, com 35 ± 10 gramas de peso fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Goiás. Esses animais foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo escuro de 12 horas, onde permaneceram durante todo o experimento até eutanásia para avaliação da biodistribuição tissular da isotretinoína. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidas *ad libitum*. Os experimentos em animais foram realizados de acordo com os protocolos institucionais do COBEA (Colégio brasileiro de experimentação animal).

3.9.2. Avaliação da biodistribuição tissular da isotretinoína nanoencapsulada.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de citotoxicidade foi selecionado o sistema de maior potencial antineoplásico para a avaliação da biodistribuição tissular. Foram utilizados 24 camundongos de 35 ± 10 g, divididos em grupos de três, tratados com $35 \mu\text{g}$ de fármaco encapsulado em nanocápsulas de PLGA. Uma alíquota de 0,05 mL da dispersão de nanocápsulas foi inoculada em cada animal pelo plexo ocular, e os animais submetidos a eutanásia, através da técnica de deslocamento cervical após anestesia, com 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6 8 e 24 horas. De cada animal foram coletados fígado, baço, pulmão e sangue para quantificação da isotretinoína nestes tecidos. Os tecidos foram coletados e armazenados a -20°C até análise por HPLC segundo método descrito no item 4.4.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA A ISOTRETINOÍNA

4.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da isotretinoína em espectrofotômetro.

O espectro de varredura UV-VIS foi obtido no intervalo de 250 a 500 nm para verificar o comprimento de onda de maior absorbância da amostra de isotretinoína e certificar a inexistência de interferência na absorbância máxima do fármaco em 360 nm por outro componente da formulação conforme demonstrado nas figuras 14 e 15.

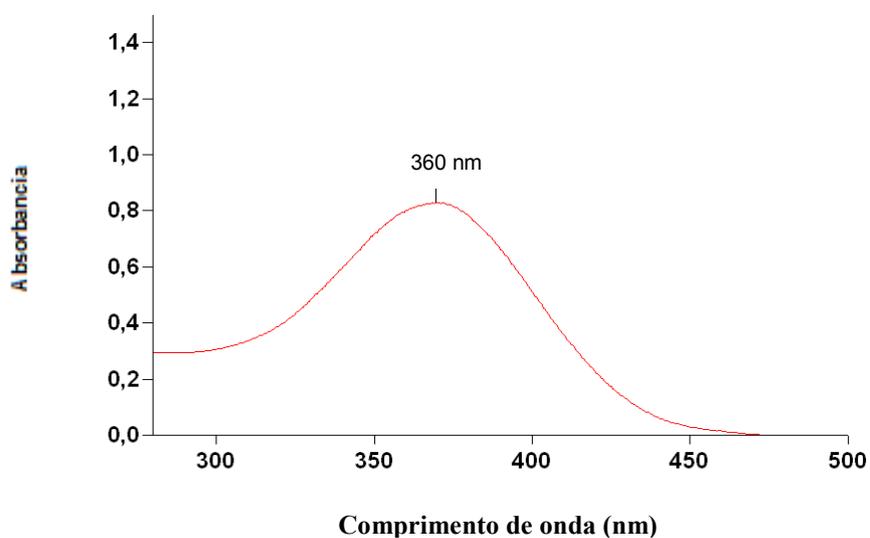


Figura 14: Varredura do espectro de absorção da isotretinoína por espectrofotometria

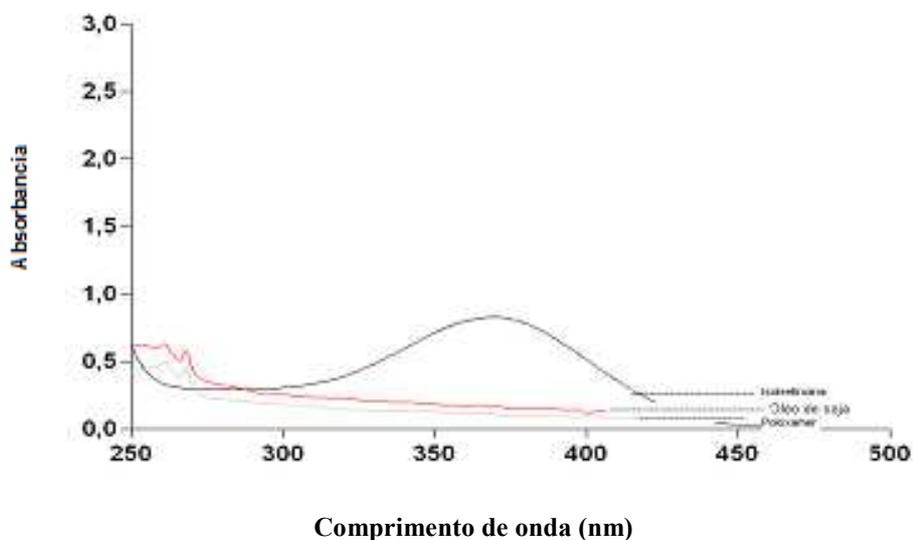


Figura 15: Varredura do espectro de absorção da isotretinoína e dos componentes da formulação das nanocápsulas, como poloxamer e o óleo de soja, por espectrofotometria.

4.1.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da isotretinoína.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi proposta inovadora metodologia analítica por cromatografia gasosa para avaliação da isotretinoína e seus produtos de degradação (LIMA *et al*, 2005). Entretanto, devido a complexidade da matriz biológica, foi necessário o desenvolvimento e validação de nova metodologia analítica, para análise da isotretinoína e seus produtos de degradação presentes em material biológico. Para padronizar o método cromatográfico diferentes condições analíticas foram utilizadas conforme demonstrado no item 3.2.1.2. As diferentes condições foram avaliadas quanto ao pH, tempo de retenção, resolução e simetria dos picos para os analitos. Obteve-se como resultado número de pratos teóricos acima de 8000 para todas as análises, fator de simetria, segundo USP de 1.10 e 1.08 para a isotretinoína e tretinoína respectivamente. Segundo Ribani e colaboradores (2004) o número mínimo de pratos teóricos para validação de métodos por HPLC dever ser de 2000.

A especificidade e seletividade do método foram determinadas através de análise comparativa entre os cromatogramas obtidos a partir da solução padrão dos analitos, analisados separadamente e quando combinados na mesma solução. A análise dos cromatogramas demonstrou a inexistência de qualquer interferente, inclusive dos solventes conforme demonstrado pela figura 16, além de demonstrar boa resolução do cromatograma, com completa separação dos picos. Os tempos de retenção para a isotretinoína e tretinoína foram de 5,5 e 6,5 respectivamente.

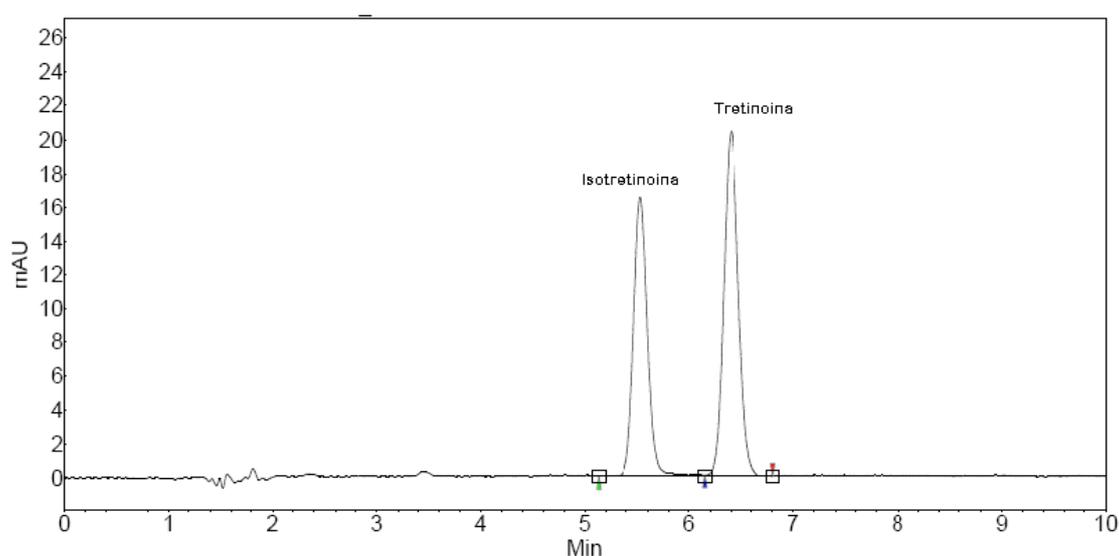


Figura 16: Cromatograma da isotretinoína e tretinoína obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

4.1.2.1. Curva de calibração para isotretinoína e tretinoína por HPLC-UV.

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido a partir das curvas de calibração, conforme ilustrado nas figuras 17 e 18. A linearidade do método demonstrou proporcionalidade entre as diferentes concentrações de padrão, as absorvâncias e as áreas dos picos. O coeficiente de correlação com valores acima de 0,99 demonstra que as soluções apresentaram boa correlação linear entre a absorvância e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados. Esta correlação foi verificada na faixa de concentração de 0,05 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tendo sido utilizados sete valores para a construção da curva conforme descrito no item 3.2.1.2.1.

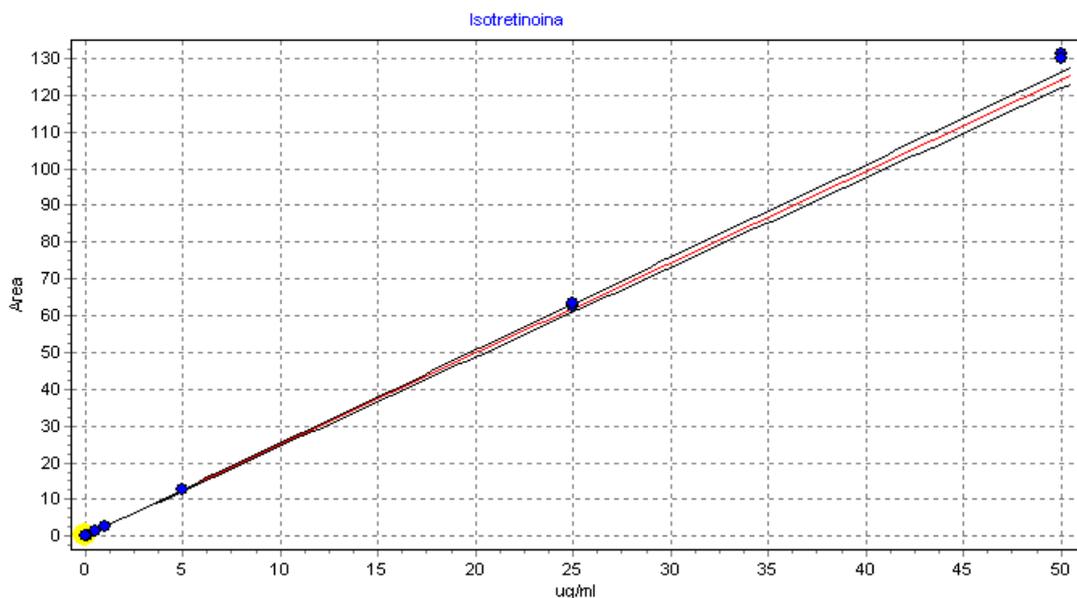


Figura 17: Curva de calibração por HPLC-UV para Isotretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

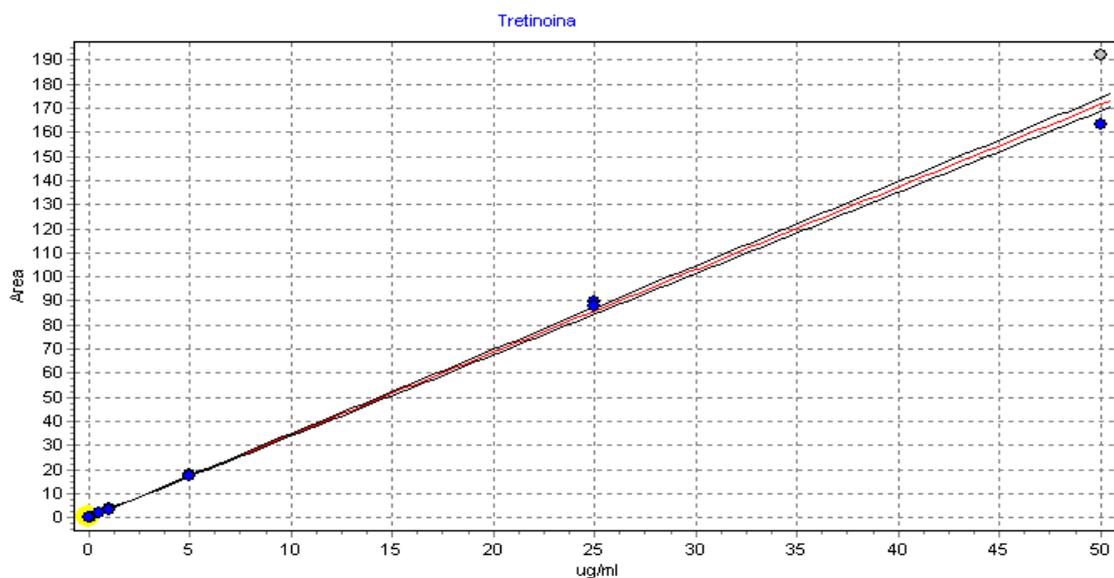


Figura 18: Curva de calibração por HPLC-UV para Tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

Segundo a Resolução - RE n. 899/03 da ANVISA, coeficientes de correlação da curva próximos a 1 significam que o método apresenta linearidade. Assim, a metodologia analítica desenvolvida demonstrou linearidade uma vez que apresentou resultados diretamente proporcionais às concentrações de isotretinoína e tretinoína presentes nas soluções com coeficiente de correlação igual a 0,9989 e 0,9991 respectivamente. As equações da reta obtidas foram iguais a $y=2,48115x+0,01322$ e $y=8,90974e^{-3}+3,43158$ para a isotretinoína e tretinoína respectivamente.

4.1.2.2. Verificação da precisão e exatidão.

Os valores obtidos dos ensaios de precisão, precisão intermediária, reprodutibilidade e exatidão durante período de validação foram demonstrados nas tabelas 10 -13. Todos os valores estão de acordo com os limites recomendados pela Resolução-RE 899/03, que prevê que a precisão pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma serie de medidas não se admitindo valores superiores a 15% e que a exatidão esteja entre 80 a 120%.

4.1.2.2.1 Isotretinoína.

O método cromatográfico demonstrou precisão e exatidão para a isotretinoína dentro dos limites aceitáveis para os níveis analisados conforme demonstrado nas tabelas 10 e 11

Tabela 10. Precisão e exatidão obtidas para a isotretinoína utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.sec)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
0,05	6,262	6,896	7,675	6,94	0,707	10,19	0,047	0,049	0,048	0,048	0,0008	1,70	96,00
1	138,75	139,36	139,05	139,05	0,305	0,21	1,019	1,021	1,017	1,019	0,0016	0,16	101,9
50	7.973	8.136	7.984	8.030	91,09	1,13	51,21	52,251	51,283	51,58	0,4744	0,92	103,16

Tabela 11. Precisão intermediária e exatidão obtidas para a isotretinoína utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.sec)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
0,05	7,6	7,755	8,125	7,82	0,269	3,4463	0,046	0,049	0,047	0,047	0,001	2,63	94,67
1	141,61	159,64	159,59	153,61	10,396	6,7676	0,946	1,067	1,067	1,027	0,057	5,56	102,67
50	8.895	8.918	8.899	8.900	12,398	0,1392	51,2	51,3	51,2	51,24	0,045	0,09	102,47

4.1.2.2.2. Tretinoína

O método cromatográfico também demonstrou precisão e exatidão para a tretinoína dentro dos limites aceitáveis para os níveis analisados conforme demonstrado nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Precisão e Exatidão obtidas para a tretinoína obtidas utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.sec)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
0,05	7,76	7,83	8,57	8,05	0,44	5,54	0,051	0,052	0,05	0,051	0,0008	1,60	102,00
1	177,77	177,63	179,61	178,34	1,10	0,61	0,971	0,99	0,975	0,978667	0,0081	0,83	97,87
50	11.540	11.060	11.180	11.260	249,13	2,21	50,45	51,2	50,567	50,739	0,3294	0,64	101,48

Tabela 13. Precisão Intermediária e Exatidão obtidas para a tretinoína utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.sec)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
0,05	7,6	7,755	8,125	7,826	0,269	3,44	0,046	0,049	0,047	0,047	0,001	2,63	94,67
1	141,6	159,6	159,59	153,61	10,3	6,76	0,946	1,067	1,067	1,027	0,057	5,56	102,67
50	8.890	8.910	8.890	8.904	12,4	0,14	51,21	51,20	51,30	51,4	0,045	0,09	102,47

4.1.2.3. Verificação dos limites de quantificação e detecção para isotretinoína e tretinoína.

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável e detectável com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação deve ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferente da amostra branco no tempo de retenção do fármaco (RE-899) e o pico de resposta do fármaco deve ser identificável e reproduzível com precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120%.

O limite de detecção também foi estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes do fármaco, até menor nível detectável correspondente a 3 vezes o ruído da linha de base.

4.1.2.3.1. Limites de Quantificação e Detecção para a Isotretinoína e Tretinoína.

A menor concentração dos analitos, determinadas quantitativamente, cujo pico de resposta foi reprodutível e identificável com precisão demonstrado por DPR menor ou igual 20% e exatidão entre 80-120%, para isotretinoína e tretinoína foi de 20 ng/mL. Já a menor concentração, cujo pico de resposta foi identificável nas mesmas condições experimentais para isotretinoína e tretinoína foi de 15 ng/mL conforme demonstrados nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14. Limite de quantificação e detecção obtidos para Isotretinoína utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Calculada (µg/mL)			Média (µg/mL)	DP	DPR	EXATIDÃO (%)
0,015 (LD)	0,011	0,012	0,022	0,015	0,006	40,55	100
0,020 (LQ)	0,018	0,023	0,016	0,019	0,003	18,98	95,00
0,025	0,025	0,023	0,024	0,024	0,001	4,17	96,00
0,030	0,031	0,03	0,03	0,030	0,0005	1,90	101,1
0,040	0,040	0,038	0,038	0,039	0,001	2,99	96,67

Tabela 15. Limite de quantificação e detecção obtidos para Tretinoína utilizando método cromatográfico descrito no item 4.1.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Calculada (µg/mL)			Média (µg/mL)	DP	DPR	EXATIDÃO (%)
0,015(LD)	0,017	0,013	0,016	0,015333	0,002082	13,57608	102,22
0,020(LQ)	0,019	0,02	0,02	0,019667	0,000577	2,935679	98,33
0,025	0,026	0,024	0,026	0,025333	0,001155	4,558028	101,33
0,030	0,03	0,03	0,029	0,03	0,000577	1,946125	98,89
0,040	0,042	0,043	0,041	0,042	0,001	2,380952	105,00

4.1.2.4 Verificação da Robustez.

As pequenas alterações nos parâmetros analíticos, como temperatura da coluna, fluxo e proporção dos constituintes da fase móvel, descritas no item 3.2.1.2.4, realizadas para avaliar a susceptibilidade do método a mudanças não demonstraram variações significativas no tempo de retenção dos picos cromatográficos, muito menos na simetria e resolução entre os picos conforme demonstrado nas figuras 19, 20 e 21. Com a diminuição em 10⁰C na temperatura da coluna os tempos de retenção obtidos foram de 6,5 e 7,5 para a isotretinoína e tretinoína respectivamente.

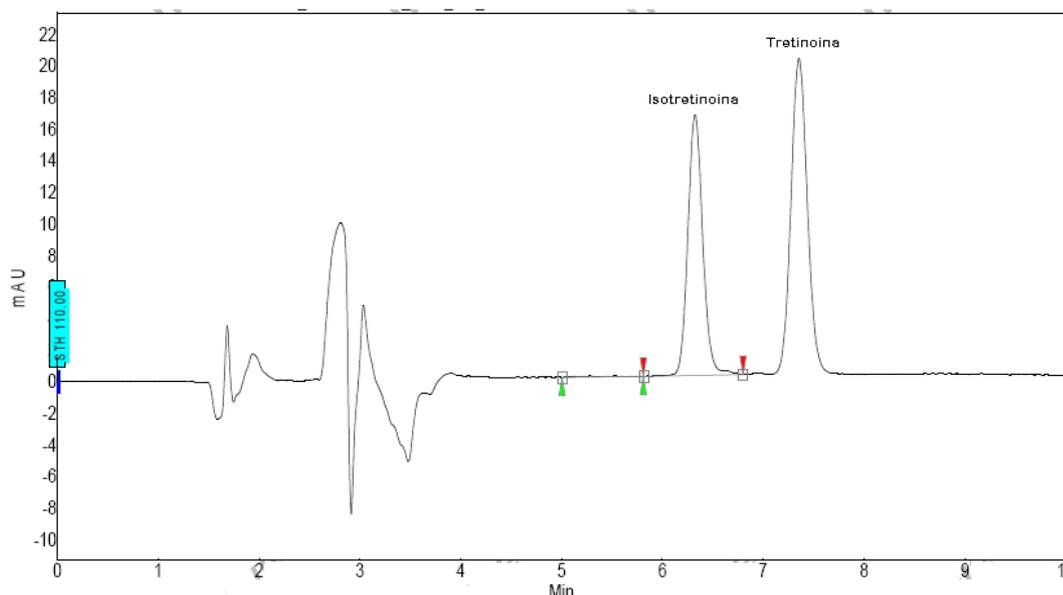


Figura 19: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 0,9 mL/min e forno na temperatura de 50⁰C.

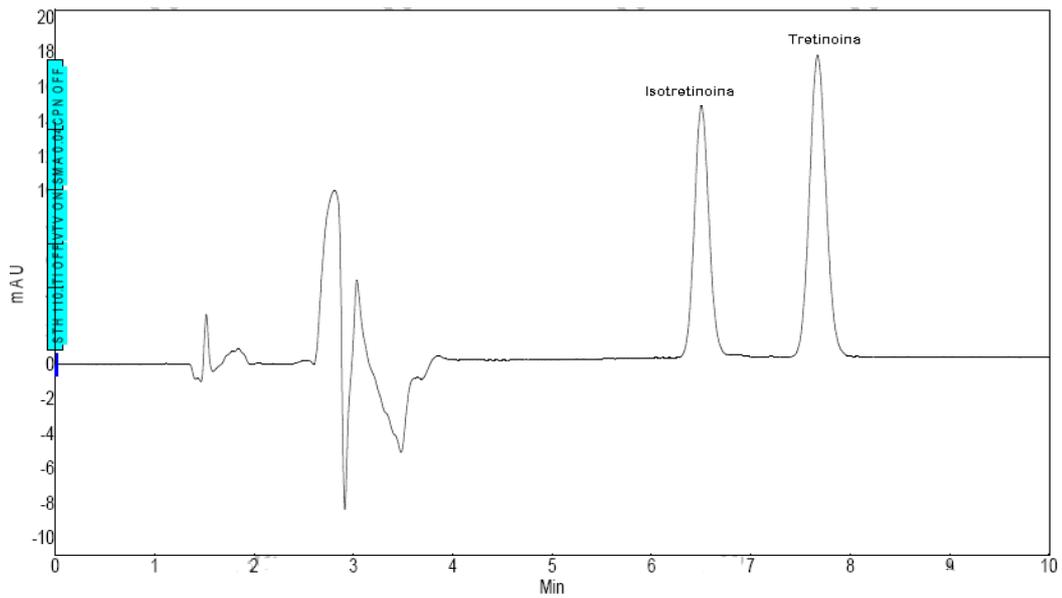


Figura 20: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min e forno na temperatura de 40^oC.

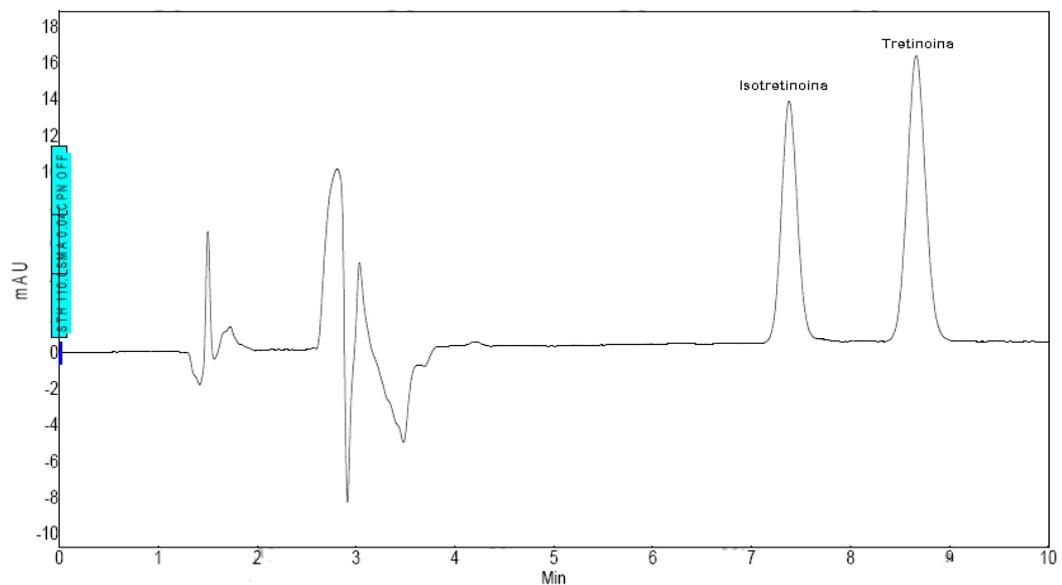


Figura 21: Cromatograma obtido para a isotretinoína e tretinoína utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H₂O na razão de 80:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min e forno na temperatura de 50^oC.

4.1.3. Desenvolvimento e validação de metodologia de extração em fase sólida para determinação da isotretinoína em fígado, pulmão, baço e sangue.

A condição de extração que apresentou maior eficiência de remoção do analito da matriz polimérica do cartucho foi a que utilizou 750 µL de hidróxido de amônio 10 mM como solvente de lavagem, mistura metanol:hidróxido de amônio 10 mM na proporção de 90:10 para primeira eluição e, 100% de metanol para segunda eluição conforme demonstrado pela Tabela 16 (teste de extração n°. 14). Esta condição foi utilizada para extração dos analitos a partir das amostras de fígado, pulmão, baço e sangue animal e, a taxa de recuperação da isotretinoína, em porcentagem, determinada para os diferentes tecidos foi de 96,7; 83,1; 62,1 e 84,4 para fígado, pulmão, baço e sangue respectivamente (Tabela 17), tendo sido efetuada a correção das concentrações determinadas de acordo com o percentual de recuperação do fármaco da matriz polimérica do cartucho, estabelecido como 91,6%.

Tabela 16. Porcentagem de recuperação da isotretinoína, das diferentes condições de extração, a partir da matriz polimérica do cartucho de extração em fase sólida.

Teste de Extração*	Recuperação da isotretinoína (%)
1	49,8
2	52
3	45
4	51,2
5	74,8
6	81,9
7	54,8
8	56,2
9	47,1
10	61,6
11	69,5
12	52,7
13	73
14	91,6
15	50

* Condições experimentais descritas na tabela 8 (pág.55)

Tabela 17. Processo de validação da extração em fase solida da isotretinoína a partir de amostras de fígado, pulmão, baço e sangue de camundongo.

Extrações das amostras		Concentração (µg/mL)			
		Fígado	Pulmão	Baço	Sangue
1	a	3,75	4,08	3,2	3,3
	b	3,77	4,02	3,12	3,31
2	a	5,08	4,16	3,2	3,27
	b	5,05	4,17	3,6	3,27
3	a	5,34	4,62	3,6	4,7
	b	5,35	4,45	4,0	4,6
4	a	3,77	4,34	4,0	3,7
	b	3,78	4,37	3,5	3,7
5	a	5,04	4,44	3,5	4,36
	b	5,00	4,5	3,48	4,3
Média		4,59	4,32	3,52	3,85
DP		0,66	0,17	0,32	0,7
DPR		14,3	3,95	9,1	14,5
Extrações do Padrão		Concentração (µg/mL)			
1	a	4,67	5,7	5,8	4,5
	b	4,70	6,0	5,88	4,5
2	a	4,8	4,7	5,49	4,57
	b	4,8	4,7	5,5	4,6
Média		4,75	5,2	5,67	4,54
DP		0,06	0,67	0,19	0,01
DPR		1,26	12,5	3,69	0,34
Recuperação (%)		96,7	83,1	62,1	84,4

A taxa de recuperação da tretinoína, em porcentagem, determinada para os diferentes tecidos foi de 93,8; 86,1; 72,2 e 81,2 para fígado, pulmão, baço e sangue respectivamente (tabela 18).

Os resultados analisados em quintuplicata apresentaram coeficiente de variação inferior a 20%, dentro dos limites aceitáveis de precisão e exatidão tanto para a isotretinoína quanto para a tretinoína nos diferentes tecidos analisados.

Tabela 18. Processo de validação da extração em fase sólida da tretinoína a partir de amostras de fígado, pulmão, baço e sangue de camundongo.

Extrações das amostras		Concentração (µg/mL)			
		Fígado	Pulmão	Baço	Sangue
1	a	0,25	0,3	0,07	0,14
	b	0,2	0,3	0,08	0,135
2	a	0,25	0,32	0,06	0,12
	b	0,27	0,3	0,06	0,115
3	a	0,17	0,33	0,06	0,14
	b	0,18	0,35	0,06	0,14
4	a	0,27	0,29	0,06	0,11
	b	0,27	0,3	0,07	0,11
5	a	0,2	0,31	0,07	0,12
	b	0,19	0,3	0,06	0,12
Média		0,23	0,31	0,065	0,13
DP		0,013	0,012	0,07	0,0125
DPR		8,1	4,23	12,3	9,6
Extrações do Padrão		Concentração (µg/mL)			
1	a	0,24	0,38	0,09	0,17
	b	0,26	0,4	0,1	0,18
2	a	0,24	0,35	0,09	0,14
	b	0,24	0,33	0,1	0,16
Média		0,245	0,36	0,09	0,16
DP		0,012	0,023	0,001	0,015
DPR		4,8	6,3	1,44	9,3
Recuperação (%)		93,8	86,1	72,2	81,2

4.1.4. Validação de metodologia de extração em fase sólida para determinação da isotretinoína em células K562.

A condição de extração utilizada para a remoção dos analitos em células K562 foi a que utilizou 100% de metanol para primeira e segunda eluição sem etapa de lavagem. Esta condição foi empregada com o intuito de minimizar o número de interferentes na amostra já que se trata de dois analitos com concentrações baixas em uma matriz complexa. A taxa de recuperação da isotretinoína determinada, em porcentagem, foi de 58,5 e 49,5 para o botão celular e sobrenadante respectivamente (Tabela 19). Já a taxa de recuperação da tretinoína, determinada para o botão celular e o sobrenadante foi de apenas 10% (Tabela 20). Mesmo com baixas taxas de recuperação obtidas os resultados analisados apresentaram coeficiente de variação inferior a 20%, dentro dos limites aceitáveis de precisão e exatidão tanto para a isotretinoína quanto para a tretinoína.

Tabela 19. Validação da extração em fase sólida da isotretinoína a partir de amostras de sobrenadante e botão celular de células K562.

Extrações das amostras		Concentração (µg/mL)	
		K 562	Sobrenadante
1	a	15,54	19,6
	b	15,53	19,4
2	a	16,04	19,6
	b	16,4	19,56
3	a	16,4	19,8
	b	16,5	19,6
4	a	16,6	19,8
	b	16,4	19,8
Média		16,2	19,6
DP		0,14	0,08
DPR		0,86	0,79
Extrações do Padrão		Concentração (µg/mL)	
1	a	27,6	40,04
	b	26	40,4
2	a	29,2	39,6
	b	29,2	40,1
Média		28	40,0
DP		0,784	0,15
DPR		2,8	0,77
Recuperação (%)		58	49,5

Tabela 20. Validação da extração em fase sólida da tretinoína a partir de amostras de sobrenadante e botão celular de células K562.

Extrações das amostras		Concentração (µg/mL)	
		K 562	Sobrenadante
1	a	0,034	0,046
	b	0,030	0,050
2	a	0,028	0,044
	b	0,030	0,046
3	a	0,030	0,054
	b	0,034	0,04
4	a	0,036	0,046
	b	0,030	0,044
Média		0,031	0,046
DP		0,001	0,002
DPR		3,2	4,3
Extrações do Padrão		Concentração (µg/mL)	
1	a	0,31	0,50
	b	0,32	0,44
2	a	0,31	0,46
	b	0,32	0,47
Média		0,315	0,47
DP		0,002	0,002
DPR		1,22	0,4
Recuperação (%)		10	10

4.2 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS

4.2.1. Estudo de desenvolvimento da formulação.

As formulações de nanocápsulas contendo isotretinoína foram obtidas com 150 mg de PLGA 85:15, gotejamento com agulha de diâmetro interno de 0,317mm e diferentes quantidades (p/v) de isotretinoína: 5mg, 6mg e 7 mg e variação na concentração de poloxamer de 75 a 150 mg como descrito na tabela 9.

A análise das características físico-químicas das dispersões de nanocápsulas logo após a preparação indicou que a maior parte das formulações de nanocápsulas com PLGA 85:15 produziu um líquido amarelo claro de aspecto leitoso, presença de translucência azulada, pH entre 7,3 - 7,4 e ausência de indicadores de instabilidade como cristais alaranjados de isotretinoína, cremagem pelo excesso de tensoativos e óleo, aglomerados e sedimentos de polímeros não redispersíveis.

Duas formulações (NC-ISO 4 e 5) apresentaram precipitados alaranjados de isotretinoína após 48 horas de preparação devido a presença de fármaco em excesso. Apenas uma formulação (NC-ISO 3) apresentou menor translucência que as demais, devido a menor quantidade de tensoativo hidrofílico empregado na preparação, além disso, também foram observados resíduos de natureza hidrofóbica aderidos ao balão de rotaevaporação. A menor quantidade de tensoativo hidrofílico empregado no preparo desta formulação interferiu diretamente na formação das nanocápsulas.

Com o acréscimo da concentração de poloxamer nas formulações (75, 125 e 150 mg de poloxamer) foi observada a diminuição do tamanho médio das nanopartículas conforme demonstrado na tabela 21. Este parâmetro tem suma importância, já que a concentração do agente emulsionante na formulação está relacionada à não formação das nanocápsulas ou a agregação das partículas (MOSQUEIRA et al, 2000; MU, 2003; BOUCHEMAL et al, 2004.) e conseqüentemente desestabilização do sistema coloidal.

A otimização da formulação foi, então, demonstrada pela obtenção de partículas com diâmetro médio em torno de 170nm e índice de polidispersão próximo de 0,1.

Tabela 21. Efeito do Poloxamer sobre a formulação de nanocápsulas com incorporação da isotretinoína.

Formulação	Poloxamer	Tamanho médio (Z)	PDI
NC- ISO 3	75 mg	195,4 nm	0,336
NC- ISO 2	125 mg	193,0 nm	0,310
NC- ISO 1	150 mg	169,4 nm	0,116

O tamanho final das partículas dependeu tanto da composição e dos parâmetros envolvidos na formação da emulsão primária como viscosidade e concentração do óleo na fase orgânica, concentração e massa molar do polímero e tipo de solvente orgânico, quanto da concentração e tipo de agente emulsionante utilizado. Vários autores como Mosqueira (2000), Guinebretiere (2002), Bouchemal (2004), Song (2006), Legrand (2007), Moinard-Chcecot (2008) e seus colaboradores também avaliaram em seus trabalhos as influências destes parâmetros no perfil de formação de nanopartículas pela deposição de polímero pré-formado.

A comparação entre o diâmetro das nanocápsulas com ausência do fármaco (171 nm e PDI 0,1) e o diâmetro das nanocápsulas contendo a isotretinoína (169,4nm e PDI 0,09) permitiu observar que, a encapsulação do fármaco não afeta o diâmetro médio das partículas assim como demonstrado na figura 22.

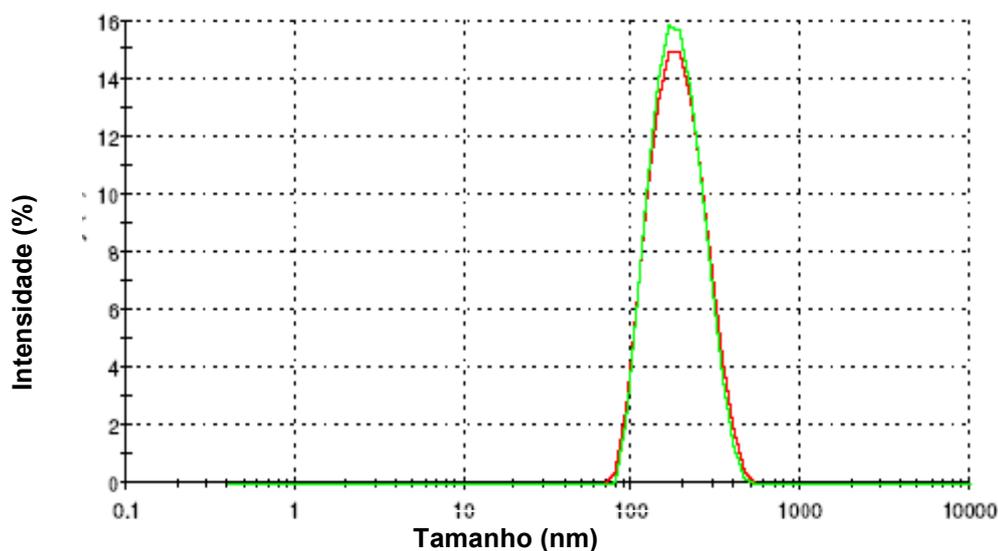


Figura 22: Distribuição de tamanho das nanocápsulas na presença (vermelho) e ausência (verde) do fármaco encapsulado.

4.2.2. Estabilidade a longo prazo e acelerada

A dispersão de nanocápsulas de isotretinoína (NC-ISO 1) submetida ao teste de estabilidade acelerada apresentou resultados satisfatórios quanto à estabilidade, ou seja, não exibiram alterações tanto das suas características organolépticas quanto do diâmetro médio das partículas conforme demonstrado na tabela 22.

O pequeno precipitado creme, redispersível, observado na formulação 2 pode ser atribuído a quantidade de poloxamer empregada na preparação. Já a formulação de número 5, contendo 0,7 mg/mL de isotretinoína, exibiu cristais de isotretinoína alaranjados, agregados e precipitados pelo excesso de fármaco empregado (Figura 23). A completa ausência de agregados ou sedimentos contendo cristais de cor laranja em concentrações inferiores a 0,6 mg/mL indicou que a isotretinoína nesta concentração foi dissolvida na fase oleosa nanoencapsulada e que a quantidade de poloxamer empregada garantiu a completa formação das nanopartículas (Tabela 22).

Tabela 22. Estabilidade acelerada de nanocápsulas contendo isotretinoína.

Testes de estabilidade acelerada para resistência	Formulações NC-ISO			
	1	2	3	4-5
Estresse mecânico (≈150 rotações /minuto, 37°C, 48h)	Estável	Estável	Precipitado laranja de isotretinoína	Precipitado laranja de isotretinoína
Centrifugação 2500 rpm/1hora	Estável	Pequeno precipitado creme redispersível	Precipitado laranja de isotretinoína	Precipitado laranja de isotretinoína



Figura 23: Fotomicrografia da dispersão de nanocápsulas (NC-ISO 5) demonstrando cristais de isotretinoína.

Nos ensaios de resistência aos ciclos de congelamento e descongelamento, efetuados apenas com a dispersão contendo 0,5 mg/mL de isotretinoína que permaneceu visivelmente estável (NC-ISO1), formou-se, após 30 dias, precipitado redispersível. A formação deste precipitado foi crescendo gradativamente à medida que a amostra permaneceu exposta ao estresse de congelamento e descongelamento, entretanto foi possível observar que o diâmetro médio das populações permaneceu em torno de 200 nm como demonstrado na Figura 24. Antes do ensaio de resistência aos ciclos de congelamento e descongelamento a dispersão de nanocápsulas possuía uma única população que ocupava 100% do volume da dispersão e PDI de 0,1. A partir do décimo ciclo de congelamento e descongelamento foi possível observar uma segunda população, com diâmetro médio de 1µm, que ocupava 80% do volume da dispersão, o surgimento de uma segunda população também foi acompanhado pela alteração do valor do PDI de 0,1 para 0,3.

Em experimento semelhante realizado por Santos e colaboradores (2005), com nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de composição similar para quantidade de fase aquosa/tensoativo hidrofílico e proporção de fase orgânica/oleosa, a formulação resistiu ao estresse de congelamento e descongelamento por 45 dias. Fundamentados na observação macroscópica para a análise da ocorrência de precipitado, cremagem e agregados. No presente trabalho, o comportamento das amostras foi monitorado também por medidas do tamanho médio e índice de polidispersibilidade por técnica de espalhamento de luz, permitindo o acompanhamento direto de alterações que, mesmo não observadas macroscopicamente, pudessem indicar a ocorrência de instabilidade da formulação.

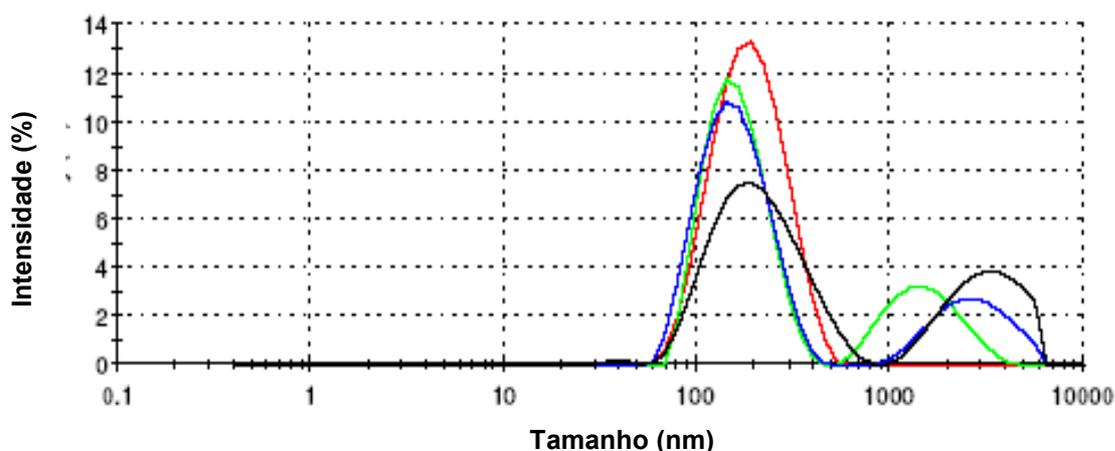


Figura 24: Distribuição de tamanho da dispersão NC-ISO 1 durante ciclo de congelamento e descongelamento, após a preparação (vermelho), 10 ciclos (verde), 15 ciclos (azul), 30 ciclos (preto).

Após o teste de centrifuga realizado com a dispersão de nanocápsulas, nenhum óleo livre foi detectado, mas foi observada a presença de um pequeno precipitado, que ocupa menos que 1% do volume total da dispersão. Este precipitado é provavelmente formado por nanopartículas, sejam nanoesferas e/ou nanocápsulas aglomeradas que permaneceram com tamanho médio superior a 400 nm após ressuspensão, conforme demonstrado pela Figura 25.

O sobrenadante coletado após a centrifugação da amostra obtida demonstrou que a maioria das populações de nanocápsulas com tamanho inferior a 300 nm permaneceram estáveis na dispersão. Já no precipitado ressuspenseo apareceram populações de nanopartículas com tamanhos aproximados a 400 nm também detectadas na dispersão antes de centrifugar (Figura 25).

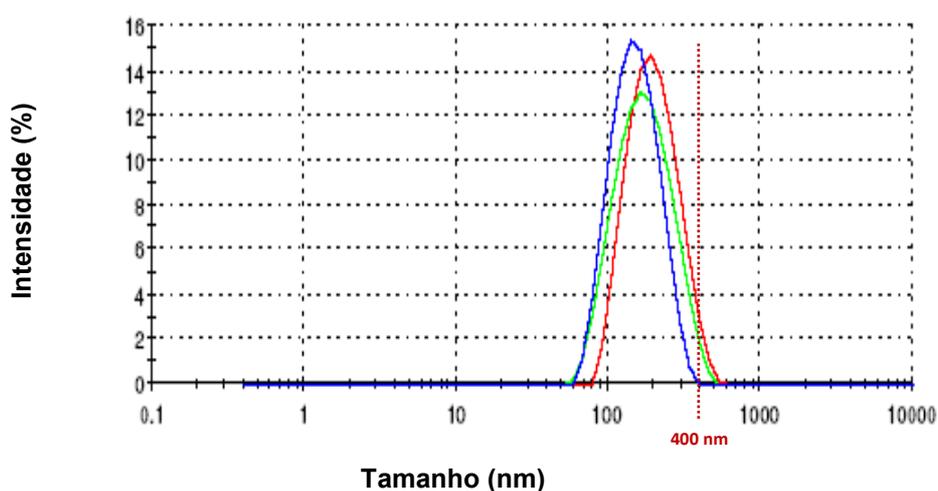


Figura 25: Distribuição de tamanho antes e após centrifugação, dispersão (verde), sobrenadante (azul) e precipitado ressuspenseo (vermelho).

Teixeira e colaboradores, em 2005, também obtiveram nas suas dispersões de nanocápsulas um pequeno pellet formado no fundo do tubo após teste da centrifuga, o qual foi atribuído à formação de nanoesferas devido à inadequada deposição do polímero sobre a interface das gotículas oleosas da emulsão no meio aquoso. Neste trabalho, como nenhum óleo livre foi detectado nas formulações analisadas, acredita-se que o óleo foi completamente coberto pelo polímero.

Embora o processo de centrifugação tenha permitido observar um pequeno precipitado, os resultados demonstrados na figura 26, obtidos na pré e pós centrifugação das amostras da NC-ISO 1, demonstraram que o diâmetro médio das partículas não sofreu alteração.

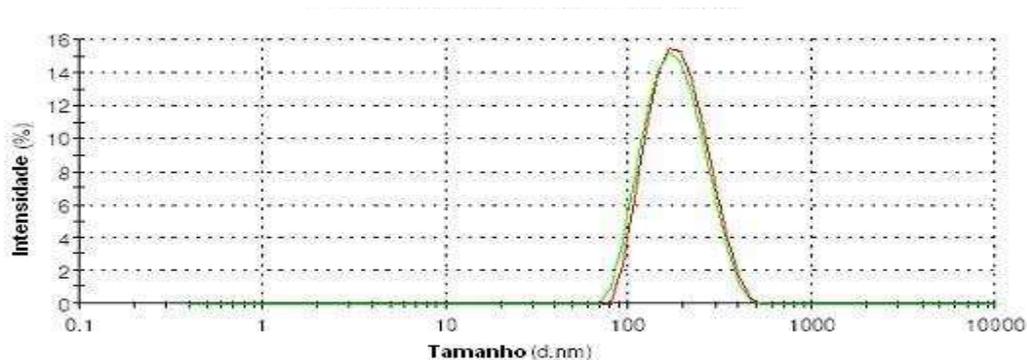


Figura 26: Distribuição de tamanho da NC-ISO 1 antes (—) e pós-centrifugação (—).

A dispersão coloidal de nanocápsulas também foi observada quanto à estabilidade ao longo de nove meses. Esta avaliação consistiu na observação do diâmetro médio das partículas, na observação de variáveis macroscópicas e microscópicas e, a tendência a agregação e sedimentação. As tabelas 23 e 24 e, a figura 27 demonstram que as nanocápsulas contendo isotretinoína mantiveram-se estáveis quanto aos aspectos observados ao longo de 9 meses sob refrigeração a 4°C.

É importante mencionar também que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas em função do tempo pôde ser monitorada pela determinação da mudança na sua distribuição de tamanho. Também por esta avaliação, a dispersão apresentou variação mínima em 9 meses, quando armazenada a 4°C, isso pôde ser constatado pelos valores de diâmetro e PDI descritos na tabela 23 e pela figura 27, que ilustra a estabilidade da formulação.

Tabela 23. Tamanho e PDI para NC-ISO 1, durante 9 meses de avaliação sob refrigeração a 4°C.

Formulação	Tempo (meses)	Diâmetro Médio (nm)	PDI
NC-ISO 1	Recém-preparada	169,4	0,094
	3	170	0,105
	4	169	0,127
	5	170	0,112
	9	172	0,141

Tabela 24. Estabilidade segundo critérios macro e microscópicos durante 9 meses de avaliação sob refrigeração a 4°C da NC-ISO 1

Formulação	Macroscopia	Microscopia
NC-ISO 1	Aspecto leitoso, opalescente, cor amarelo pálido, translucência azulada e ausência de grumos ou resíduos.	Ausência de agulhas ou cristais de isotretinoína, gotículas de óleo e vestígio de polímeros.

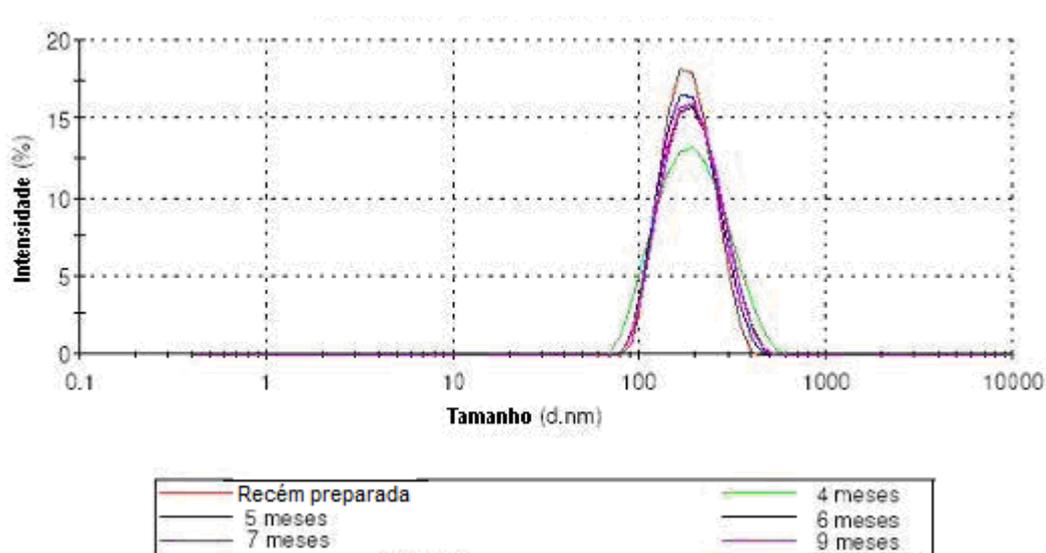


Figura 27: Distribuição de tamanho das partículas da formulação da NC-ISO 1 ao longo de 9 meses armazenados em geladeira a 4°C.

4.2.3. Tamanho médio das partículas e índice de Polidispersibilidade (PDI)

O método de adição da fase orgânica à fase aquosa através de gotejamento com agulha de diâmetro interno de 0,3175 mm (G23) foi fundamental para obter populações de tamanhos médios abaixo de 200 nm e PDI 0,1 para nanocápsulas compostas tanto por PLGA 85:15 quanto por PLA. O reduzido diâmetro interno da agulha G23 garantiu uniformidade de fluxo à fase orgânica quando gotejada. Quanto mais uniforme o fluxo do gotejamento e menores as gotículas produzidas durante o processo da emulsificação, menor o tamanho médio e PDI das partículas resultantes, logo, maior a uniformidade de tamanho entre as populações de nanocápsulas conforme demonstrado na figura 28.

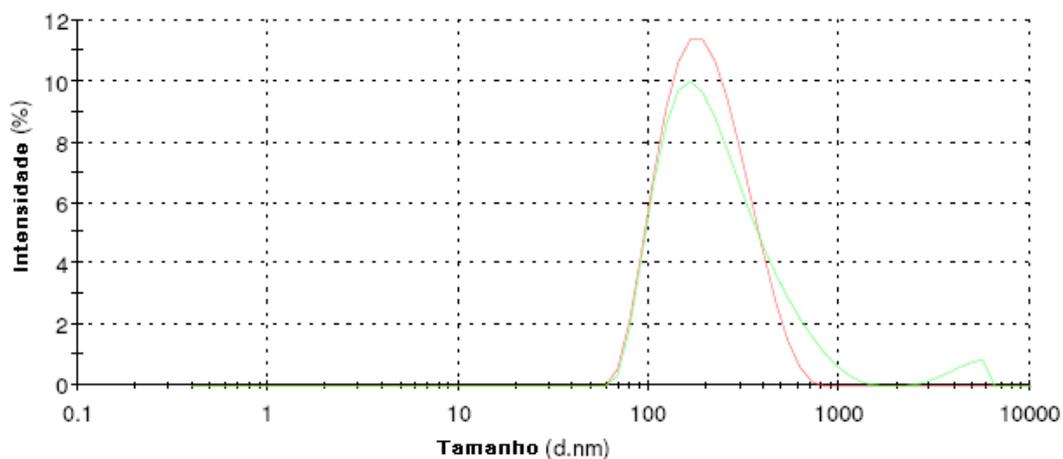


Figura 28: Distribuição média de tamanho de nanocápsulas submetidas a rotaevaporação (—) – 500 ATM (10 min), – 600 ATM (110 min) e (—) –600 ATM (120 min).

Tabela 25. Reprodutibilidade do método de preparo das dispersões de nanocápsulas.

Preparações	Diâmetro Médio (nm)	PDI
1	163	0,107
2	174	0,1
3	173	0,118
4	171	0,094
5	179	0,116
6	169	0,197
7	169	0,197
8	174	0,182
9	166	0,188
10	173	0,11
11	169	0,2
12	173	0,12
13	164	0,162
15	170	0,1
Média	170,5	
DP	4,15	
DPR	2,43	

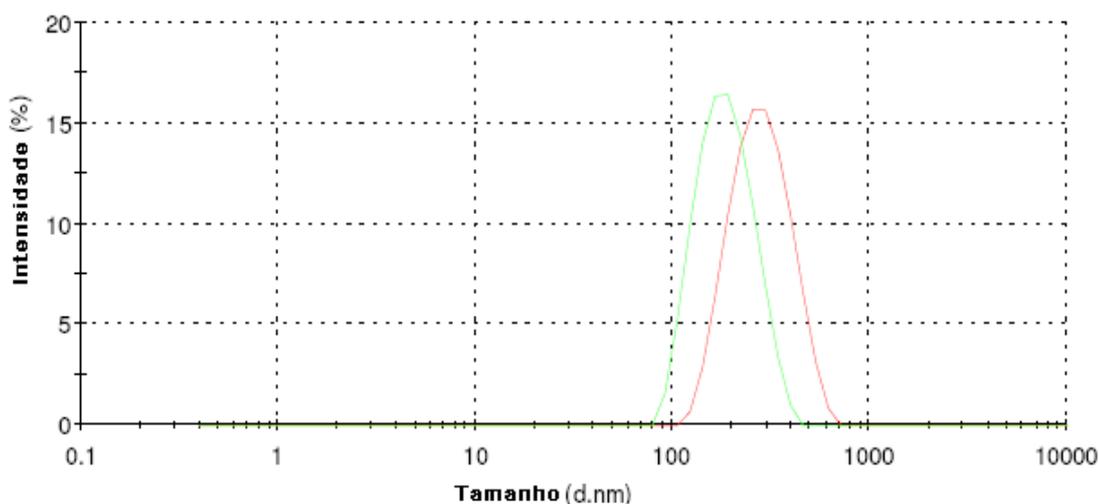


Figura 29: Distribuição de tamanho da preparação NC-ISO 1 (—) antes da rotaevaporação (ainda no estado de nanoemulsão) e (—) após rotaevaporação (dispersão de nanocápsula).

O perfil de formação de nanopartículas nos sistemas e os índices de polidispersão obtidos foram similares entre as amostras produzidas através do gotejamento com agulha G23 conforme demonstrado na tabela 25. Os resultados encontrados neste trabalho permitem observar que o reduzido diâmetro do orifício da agulha demonstrou ser pequeno suficiente para influenciar na obtenção de PDI com valores próximos a 0,1, não sendo observada formação de populações de micropartículas. Deste modo foi possível viabilizar, com reprodutibilidade, a preparação de sistemas com diâmetro e polidispersão inferiores àqueles obtidos pelo método de deposição de polímero pré-formado anteriormente descritos na literatura. Santos e colaboradores (2005) e Santos-Magalhães (2000) utilizaram diferentes componentes na formulação de nanocápsulas, bem como as mais variadas proporções entre os mesmos e obtiveram populações de nanocápsulas de PLGA 50:50 com média de tamanho 324 nm e 224 nm respectivamente. Cauchetier e colaboradores (2003) obtiveram nanocápsulas com tamanhos médios de 230 nm; já Teixeira e colaboradores em 2005, obtiveram nanocápsulas de tamanhos médios inferiores a 300 nm e PDI de aproximadamente 0,4.

Durante o método de preparação das nanocápsulas, uma etapa crítica no processo foi a evaporação do solvente orgânico nos primeiros minutos. A pressão inicial deve ser regulada no início da rotaevaporação para evitar o aparecimento de bolhas de ar que podem formar uma segunda interface e prejudicar a precipitação uniforme do polímero sobre as gotículas oleosas da emulsão, com conseqüente formação de microcápsulas, como demonstrado na figura 29.

A pressão de -500 atm durante o tempo inicial (nos primeiros 10 minutos) de evaporação do solvente orgânico (acetona) foi fundamental para uma precipitação rápida e uniforme do polímero sobre as gotículas. O emprego de pressão inicial a -600 atm gerou turbulência visível no interior do balão, com aparecimento de bolhas de ar durante este período inicial de rotaevaporação, o que pode ter contribuído para a formação de micropopulações e a precipitação defeituosa do polímero sobre elas.

Além de otimizar as concentrações dos componentes da formulação, o método de preparação também foi padronizado tendo sido observado que a uniformidade de gotejamento e tamanho das gotículas da emulsão foram fundamentais para obtenção de amostras reprodutíveis com tamanhos médios menores que 200nm e PDI de 0,1 conforme demonstrado na Tabela 25.

Teixeira e colaboradores (2005) observaram tamanhos similares para a nanoemulsão correspondente à dispersão de nanocápsulas. Jalil e Nixon (1990) observaram que, ao preparar nanocápsulas, durante o processo de evaporação do solvente ocorre um decréscimo gradual no volume e conseqüentemente um acréscimo na viscosidade da emulsão que afeta o equilíbrio do tamanho das gotículas. Este processo pode resultar em coalescência e aglomeração das gotículas oleosas, o que pode ser resolvido com a adição de tensoativo hidrofílico na fase aquosa contínua, o qual fornece uma fina camada protetora em volta das gotículas, reduz a coalescência e estabiliza a emulsão.

4.2.4. Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em nanocápsulas de PLGA.

4.2.4.1. Separação do fármaco livre

Para determinar o perfil de eluição das nanocápsulas de PLGA através da coluna de separação, foram aplicados 0,5 ml da amostra de nanocápsulas contendo isotretinoína e promovida sua eluição com o auxílio de tampão fosfato. Foram coletadas frações de 1,5 ml as quais foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 360 nm. As nanocápsulas eluíram nas frações de 8 a 15, enquanto o fármaco não encapsulado eluiu nas frações de 25 a 30. O perfil de eluição das nanocápsulas está representado na figura 30.

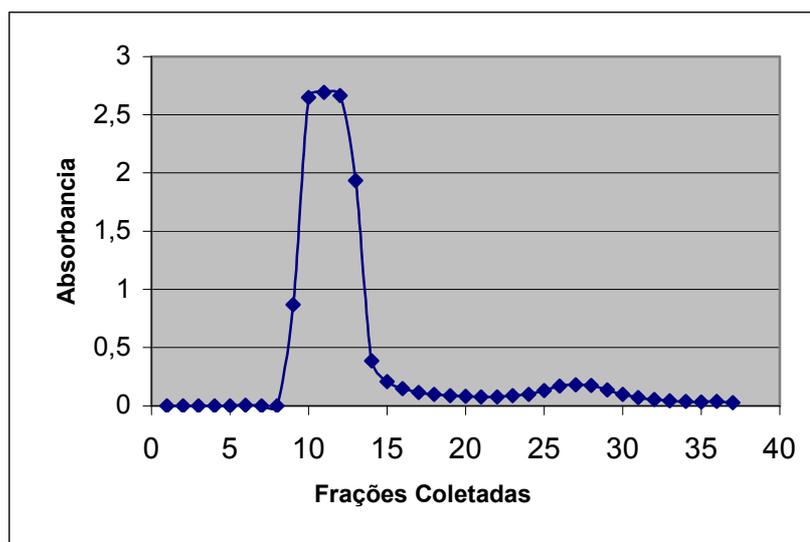


Figura 30: Perfil de eluição das nanocápsulas contendo isotretinoína em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 360 nm.

4.2.4.2. Cálculo da quantidade de isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.

Para o doseamento do fármaco encapsulado, inicialmente foram reunidas as frações contendo nanocápsulas (8 a 15), perfazendo um volume de 12 mL. Em seguida, foi retirado 0,5 mL desta reunião de frações para rompimento das nanocápsulas e precipitação do polímero com etanol na proporção 1:5, com posterior centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi então removido e quantificado por HPLC segundo método descrito no item 4.1.2.

A partir da concentração de fármaco quantificada em $\mu\text{g/mL}$ foi obtida a concentração total de fármaco na preparação. Pela equação da curva padrão de isotretinoína determinada por HPLC (Figura 18), calculou-se a concentração de isotretinoína de 0,0034 mg/mL, sendo a amostra formada por 0,5 mL das frações de nanocápsulas coletadas da coluna, mais 2,5 mL de etanol. Logo, a quantidade de isotretinoína nas frações foi calculada multiplicando-se este valor por 3: $0,0034 \times 3 = 0,0102$ mg, sendo esta a quantidade de isotretinoína encontrada em 0,5 mL da fração de nanocápsulas contendo ISO_E.

A quantidade total de isotretinoína eluída da coluna foi $0,0102 \times 12 \text{ mL} = 0,245$ mg de isotretinoína, que corresponde à quantidade de isotretinoína eluída da coluna após a

aplicação de 0,5 mL da amostra. Multiplicando-se este valor por 10, e dividindo por 0,5 (volume aplicado na coluna) foi encontrada a quantidade de isotretinoína encapsulada nos 10 mL de nanocápsulas preparadas inicialmente: $(0,245 \times 10) / 0,5 = 4,9$ mg de ISO_E

Considerando-se que foram pesados, na etapa de preparação, 5 mg de isotretinoína, e calculados 4,9 mg encapsulados, a eficiência de encapsulação absoluta foi de 98% do fármaco (Tabela 26).

$$EC_1 = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ISO}_E) \times 100}{\text{Total de fármaco adicionado (ISO}_A)}$$
$$EC_1 = \frac{4,9 \text{ mg} \times 100}{5,0 \text{ mg}}$$

A eficiência de encapsulação foi calculada para as amostras de nanocápsulas preparadas com teor de isotretinoína em 5 mg aproximadamente, visto que ocorreu maior encapsulação do fármaco nessa dosagem. Nas experiências com quantidades maiores de fármaco foi verificada saturação da fase oleosa, resultando em precipitação do fármaco na fase aquosa, diminuindo a eficiência de encapsulação (Tabela 27). Mu e Feng (2003) demonstraram para o paclitaxel o mesmo comportamento de saturação.

Utilizando-se 3,8 mM de PLGA na preparação de nanocápsulas, foi possível encapsular a quantidade 4,9 mg de isotretinoína. Admitindo-se 5 mg como sendo a máxima quantidade de ISO_E obtida, a razão molar entre isotretinoína (1,50 mM) e PLGA (3,8 mM) foi de aproximadamente 1:4.

$$EC_2 = \frac{1,50 \text{ mM de isotretinoína}}{3,8 \text{ mM PLGA}}$$

$$EC_2 = 1:4$$

Tabela 26. Eficiência de encapsulação da isotretinoína em Nanocápsulas de PLGA.

Nanosistema carreados	Eficiência de Encapsulação Absoluta (%)	Mg isotretinoína / mL de preparação	
		Teórica	Calculada
Nanocápsulas de PLGA	98%	0,5	0,49

Tabela 27: Comparação entre os resultados de Eficiência de Encapsulação Absoluta (EC) das nanocápsulas obtidas com as formulações contendo de 0,5 a 1,0 mg/mL de isotretinoína.

Concentração inicial isotretinoína (mg/ mL)	Quantidade de fármaco encapsulado FE (mg)	Eficiência de Encapsulação %
0,5 mg/mL	4,9 mg	98%
0,6 mg/mL	4,3 mg	77%
0,7 mg/mL	5,1 mg	73%
1,0 mg/mL	4,7 mg	47%

Tendo em vista os resultados obtidos para a eficiência de encapsulação a formulação escolhida para dar continuidade aos estudos foi a que utilizou a quantidade inicial de 5 mg de isotretinoína para 10 mL de preparação.

4.2.5. Fotoestabilidade da isotretinoína em nanocápsulas de PLGA

Os retinoides, classe de compostos ao qual pertence a isotretinoína, demonstram grande instabilidade quando expostos a luminosidade. Durante o processo de fotodegradação são gerados alguns isômeros ou produtos não retinoides, os isômeros de maior prevalência são a tretinoína (ácido all-trans-retinóico), isotretinoína (ácido 13-*cis*-

retinóico) e a alitretinoína (ácido 9-*cis*-retinóico) (BRISAERT e PLAIZIER-VERCAMMEN, 2000; IOELE *et al*, 2005).

A instabilidade dos retinóides tem sido alvo de estudo de alguns autores como Tan e colaboradores (1992 e 1993) que avaliaram a degradação da tretinoína e da isotretinoína no estado sólido e em solução. Brisaert e Plaizier-Vercammen (2007) demonstraram que a tretinoína em loções foi rapidamente degradada quando submetida ao comprimento de onda de 420 nm. Por outro lado a inclusão da tretinoína em lipossomas (BRISAERT *et al*, 2001) e niossomas (MANCONI *et al*, 2003) promoveu redução na taxa de fotodegradação. Entretanto, a fotoproteção conferida por essas vesículas foi variável e dependente de sua estrutura e composição.

Yap e colaboradores (2005) e loele e colaboradores (2005) demonstraram que a inclusão da isotretinoína em hidroxipropil- β -ciclodextrina e lipossomas, respectivamente, minimizou sua fotodegradação.

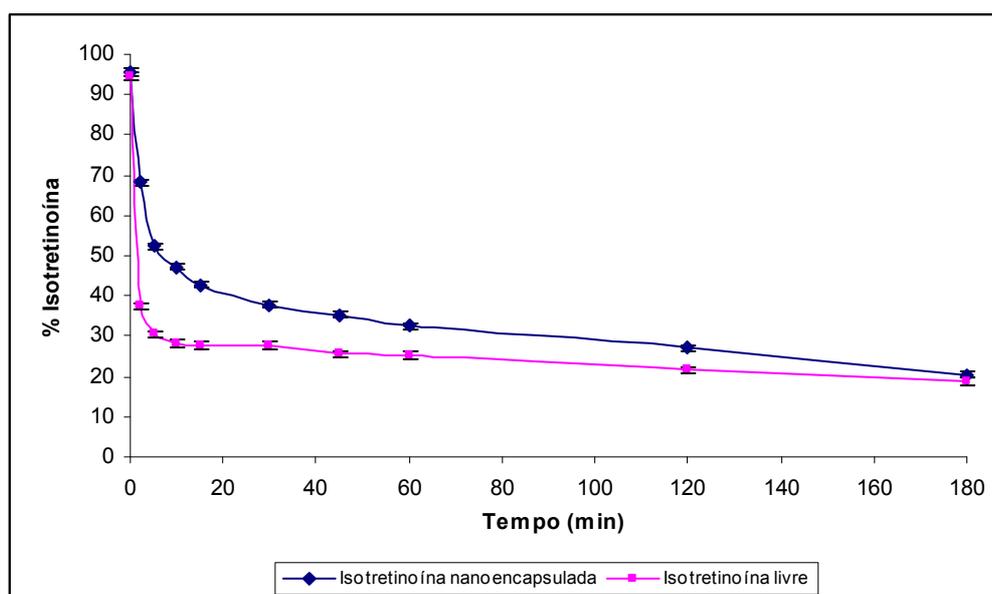


Figura 31: Perfil de fotodegradação da isotretinoína livre e encapsulada em nanocápsulas de PLGA submetidas à radiação UVA.

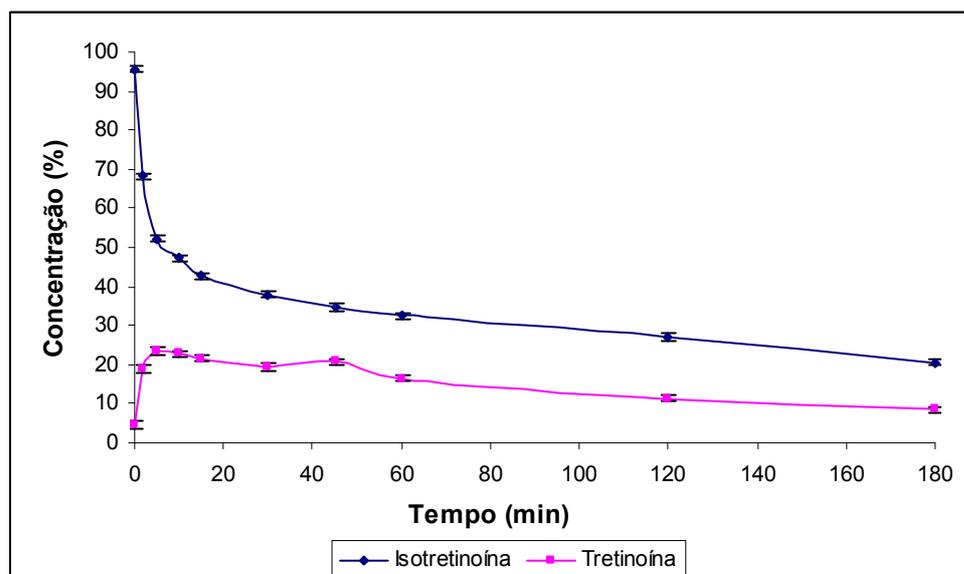


Figura 32: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA.

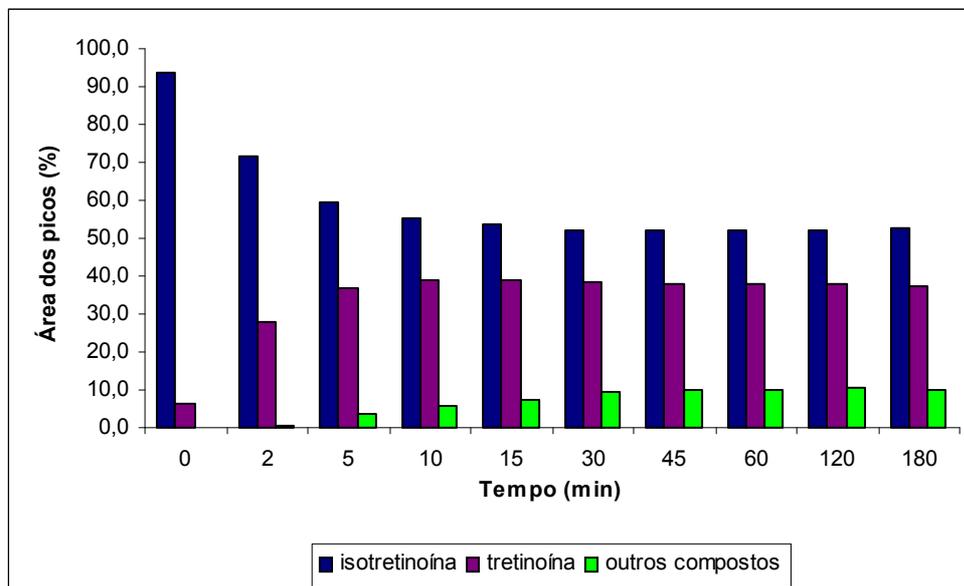


Figura 33: Compostos observados por cromatografia líquida de alta eficiência durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína encapsulada (% de área dos picos).

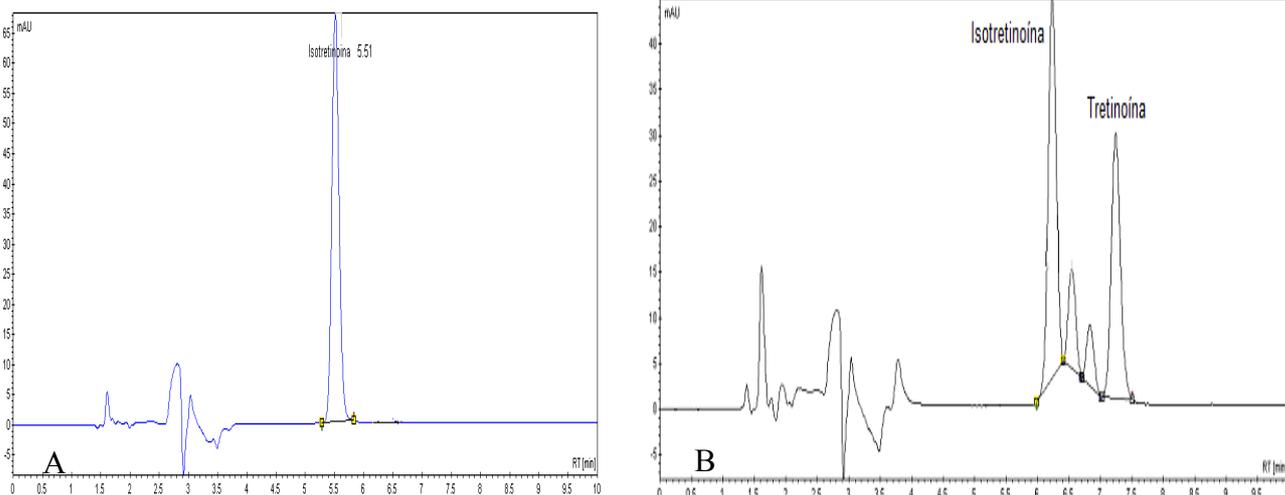


Figura 34: Cromatograma de amostra de nanocápsula de PLGA, antes e depois de 3 horas da exposição à luz UVA (365 nm), obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

Neste trabalho foi possível demonstrar que nos primeiros minutos de exposição a radiação UV, a isotretinoína presente nas nanocápsulas de PLGA mantem cerca de 20% de teor acima daquele determinado para a isotretinoína livre, demonstrando que a nanoencapsulação promove redução na taxa de fotodegradação da isotretinoína (Figura 31). A fotoproteção pode ser atribuída à cristalinidade do polímero e sua habilidade de refletir e espalhar a radiação UV (PERUGINI et al, 2002; JIMENEZ et al, 2004). Também foi observada a distinção entre a degradação que ocorre por isomerização em outros retinoides como a tretinoína (Figura 32), e a degradação que ocorre por fotólise em outros produtos supostamente não retinoides (Figura 33). Estes resultados podem ser visualizados também pelos cromatogramas da isotretinoína apresentados na figura 34 que demonstram a isotretinoína encapsulada antes e após 3 horas de exposição à radiação UVA, respectivamente. Este mesmo comportamento foi demonstrado para a tretinoína presente em cremes por Tashtoush e colaboradores em 2008, ficando claro que a isomerização entre isotretinoína e tretinoína é extensa, mas não é o mecanismo exclusivo da fotodegradação causada pela radiação UVA.

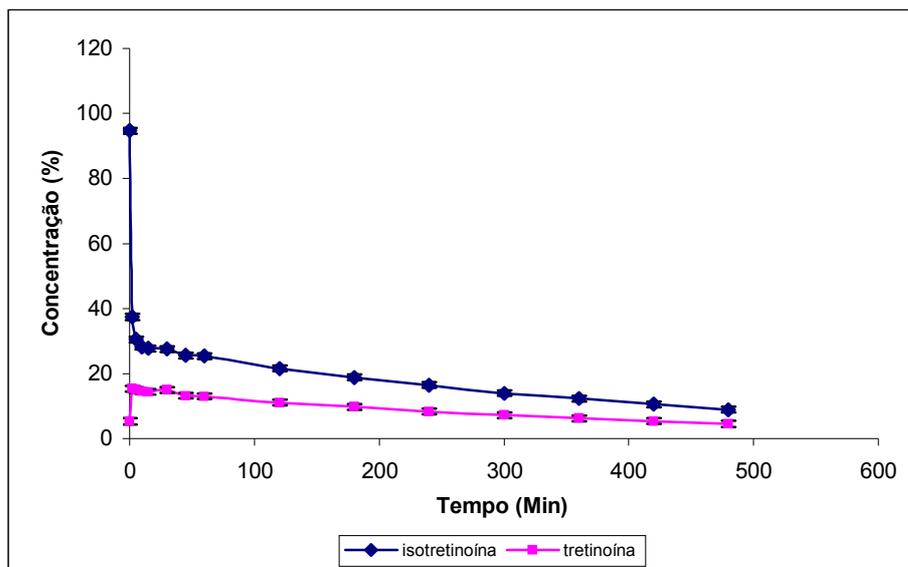


Figura 35: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína livre.

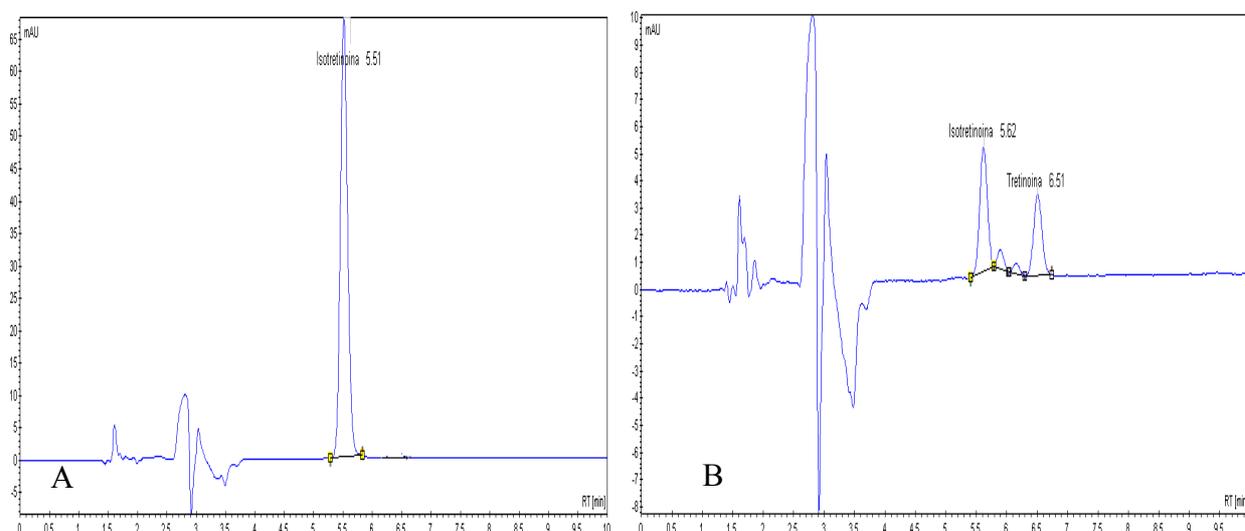


Figura 36: Cromatograma de amostra de isotretinoína na sua forma livre, antes (A) e depois de 3 horas (B) da exposição a luz UVA (365 nm), obtidos por HPLC-UV utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN:H₂O na razão de 85:15 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

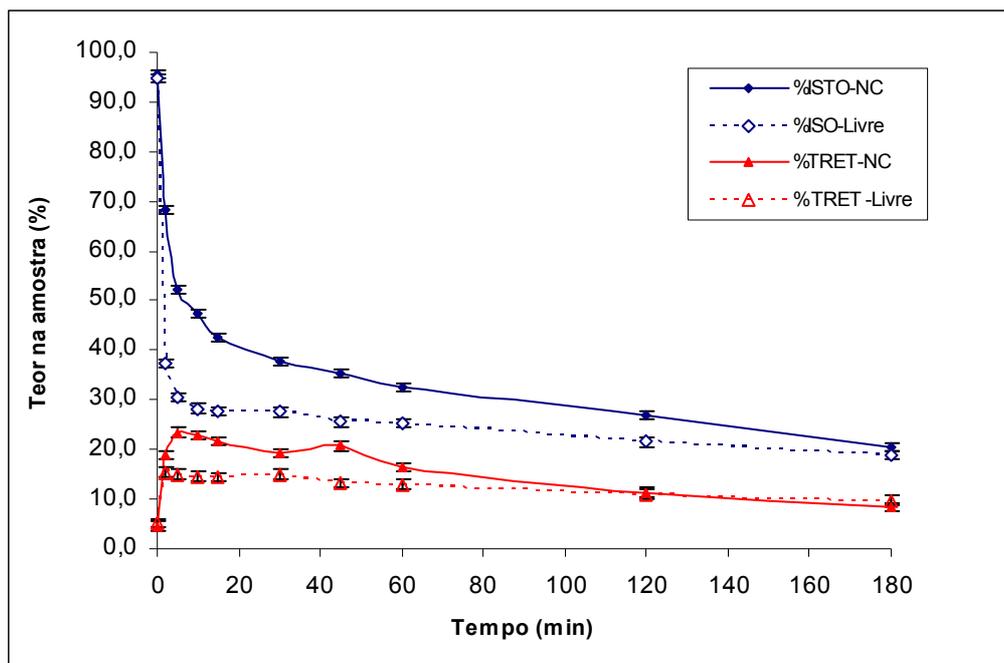


Figura 37: Porcentagem de isotretinoína degradada e tretinoína formada durante ensaio de fotodegradação da isotretinoína livre e nanoencapsulada.

O estudo do comportamento da isotretinoína livre em solução etanólica seguida da exposição à luz UVA, nas mesmas condições que a dispersão de nanocápsulas, demonstrou a conversão de 70% da isotretinoína original em tretinoína nos minutos iniciais de exposição (Figura 35), assim como demonstrado por Tashtoush e colaboradores em 2008. Este decaimento pode ser observado nas figuras 36 e 37. Desta forma, fica claro que a inclusão deste fármaco em nanocápsulas poliméricas possibilita resolver um dos importantes problemas de formulação e produção que é a fotoestabilidade dessa classe de compostos.

4.2.6. Perfil de liberação da isotretinoína a partir de nanocápsulas de PLGA.

De forma gradativa e lenta, ocorreu liberação de pouco mais de 1% de isotretinoína nas primeiras 10 horas, e pouco mais de 2% do conteúdo de fármaco encapsulado foi liberado em 24 horas de ensaio a 37°C (Figura 38). Após 24 horas de ensaio foi observada concentração crescente de tretinoína no meio receptor. Com 72 horas cerca de 60% da

isotretinoína liberada no meio receptor já havia sido isomerizada a tretinoína, demonstrando que o tempo e temperatura do experimento influenciaram na isomerização do fármaco, justificando a interrupção do experimento. Jeong e colaboradores (2003) utilizaram PLGA 50/50 para obter microesferes de tretinoína e observaram efeito burst inicial, durante os primeiros 10 dias, liberando cerca de 20% do conteúdo de tretinoína encapsulado. Entretanto, estes autores, não relataram a ocorrência de isomerização provavelmente por terem utilizado apenas a técnica de espectrofotometria para avaliação do fármaco liberado.

Santos e colaboradores (2005), demonstraram que a liberação do ácido úsnico a partir de nanocápsulas de PLGA (50/50) chegou a 78% da concentração inicial de fármaco dentro de 48 horas. Govender e colaboradores (1999) obtiveram 80% de liberação da procaína, fármaco hidrofílico, a partir de nanocápsulas de PLGA em 2 horas. Derakhshandeh e colaboradores (2007) obtiveram a liberação de 20% de um potente antitumoral, o 9-nitrocanfotecin, com características lipofílicas, a partir de nanocápsulas de PLGA em 20 horas. Lao e Venkatramam em 2008 demonstraram a liberação de 80% do Paclitaxel a partir de nanocápsulas de PLGA 53/47 em cerca de 20 dias, demonstrando assim como Santos (2005) que a solubilidade e a afinidade do fármaco pela fase oleosa, bem como a proporção de ácidos láctico / glicólico está diretamente relacionada à taxa de liberação. Estes diferentes perfis de liberação podem ser atribuídos a vários fatores que têm efeito sobre a liberação de fármacos encapsulados em sistemas nanocarreadores como tamanho da partícula, solubilidade, afinidade do fármaco pela fase oleosa e pelo polímero e sua incorporação. Estes são parâmetros comuns que governam o perfil de cinética de liberação dos fármacos, o que pode explicar porque as nanocápsulas de PLGA contendo isotretinoína, propostas neste trabalho, liberaram em 24 horas apenas 3% do fármaco, pois com menor tamanho médio da partícula (<200 nm), maior a uniformidade entre as populações formadas (PDI 0,1) e a característica lipofílica do fármaco, foi possível proporcionar liberação lenta e gradativa.

Fica claro então, que as propriedades de degradação do PLGA, extensivamente estudadas por outros autores como Dong *et al* (2006), Cruz *et al* (2006), Zolnik e Burgess (2007), dependem das propriedades intrínsecas do polímero como, peso molecular, estrutura química, hidrofobicidade e cristalinidade; das propriedades do meio receptor como, pH, temperatura, da presença de biocatalizadores ou enzimas além das propriedades da formulação, como tamanho da partícula, presença de plastificantes, entre outros.

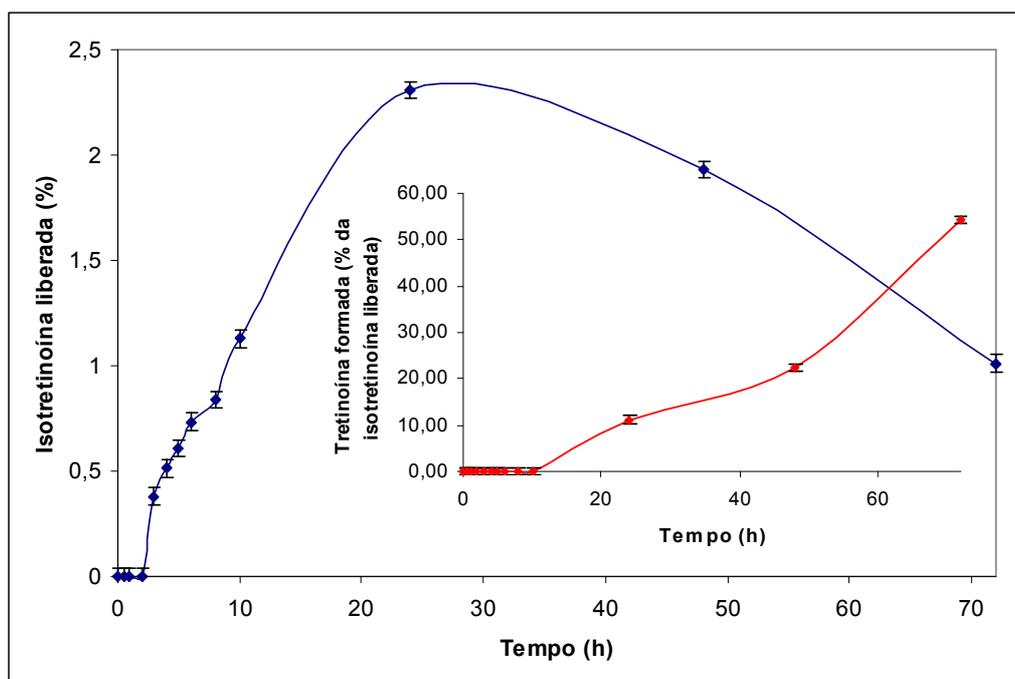


Figura 38: Cinética de liberação (%) *in vitro* da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA, ao longo do tempo (0 – 24 horas).

4.2.7. Nanocápsulas de D,L-PLA com incorporação da isotretinoína.

As nanocápsulas obtidas com D,L-PLA contendo isotretinoína foram caracterizadas e avaliadas quanto a estabilidade físico-química, fotoestabilidade e cinética de liberação por Ribas (2007). A eficiência de encapsulação calculada para a isotretinoína foi de 99% quando foram utilizados 5 mg de isotretinoína na obtenção das nanocápsulas. Nas experiências com quantidades maiores de fármaco também foi verificada saturação da fase oleosa, resultando em perda de fármaco por precipitação na fase aquosa, diminuindo a eficiência de encapsulação assim como demonstrado para as nanocápsulas obtidas a partir do PLGA.

Utilizando-se 3,3 mM de PLA na preparação de nanocápsulas, foi possível encapsular a quantidade de 4,9 mg de isotretinoína. Admitindo-se 4,9 mg como sendo a máxima quantidade de ISO_E obtida, a razão molar entre isotretinoína (1,4 mM) e PLA (3,3 mM) foi de aproximadamente 1:3.

4.3. PREPARO DOS LIPOSSOMAS

4.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas.

4.3.1.1. Separação do fármaco livre

Para determinar o perfil de eluição dos lipossomas através da coluna de separação, foram aplicados 1 ml da amostra contendo lipossomas vazios e promovida sua eluição com o auxílio de tampão IPB. Foram coletadas frações de 2,5 ml, as quais foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. O perfil de eluição dos lipossomas está representado na figura 39.

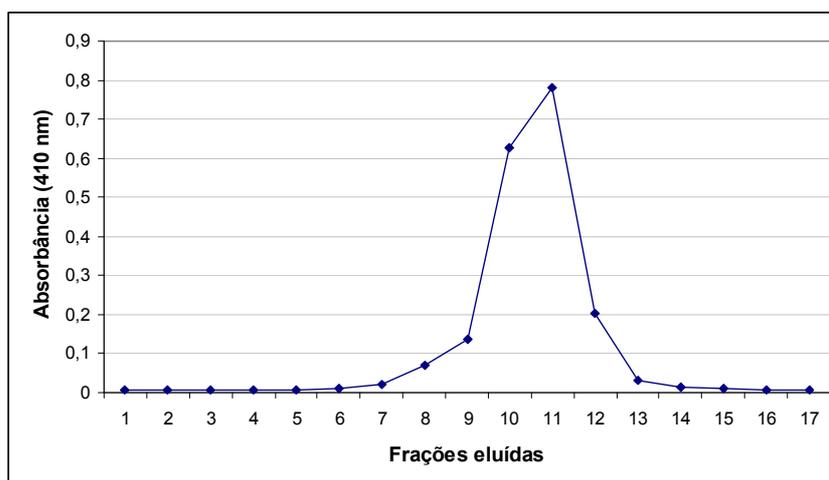


Figura 39: Perfil de eluição dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50 determinado por espectrofotometria em 410 nm.

A presença de lipossomas na amostra promove a elevação da absorbância da luz visível (410 nm) medida em espectrofotômetro. Desta forma, a leitura de cada fração eluída permitiu observar que os lipossomas deixam a coluna de separação nas frações de 8 a 13.

A separação das frações contendo isotretinoína encapsulada em lipossomas pode ser observada pela figura 40.

A leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 410 nm permite observar as frações nas quais eluíram os lipossomas já a leitura realizada em $\lambda=360$ nm, que corresponde ao comprimento de onda de maior absorção para a isotretinoína, permite

observar a eluição tanto dos lipossomas quanto do fármaco livre. A eluição dos lipossomas com fármaco encapsulado ocorreu nas frações de 8 a 13 e do fármaco livre, nas frações de 17 a 25. Esta separação ocorre em virtude do tamanho dos componentes da amostra, uma vez que os lipossomas contendo fármaco encapsulado apresentam diâmetro (e peso molecular) muitas vezes superior ao do fármaco em sua forma livre, o que resulta em uma eluição mais rápida pela coluna enquanto que o fármaco livre sofre retardo na sua eluição, ficando temporariamente retido nos poros da coluna.

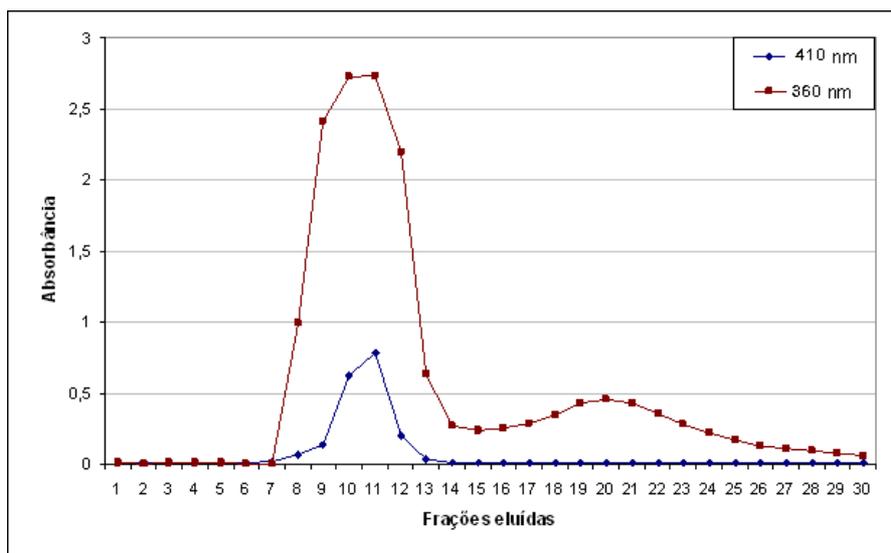


Figura 40: Perfil de eluição das frações de lipossomas vazios em azul e lipossomas contendo a isotretinoína encapsulada (8 a 13) e livre (17 a 25) em vermelho.

Além de possibilitar a separação do fármaco encapsulado em lipossomas, a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho permite comprovar a homogeneidade da preparação lipossomal, uma vez que promove a separação por grupos de estruturas de tamanho semelhante. Após a eluição pela coluna cromatográfica, as frações contendo lipossomas foram reanalisadas por espalhamento de luz (Figura 41) demonstrando a existência de uma única população de vesículas assim como demonstrado por Alves em 2005.

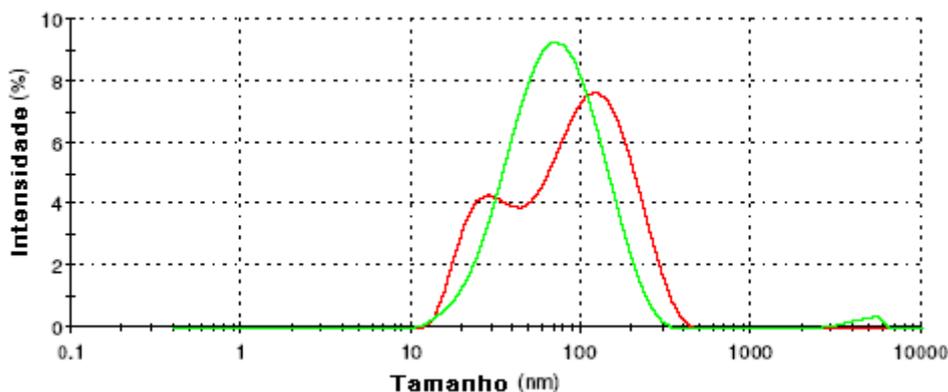


Figura 41: Distribuição de tamanho de lipossomas por espalhamento de luz antes (—) e após (—) a cromatografia de exclusão.

4.3.1.2. Cálculo da eficiência de encapsulação.

A eficiência de encapsulação foi calculada para as amostras de lipossomas preparadas com isotretinoína, segundo o método cromatográfico descrito no item 4.1.2. Os resultados estão apresentados na tabela 28.

Para proceder ao doseamento do fármaco encapsulado, as vesículas foram rompidas empregando-se etanol na proporção de 1:2, conforme previamente descrito. Portanto, a 1 mL das frações de SUV reunidas foram adicionados 2 mL de etanol, sendo realizada em seguida análise por HPLC-UV segundo o método descrito no item 4.1.2. Para exemplificar esta análise, os dados apresentados a seguir referem-se à preparação utilizando 10 mg de isotretinoína.

Pela equação da curva padrão de isotretinoína determinada por HPLC (Figura 18), calculou-se a concentração de isotretinoína de 0,0175 mg/mL encontrada no volume de 3 mL, formados por 1mL das frações de lipossomas coletadas da coluna, mais 2 mL de etanol. Logo, a concentração de isotretinoína nas frações de lipossomas foi calculada multiplicando-se este valor por 3: $0,0175 \times 3 = 0,0525$ mg, sendo esta a quantidade de isotretinoína encontrada em 1mL da fração de lipossomas contendo ISO_E.

A quantidade total de isotretinoína eluída da coluna foi $0,0525 \times 15$ mL = 0,787 mg de isotretinoína, que corresponde à quantidade de isotretinoína eluída da coluna após a aplicação de 1 mL da amostra. Multiplicando-se este valor por 8, foi encontrada a quantidade de isotretinoína encapsulada nos 8 mL de lipossomas preparados inicialmente: $0,787 \times 8 = 6,3$ mg de ISO_E. A eficiência de encapsulação foi calculada pelas seguintes fórmulas:

$$EC_1 = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ISO}_E) \times 100}{\text{Total de fármaco adicionado (ISO}_A)}$$

$$ISO_E = 6,3 \text{ mg}$$

$$ISO_A = 10 \text{ mg}$$

$$EC_1 = 63 \%$$

$$EC_2 = \frac{\text{Total de fármaco encapsulado (ISO}_E)}{\text{Total de fosfatidilcolina nos lipossomas}}$$

$$ISO_E = 6,3 \text{ mg}$$

$$PC_{\text{total}} = 240 \text{ mg}$$

$$EC_2 = 0,026$$

Tabela 28. Eficiência de encapsulação da isotretinoína em Lipossomas.

Nanosistema carreados	Eficiência de Encapsulação Absoluta (EC)	Mg isotretinoína / mL de preparação	
		Teórica	Calculada
Lipossoma	63%	1,25	0,78

Utilizando-se 40 mM de fosfatidilcolina na preparação de lipossomas, foi possível encapsular a quantidade 6,3 mg de isotretinoína. Admitindo-se 6,3 mg como sendo a quantidade máxima de ISO_E obtida, a razão molar entre isotretinoína (2,3 mM) e fosfatidilcolina (40 mM) foi de 1:17.

4.3.2. Perfil de liberação da isotretinoína dos lipossomas.

Após quatro horas de ensaio, foram liberados pouco mais de 6% da concentração de isotretinoína encapsulada nos lipossomas. Com 24 horas, apenas 8% da concentração de isotretinoína encapsulada, havia sido liberada (Figura 42). Estes resultados reafirmam o alto grau de interação da isotretinoína com os fosfolípídeos da bicamada lipídica, dificultando assim sua liberação, conforme demonstrado por Alves em 2005.

A solubilidade da isotretinoína é outro fator que deve ser ressaltado, uma vez que por ser insolúvel em água e apresentar solubilidade mínima em tampão fosfato pH 7,4, o meio de dissolução não contribui para que o fármaco deixe o ambiente lipídico. O emprego de solventes orgânicos como meio de dissolução poderia ser uma alternativa. Entretanto, além de não apresentarem qualquer correlação com os fluidos biológicos, provocariam o rápido rompimento dos lipossomas, gerando resultados falsos. O uso de tensoativos como agentes solubilizantes também seria alternativa. Contudo, a interação das moléculas anfifílicas do tensoativo com a bicamada dos lipossomas teria efeito superior ao seu papel solubilizante para o fármaco, levando também a resultados falsos (Alves, 2005).

Os resultados encontrados estão de acordo com Cortesi *et al* (1994) e Brisaert *et al* (2001), que também demonstraram reduzida liberação do fármaco, sugerindo uma associação extremamente estável dos retinóides com os lipossomas. Entretanto estes autores não relataram nenhuma isomerização do fármaco. No presente trabalho foi possível observar que após 24 horas de experimento cerca de 40% da isotretinoína liberada sofreu isomerização em tretinoína, conforme demonstrado na figura 42. Este resultado justifica a interrupção do experimento com apenas 24 horas.

Apesar dos percentuais de liberação encontrados neste estudo terem sido baixos, os lipossomas desenvolvidos destinam-se à administração intravenosa ao organismo. No ambiente *in vivo*, a presença de proteínas, a interação com o sistema imune, a diluição nos fluidos biológicos e a própria interação com as membranas celulares serão fatores que contribuirão para a liberação do material encapsulado nos lipossomas com eficiência muito superior ao que pode ser determinado pelo experimento *in vitro*.

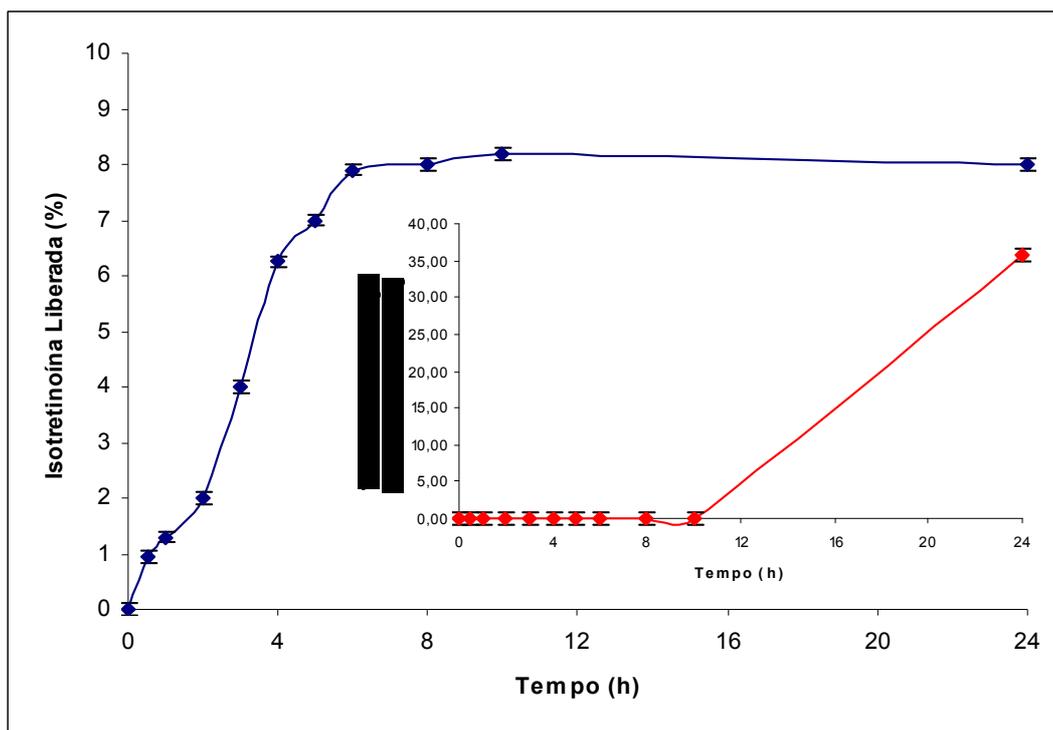


Figura 42: Cinética de liberação (%) *in vitro* da isotretinoína encapsulada em Lipossoma, ao longo do tempo (0 – 24 horas).

4.4. POTENCIAL ANTITUMORAL

4.4.1. ENSAIOS *IN VITRO*

4.4.1.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão por Azul de Trypan em células K562.

O crescimento e a viabilidade de células leucêmicas da linhagem K562, avaliadas após 24, 48 e 72 horas de exposição em culturas tratadas com concentrações equimolares (0,16 a 21,3 μM) de isotretinoína nas formas livre, encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e de PLGA estão apresentados nas figuras 43 a 45.

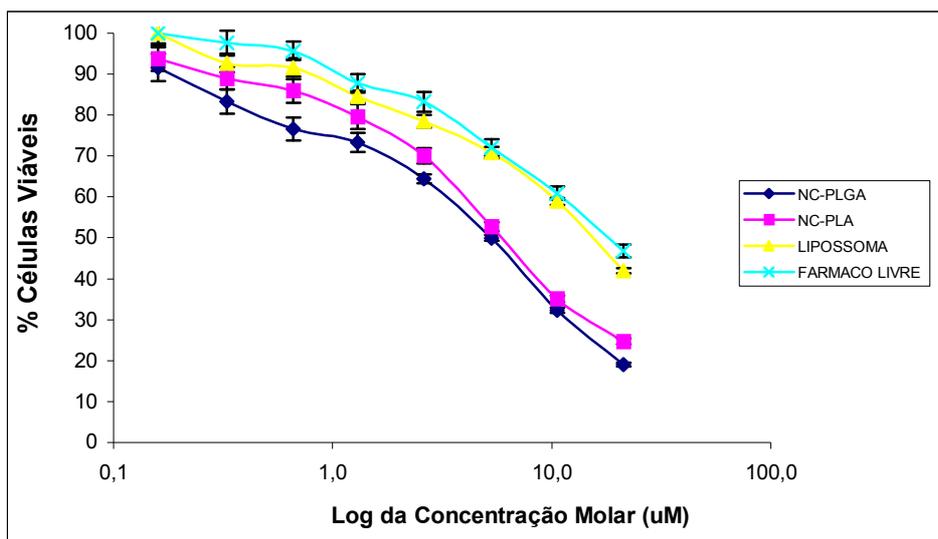


Figura 43: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 24 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

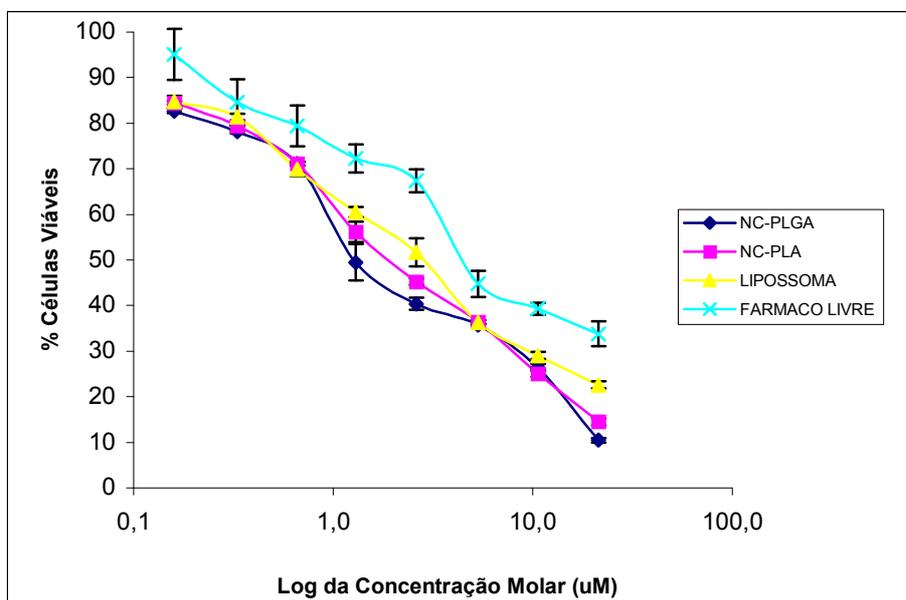


Figura 44: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 48 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

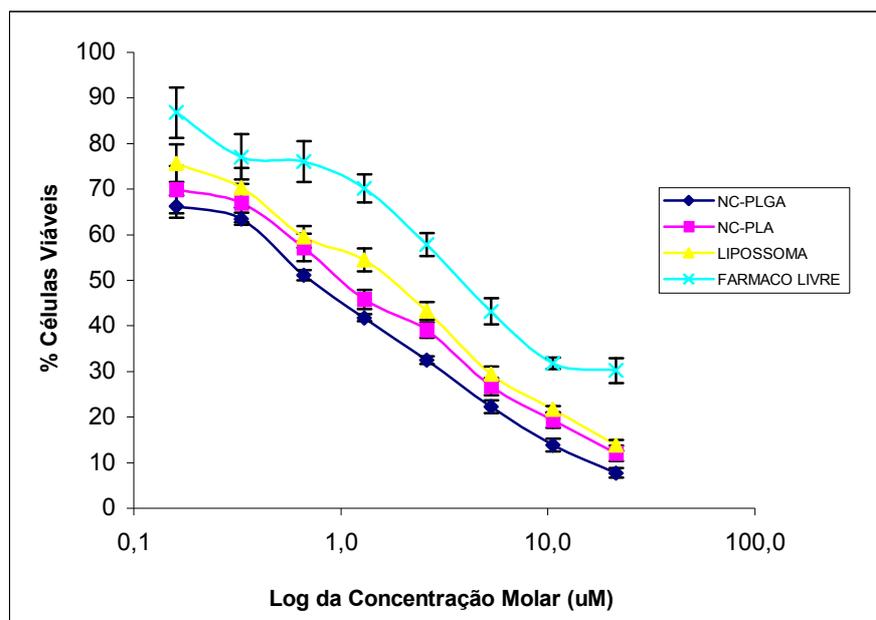


Figura 45: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células K562 após 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

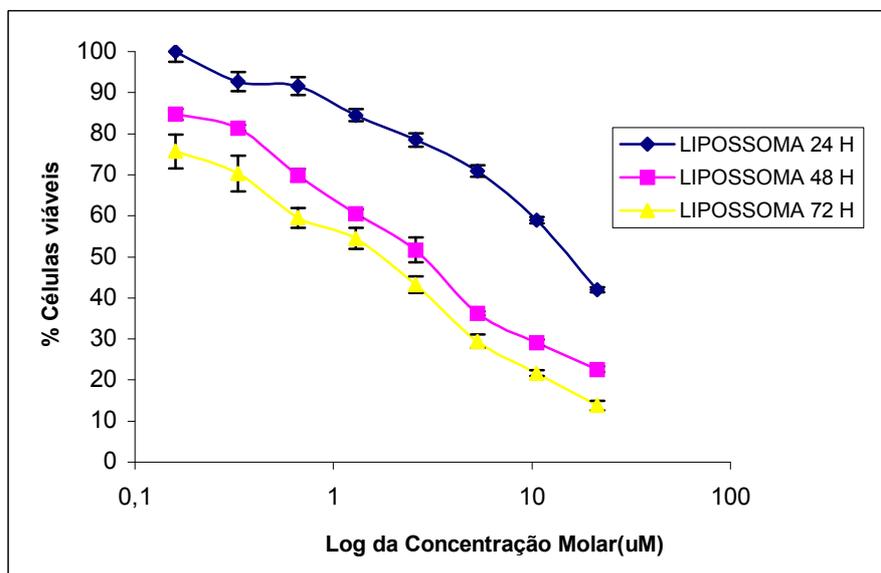


Figura 46: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

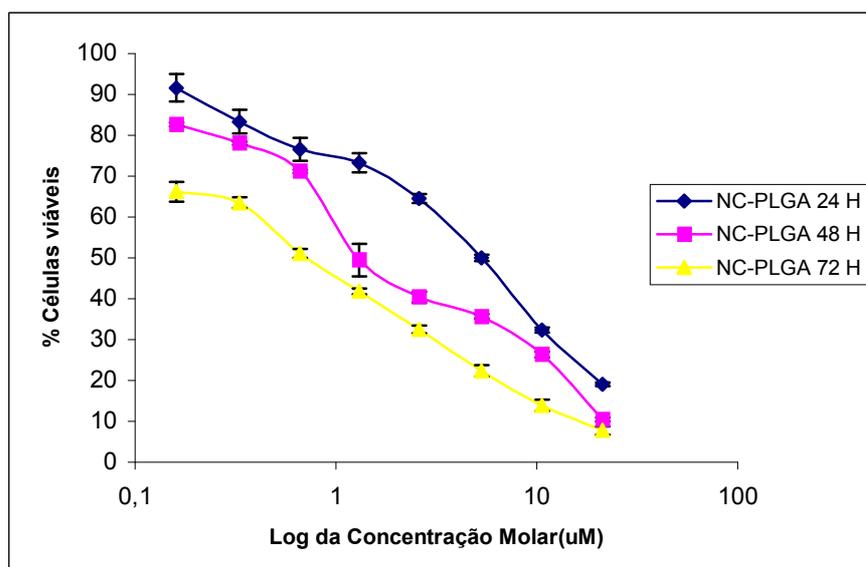


Figura 47: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em células k 562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

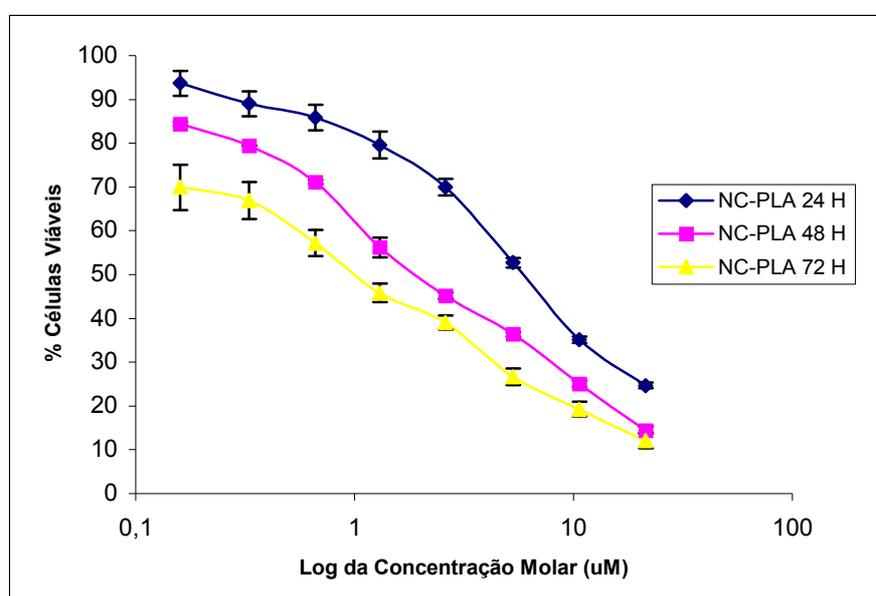


Figura 48: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

Tabela 29. Atividade da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células leucêmicas eritromielocíticas K562.

TEMPO (Horas)	IC ₅₀ (μM) LIVRE	IC* ₅₀ (μM) ENCAPSULADA			GI**		
		LIPOSSOMA	PLA	PLGA	LIPOSSOMA	PLA	PLGA
24	31,39	22,4	5,63	4,04	1.4	5.57	7.77
48	5.66	2,5	2.057	1,77	2.26	2.75	3.2
72	3,85	1,375	0,995	0,69	2.8	3.87	5.58

* Concentração (μM) que causa 50% de inibição do crescimento celular das células k 562.

** Índice de ganho= razão entre IC₅₀ do fármaco não encapsulado e o IC₅₀ do fármaco encapsulado

Os resultados demonstraram que a encapsulação da isotretinoína em nanocápsulas e lipossomas promove aumento da atividade citotóxica do fármaco. Também foi observado que a atividade citotóxica da isotretinoína encapsulada é dose e tempo dependente (figuras 46 a 48).

Os valores do IC₅₀ (concentração inibitória 50%) para a isotretinoína não encapsulada, obtidos matematicamente a partir da curva de concentração versus resposta para 24, 48 e 72 horas de incubação foram de 31,39; 5,66; 3,85 μM respectivamente. Em contraste, foi observada significativa redução nos valores do IC₅₀ para a isotretinoína encapsulada tanto em lipossomas como em nanocápsulas incubadas por 24, 48 e 72 horas conforme demonstrado na tabela 29. A redução dos valores do IC₅₀ demonstraram um importante ganho no índice terapêutico (Tabela 29).

O aumento da atividade antiproliferativa do fármaco não foi devido à presença de fosfolipídios (CORTESI *et al*, 1994) ou polímeros presentes nas formulações já que lipossomas vazios e nanocápsulas vazias, tanto de PLA quanto de PLGA, foram incubados com células K562 e não demonstraram nenhuma atividade. Isto permite sugerir que o aumento da atividade antiproliferativa da isotretinoína quando encapsulada em lipossomas ou nanocápsulas de PLA e PLGA seja devido ao aumento da solubilidade e/ou biodisponibilidade da isotretinoína encapsulada, promovidos pelos nanocarreadores.

As interações entre lipossomas e células têm sido extensivamente estudadas. Foram propostos mecanismos fisiológicos de internalização dos fármacos como fusão, endocitose, adsorção e transferência lipídica (TORCHILIN, 2005). Entretanto, o

mecanismo exato de interação dos lipossomas contendo isotretinoína com células K562 não está claro.

O estudo das interações entre nanocápsulas de PLA e PLGA e as células são menos extensivamente relatados na literatura que os estudos de interação entre os lipossomas e células. Alguns autores, como Cho e colaboradores (2001) e Kuykendall e Zimmerman (2007) sugerem que ocorra internalização das nanopartículas por endocitose via receptor.

O presente trabalho, além de demonstrar o aumento da atividade citotóxica do fármaco quando encapsulado em nanocarreadores demonstra diferenças na atividade citotóxica entre os próprios sistemas. Quando encapsulado em lipossomas, a isotretinoína teve sua atividade citotóxica aumentada comparada ao fármaco não encapsulado. Alguns autores também observaram aumento na atividade citotóxica de outros retinóides quando encapsulados em lipossomas, tanto para células leucêmicas quanto para outros tipos celulares (CORTESI et al, 1994; CORTESI et al, 1999; NASTRUZZI et al, 1990; RAFFAGHELLO et al, 2003; ARCE et al, 2005; CHANSRI et al, 2006; KAWAKAMI et al, 2006; SUZUKI et al, 2006).

Cortesi e colaboradores, em 1994, demonstraram que a tretinoína quando encapsulada em lipossomas possui IC_{50} de $0,9 \mu\text{M}$ e um ganho de 33,3 vezes na sua atividade citotóxica sobre células da linhagem K562. Já Nastruzzi e colaboradores em 1990 demonstraram que a tretinoína encapsulada exibiu um ganho de 350 vezes na atividade citotóxica quando comparada à tretinoína não encapsulada após 5 dias de incubação com células da linhagem K562.

A isotretinoína encapsulada tanto em nanocápsulas de PLGA quanto em nanocápsulas de PLA demonstrou maior atividade citotóxica que a isotretinoína encapsulada em lipossomas. Para a isotretinoína encapsulada em lipossomas foram obtidos valores de 22,4; 2,5 e $1,375 \mu\text{M}$ para o IC_{50} com 24, 48 e 72 horas de incubação, respectivamente.

Quando encapsulada em nanocápsulas de PLGA a isotretinoína demonstrou IC_{50} de 4,04; 1,77 e $0,69 \mu\text{M}$ já, quando encapsulada em nanocápsulas de PLA, foram observados valores de 5,63; 2,057 e $0,995 \mu\text{M}$ para o IC_{50} com 24, 48 e 72 horas de incubação respectivamente. Apesar de todos os sistemas avaliados terem demonstrado alto índice de ganho terapêutico quando comparados ao fármaco não encapsulado, também foi possível observar, entre os sistemas, que o índice de ganho terapêutico foi maior quando o fármaco foi encapsulado em nanocápsulas de PLGA e PLA (Tabela 29).

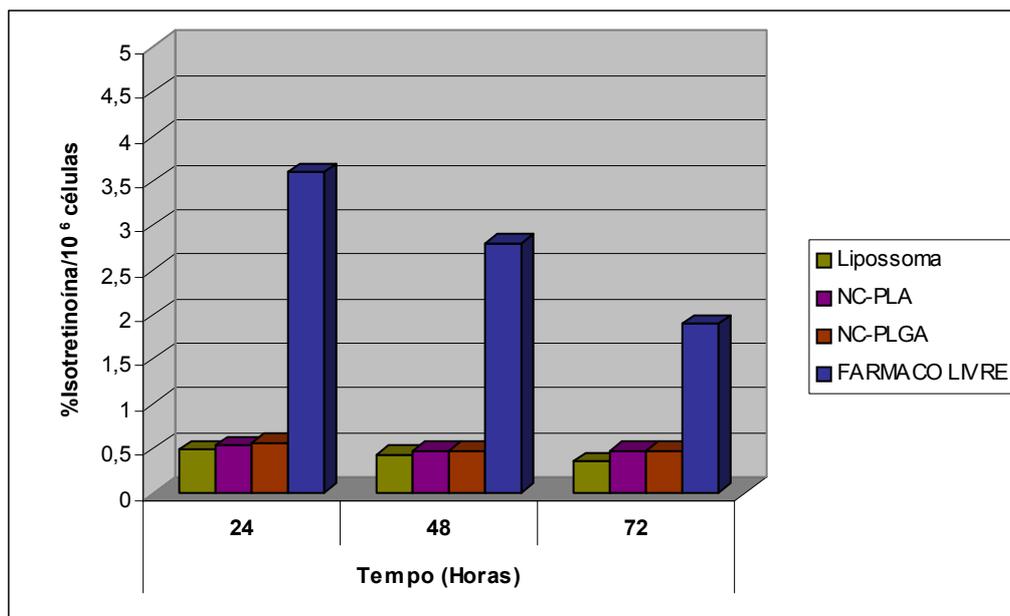


Figura 49: Porcentagem de Isotretinoína internalizada em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.

A isotretinoína não encapsulada demonstrou maior internalização celular, já que fármacos lipofílicos permeiam através da membrana plasmática muito rapidamente (Figura 49). A transferência entre os fosfolípidios da membrana ocorre em menos de 30 segundos (DIAZ *et al*, 2006; NASTRUZZI *et al*, 1990) e dificilmente um nanocarreador poderia ser internalizado nesta velocidade. A maior taxa de internalização não foi indicativo de maior atividade citotóxica, pois embora a isotretinoína não encapsulada tenha apresentado maior internalização, foi demonstrada maior atividade citotóxica na presença dos nanocarreadores.

Foi possível observar decréscimo na concentração de isotretinoína, na sua forma livre, internalizada com o tempo, sugerindo o aumento do efluxo celular e/ou isomerização intracelular em tretinoína e outros retinóides (WARREL, 1993; KIZAKI *et al*, 1996; TAKESHITA *et al*, 2000; GALLAGHER, 2002; STROMSKAYA *et al*, 2005).

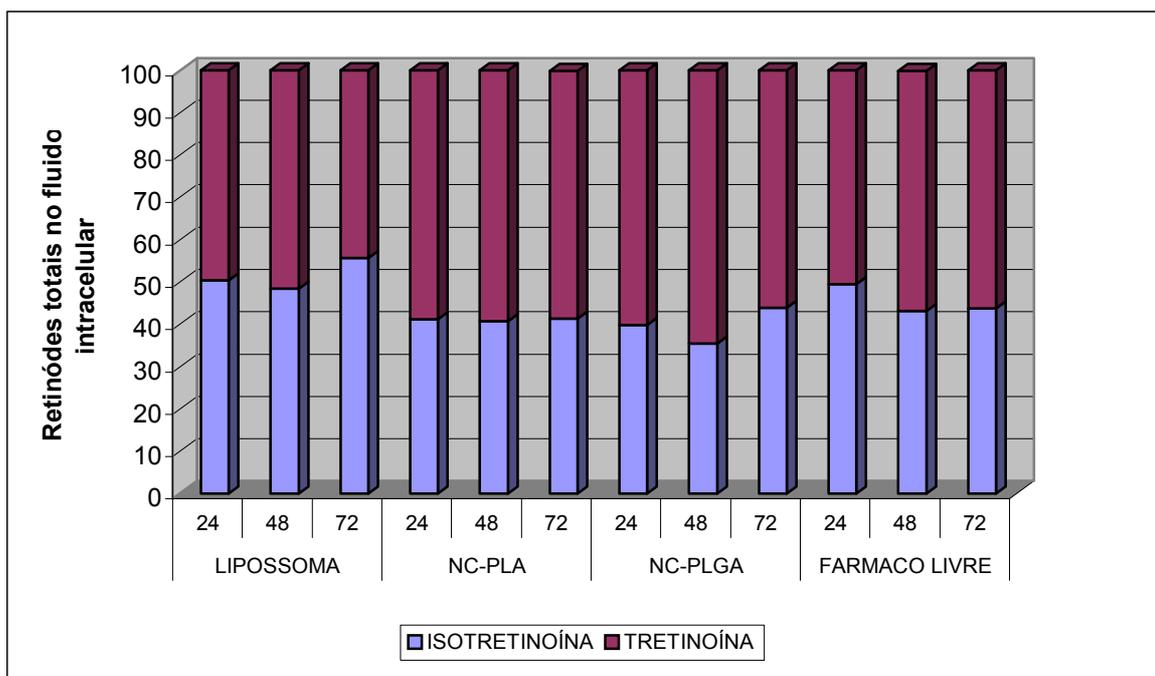


Figura 50: Porcentagem de isotretinoína e tretinoína presentes em células K562 após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.

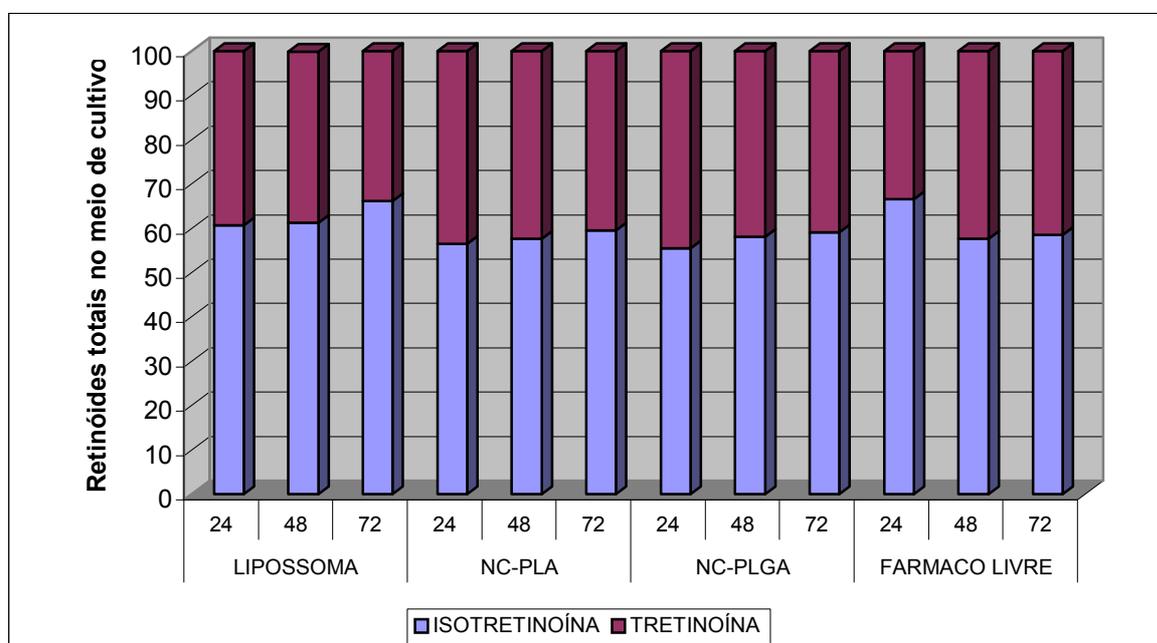


Figura 51: Porcentagem de isotretinoína e tretinoína presentes no meio de cultivo celular após 24, 48 e 72 horas de incubação com lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA contendo isotretinoína.

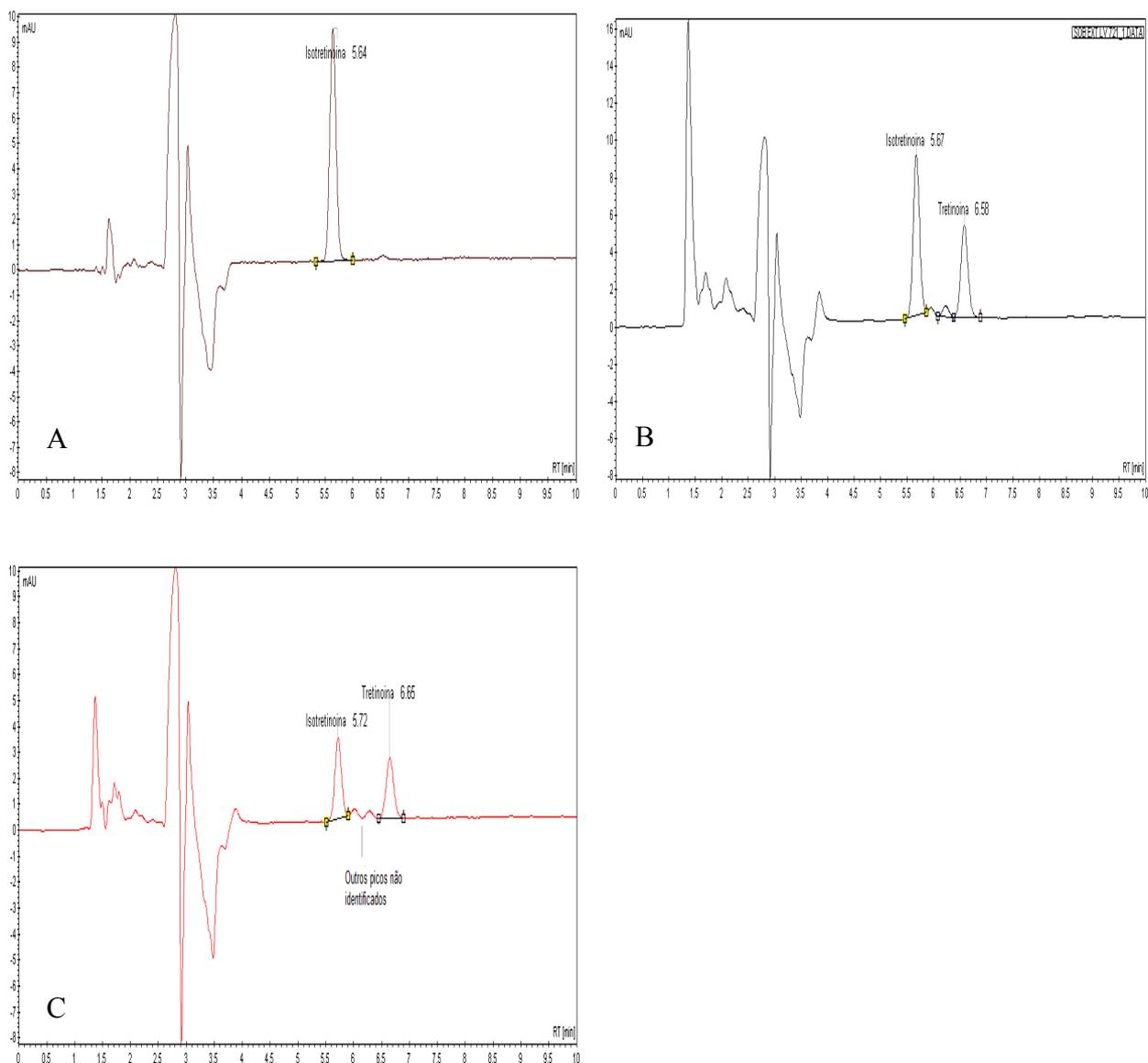


Figura 52: Cromatograma da isotretinoína tempo zero (A), após 24 horas (B) e 48 horas (C) de incubação com células K562 em meio RPMI com 10% SBF e células utilizando coluna C 18 (150 x 4,6 mm), fase móvel ACN: H₂O na razão de 85:15, com fluxo de 1 mL/min e forno a temperatura de 50°C.

Segundo Lanvers e colaboradores (1998), durante o período de incubação de células HL-60, separadamente, com isotretinoína, tretinoína e alitretinoína os retinoides sofrem isomerização mediados por radicais tiol presentes no meio de cultivo, resultando no surgimento de uma mistura de isômeros. De acordo com estes autores, todos os isômeros gerados no meio de cultivo foram detectados nas células HL-60. A isotretinoína e a alitretinoína demonstraram farmacocinética celular semelhante, ao passo que a tretinoína apresentou altas concentrações celulares quando comparadas às concentrações encontradas tanto para a isotretinoína quanto para a alitretinoína demonstrando assim maior aporte celular por este composto.

Klaassen e colaboradores (1999) também demonstraram a isomerização da tretinoína em isotretinoína e alitretinoína em diferentes meios de cultura e relacionaram o grau de isomerização ao tipo de meio e à presença e/ou ausência de alguns constituintes dos meios de cultura como proteínas e soro bovino fetal.

No presente trabalho também foi possível observar a presença de tretinoína e isotretinoína tanto dentro das células K562 quanto no meio de cultura, demonstrando a isomerização destes compostos durante a incubação (Figura 50 a 52). Neste caso, a encapsulação da isotretinoína em lipossomas e nanocápsulas não impediu sua isomerização em meio RPMI. Observa-se, entretanto, que a proporção de isotretinoína convertida em tretinoína é maior no interior das células que no meio de cultura.

Segundo Lanvers e colaboradores (1998), a tretinoína é a mais eficientemente internalizada pelas células e sua concentração intracelular aumenta também a medida que este isômero é formado no meio, de forma que torna-se o isômero predominante nas células mesmo que o fármaco originalmente incubado tenha sido a isotretinoína.

Entretanto, devido à isomerização e à influencia da concentração intracelular dos retinoides na citotoxicidade, os estudos de eficácia dos isômeros *in vitro* devem ser interpretados com cautela. Estudos comparativos entre a atividade da isotretinoína e da tretinoína em vários tipos de células demonstraram propriedades similares no que diz respeito à inibição da proliferação celular, esta observação, segundo Armstrong *et al* (2005) suporta a hipótese de que a isotretinoína funciona como pró-fármaco, gerando tretinoína via isomerização, embora não exclua outros mecanismos de ação para a isotretinoína. Assim, muitas das ações sugeridas por outros autores para a isotretinoína podem ser mediadas pela tretinoína após isomerização e/ou muitas das ações atribuídas a tretinoína podem ser mediadas pela isotretinoína (BLANDER, 2001). Os resultados de internalização celular obtidos neste trabalho vem corroborar a hipótese sugerida por Blander (2001) e Armstrong e colaboradores (2005) de isomerização intracelular dos retinóides na presença de meio de cultura RPMI suplementado com soro bovino fetal.

Segundo Ortiz e colaboradores (2002) e SATO e colaboradores (2004) a modulação da entrada do fármaco na célula promovida pelo nanocarreador permite controlar o aporte celular burlando alguns dos mecanismos de eliminação do fármaco como a bomba de efluxo via glicoproteína P, diminuindo assim a resistência aos retinoides. Isto explicaria, em parte, a diferença na atividade citotóxica da isotretinoína não encapsulada em relação a isotretinoína encapsulada tanto em lipossomas como em nanocápsulas (PLA e PLGA).

4.4.1.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão por azul de trypan em células de paciente obtidas em procedimento de leucoférese.

A viabilidade de células leucêmicas de paciente, avaliadas após 24, 48 e 72 horas de exposição em culturas tratadas com concentrações equimolares (0,16 a 21,3 μM) de isotretinoína livre e, encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA estão apresentados nas figuras 53 a 55.

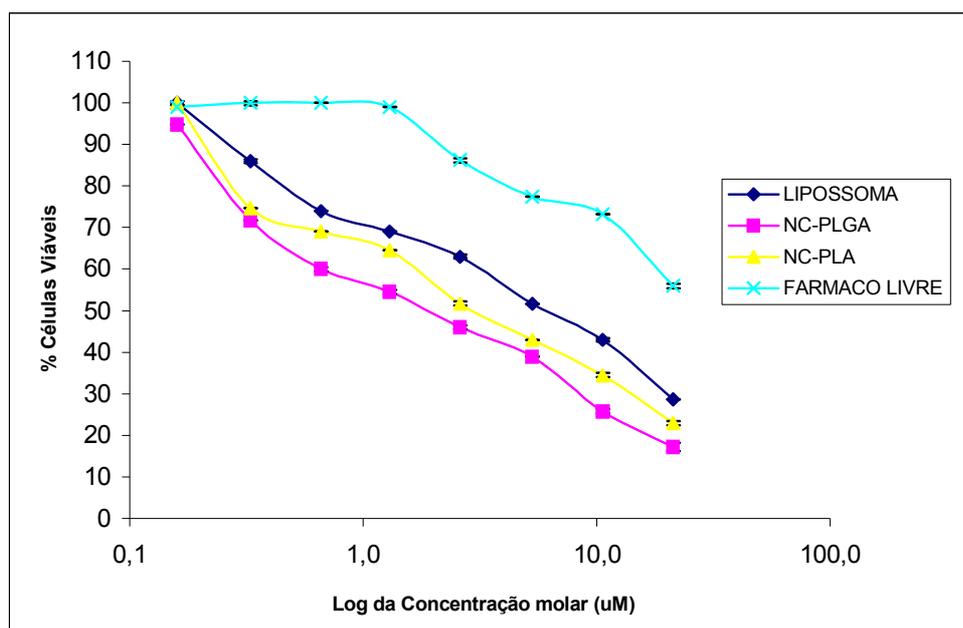


Figura 53: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de leucoférese após 24 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

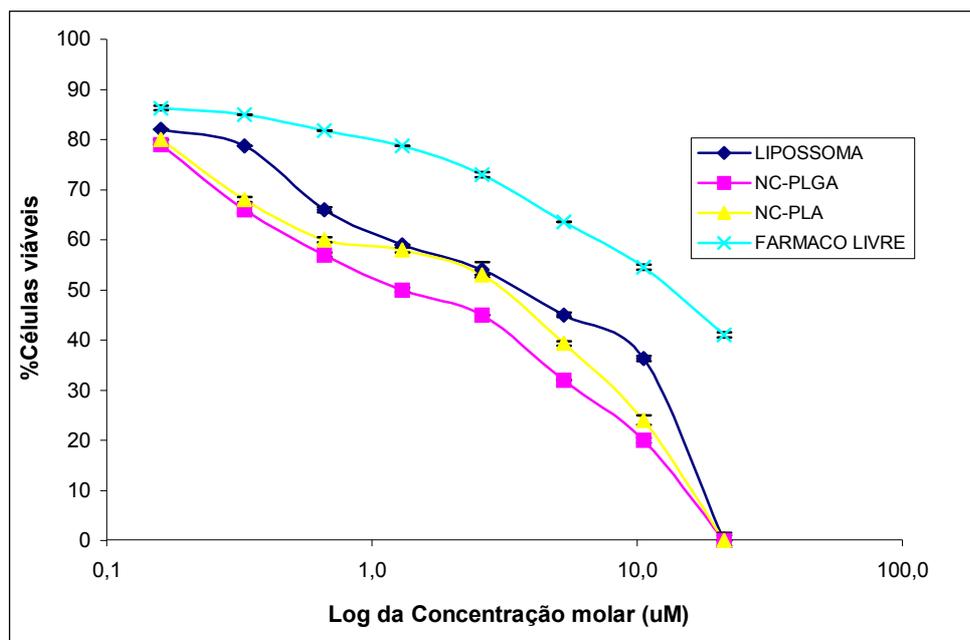


Figura 54: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de leucoférese após 48 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

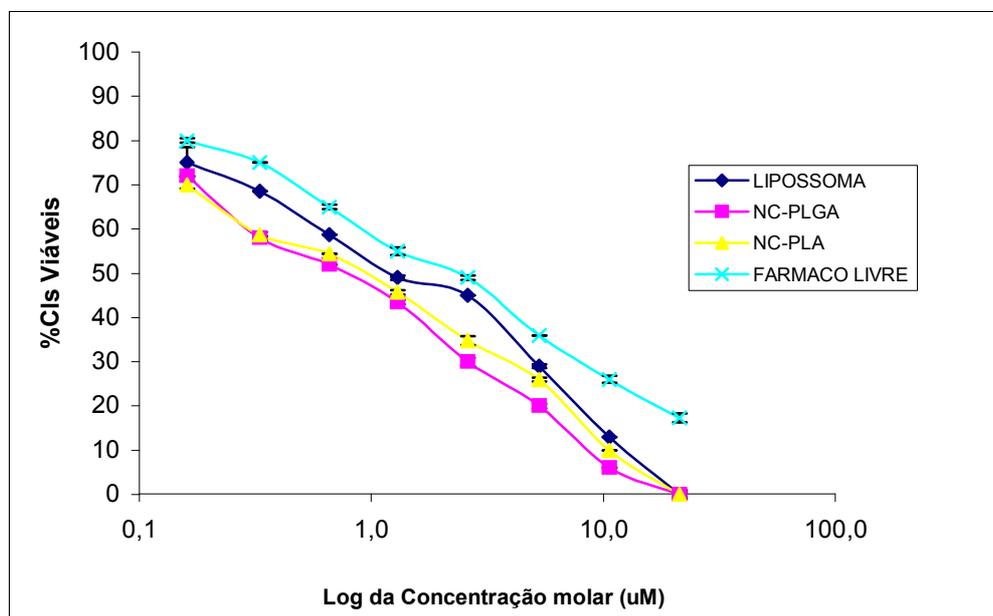


Figura 55: Citotoxicidade da isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas, nanocápsulas de PLA e PLGA em células de pacientes obtidas em processo de leucoférese após 72 horas de incubação segundo método de azul de trypan.

Os resultados demonstraram que a encapsulação da isotretinoína em nanocápsulas e lipossomas, assim como observado para as células da linhagem K562, promoveu um aumento na atividade citotóxica do fármaco. Também foi observado que a atividade citotóxica da isotretinoína encapsulada é dose e tempo dependente quando comparada à isotretinoína não encapsulada em todos os períodos de incubação investigados (Figuras 53 a 55).

Tabela 30. Efeito da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células leucêmicas de pacientes com leucemia mielóide crônica.

TEMPO (Horas)	IC ₅₀ (μM) LIVRE	IC* ₅₀ (μM) ENCAPSULADA			GI**		
		LIPOSSOMA	PLA	PLGA	LIPOSSOMA	PLA	PLGA
24	115,4	5,4	3,15	2,01	21,3	36,6	57,4
48	2,88	2,22	1,59	1,2	1,3	1,8	2,4
72	1,91	1,12	0,76	0,68	1,7	2,5	2,8

* Concentração (μM) que causa 50% de inibição do crescimento celular das células de pacientes.

** Índice de ganho= razão entre IC₅₀ do fármaco não encapsulado e o IC₅₀ do fármaco encapsulado

Os valores do IC₅₀ para a isotretinoína não encapsulada e encapsulada, após 24, 48 e 72 horas de incubação para células de pacientes foram demonstrados na tabela 30. Os resultados observados com as células de paciente foram expressivos no que diz respeito à redução dos valores do IC₅₀ e ao ganho terapêutico para a isotretinoína encapsulada tanto em lipossomas quanto em nanocápsulas incubadas por 24, 48 e 72 horas quando comparados aos resultados obtidos para as células de linhagem K562 conforme demonstrado pelas figuras 56 a 58 e pelos resultados do IC₅₀ e do índice de ganho para as células da linhagem K562 e células de paciente com LMC conforme demonstrado nas tabelas 30 e 31 respectivamente.

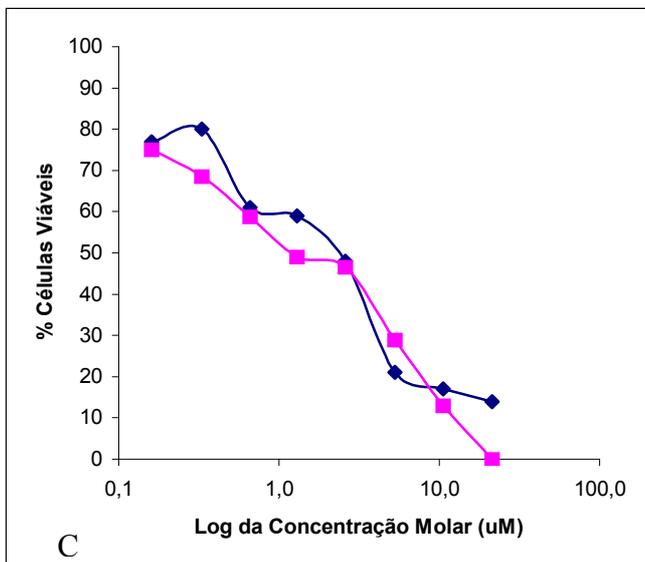
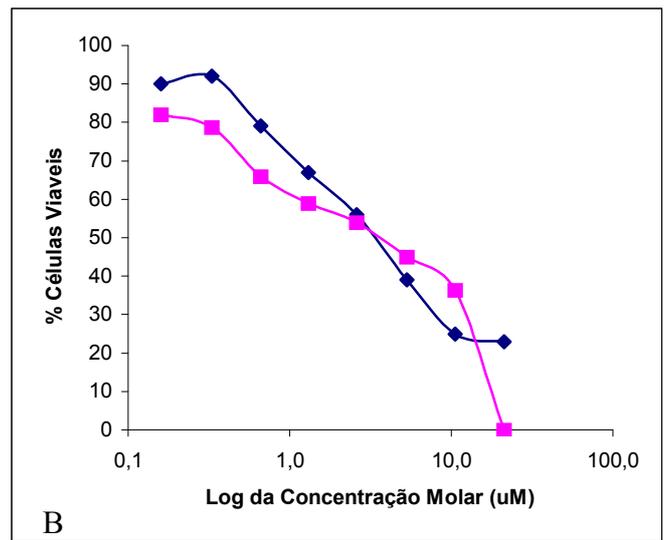
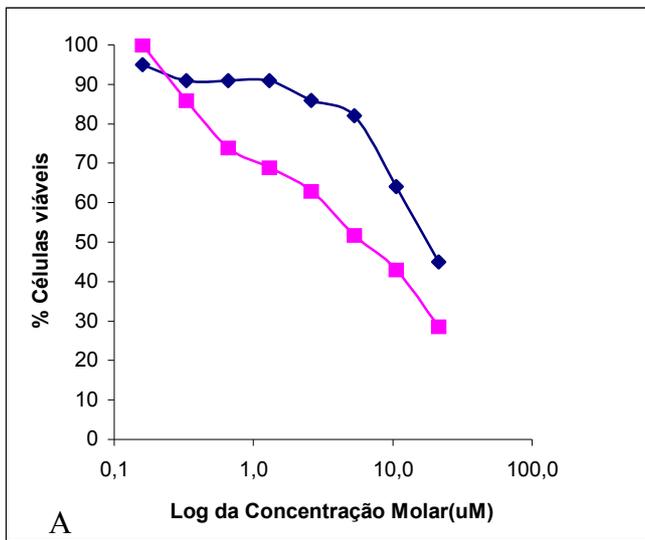


Figura 56: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas, sobre células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.

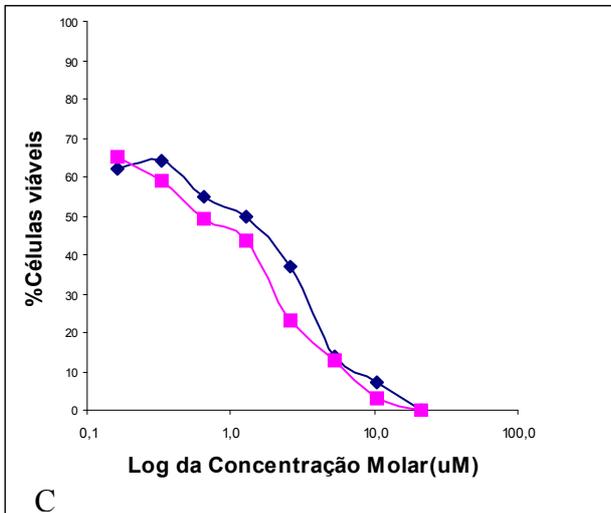
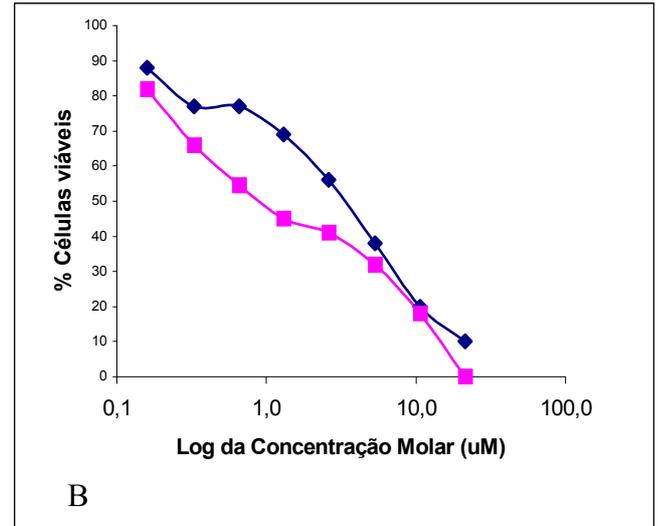
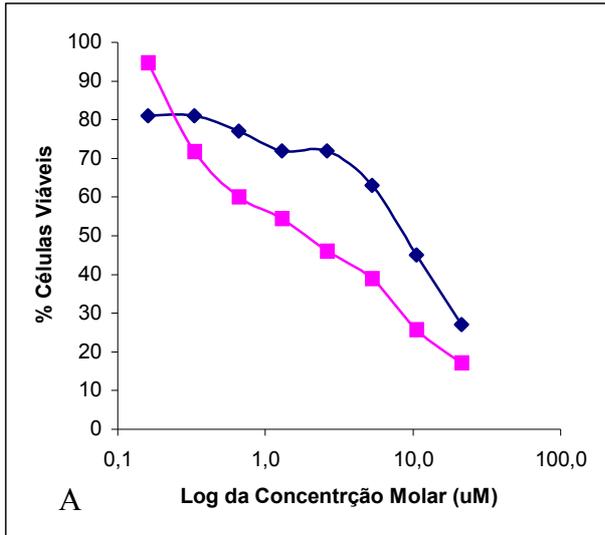


Figura 57: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA, sobre células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.

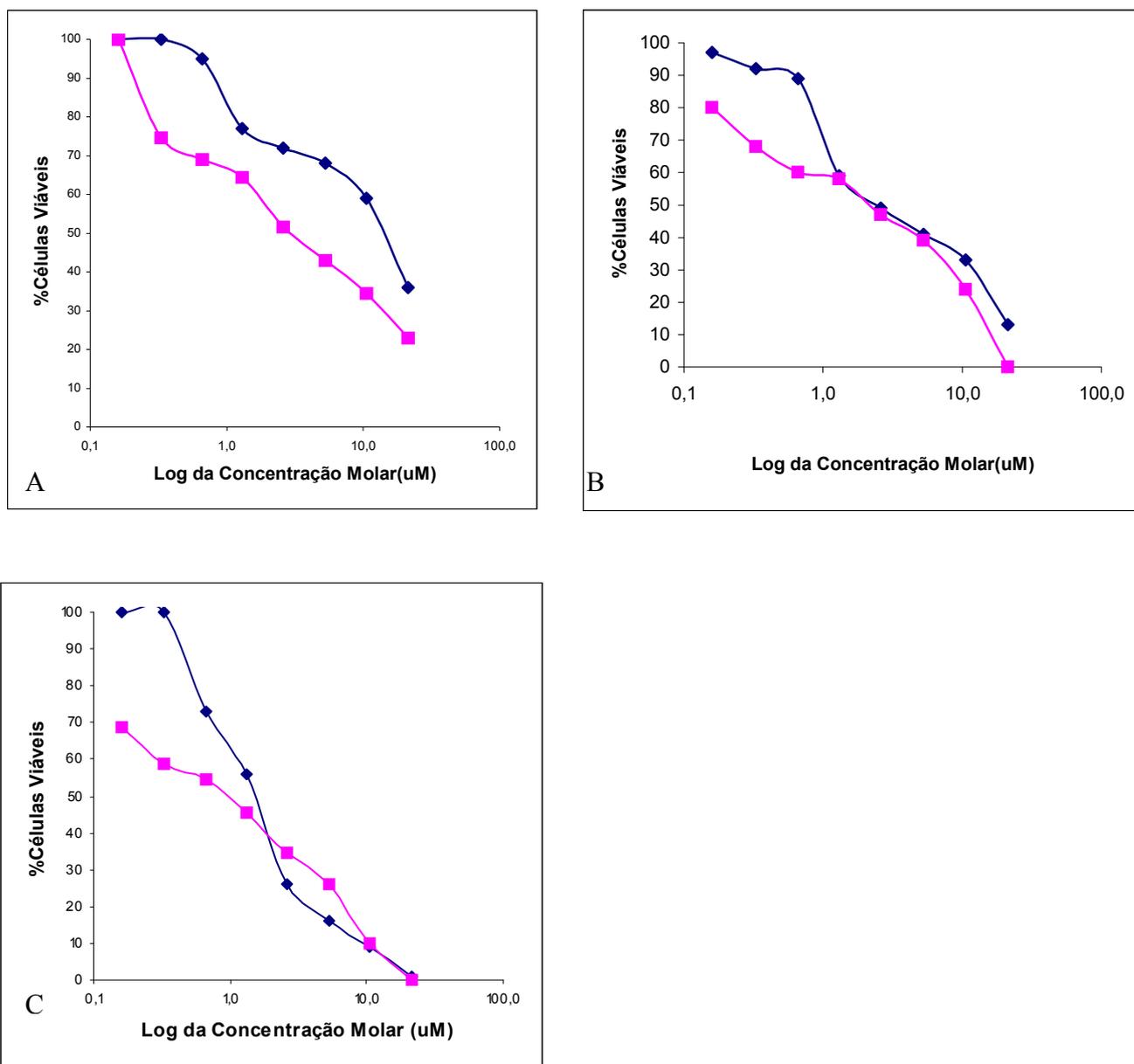


Figura 58: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLA, sobre células K562 (azul) e células de pacientes (rosa) após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de azul de trypan.

A maior susceptibilidade ao fármaco, a redução do IC_{50} e o aumento expressivo do índice terapêutico já com 24 horas de incubação com células de pacientes podem ser explicados pela maior atividade metabólica destas células em relação às células de linhagem e também ao fato de serem células de paciente que ainda não havia sido submetido a nenhum tratamento quimioterápico.

Diferentemente do observado nos experimentos de cultivo com células K562, no ensaio de citotoxicidade sobre células de paciente foi possível alcançar 100% de morte celular já com 48 horas de incubação, tanto para lipossomas quanto para nanocápsulas contendo isotretinoína, demonstrando assim o expressivo ganho terapêutico com o uso dos nanosistemas.

4.4.1.3. Avaliação da citotoxicidade em células K562 segundo método de redução do tetrazolium (MTT).

O crescimento e a viabilidade de células leucêmicas da linhagem K 562, também foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de exposição utilizando método colorimétrico de redução do tetrazolium. As culturas foram tratadas com concentrações equimolares (0,16 a 21,3 μM) de isotretinoína livre e encapsulada em lipossomas e nanocápsulas (PLA e PLGA).

Tabela 31. Atividade da isotretinoína encapsulada e não encapsulada no crescimento de células K562 segundo MTT.

TEMPO (Horas)	IC ₅₀ (μM) LIVRE	IC* ₅₀ (μM) ENCAPSULADA		
		LIPOSSOMA	PLA	PLGA
24	7.459	253,3	47,6	38,03
48	2.969,5	26,1	22,9	10,3
72	844,5	7,57	4,3	1,01

* Concentração (μM) que causa 50% de inibição do crescimento celular das células de pacientes.

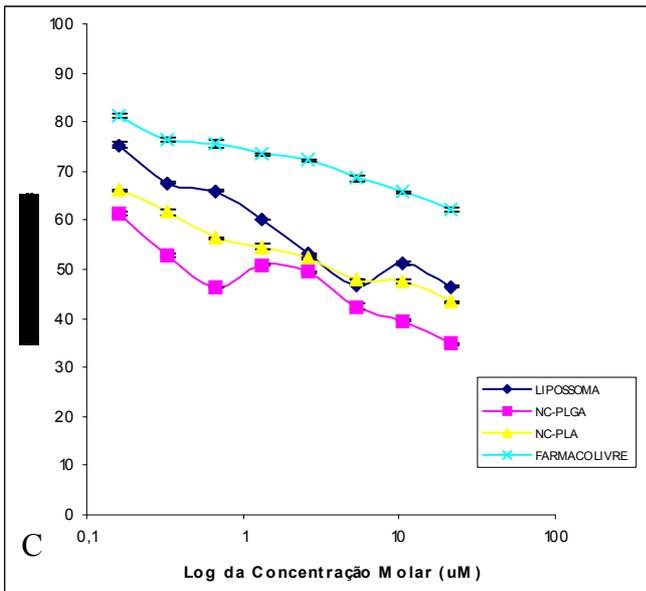
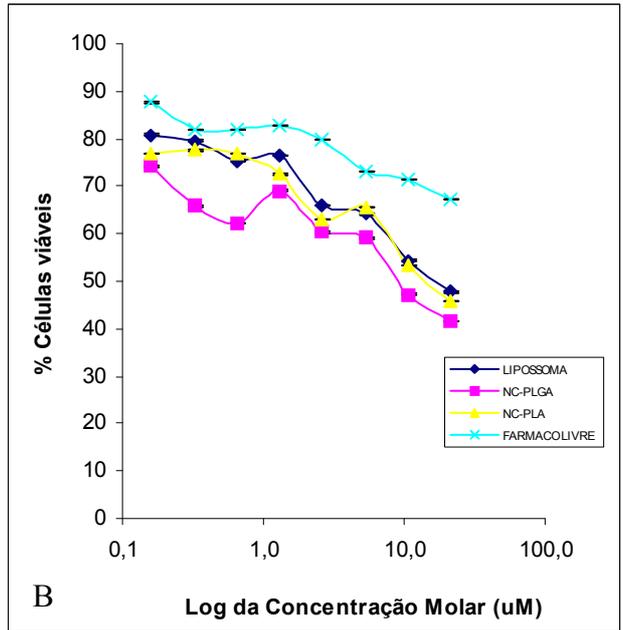
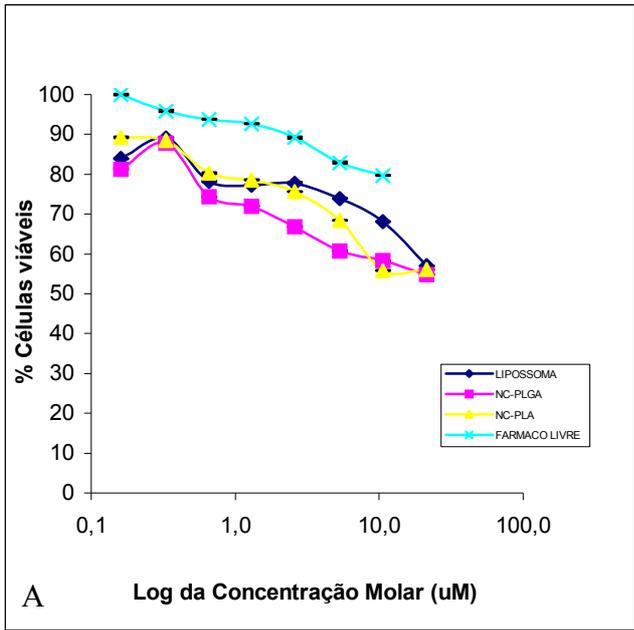


Figura 59: Citotoxicidade da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas em células K562 com 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de incubação segundo método de redução do tretazolium.

Os resultados apresentados na figura 59 demonstraram, assim como observado através do método de azul de trypan, que com a encapsulação da isotretinoína em lipossomas e nanocápsulas houve um aumento da atividade citotóxica do fármaco, estando esta diretamente relacionada à dose e ao tempo de incubação, quando comparada à isotretinoína não encapsulada em todos os períodos de incubação investigados.

Os resultados obtidos matematicamente a partir da curva de concentração versus resposta para os valores do IC_{50} da isotretinoína não encapsulada com 24, 48 e 72 horas de incubação estão demonstrados na tabela 31.

Os valores para o IC_{50} segundo método de azul de trypan foram menores devido à maior sensibilidade daquele método em relação ao MTT. O MTT é um método colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial das células através da mudança na intensidade de absorbância das amostras, assim muita célula pode ter a membrana danificada, um dos parâmetros de morte celular mais avaliados, mas ainda possuir atividade mitocondrial. Desta forma, este método foi utilizado para confirmar a atividade citotóxica da isotretinoína encapsulada em relação à não encapsulada de uma forma reprodutível já que a medida da absorbância foi realizada através de uma leitora de ELISA. Detectar diferentes estágios da morte celular como diminuição da atividade metabólica (MTT), aumento da permeabilidade da membrana celular (Azul de Trypan) permitiu inferir sobre os resultados de citotoxicidade obtidos neste trabalho com maior precisão e segurança.

4.5. BIODISTRIBUIÇÃO TISSULAR.

4.5.1. Avaliação da biodistribuição tissular, em camundongos, da isotretinoína encapsulada em Nanocápsulas de PLGA.

Os resultados obtidos do ensaio de biodistribuição tissular da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA estão apresentados nas figuras 60 e 61.

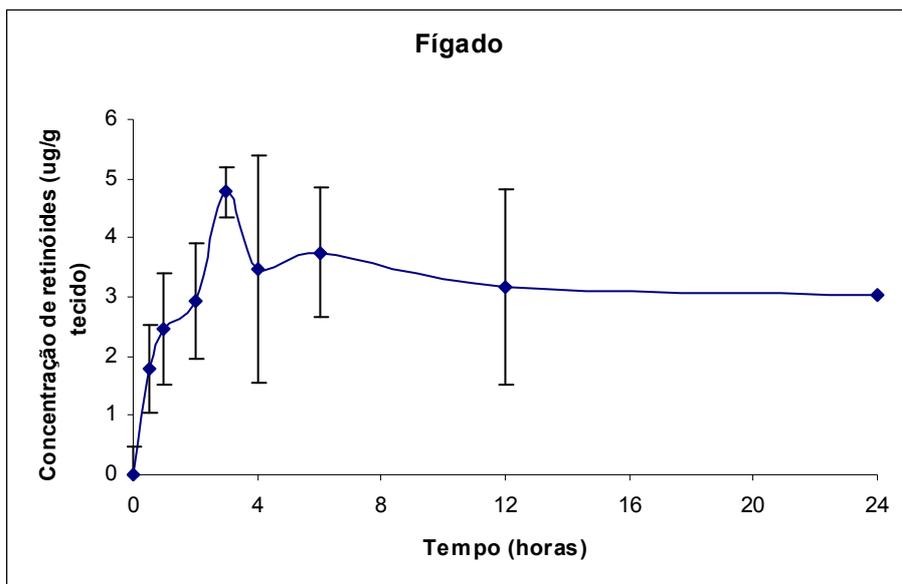


Figura 60: Biodistribuição da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em fígado de camundongo durante 24 horas.

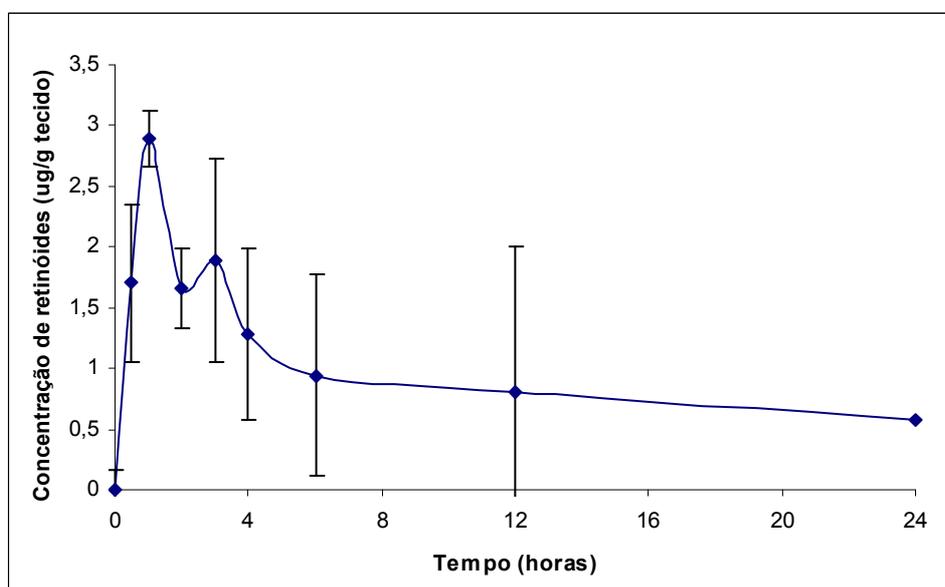


Figura 61: Biodistribuição da isotretinoína encapsulada em nanocápsulas de PLGA em pulmão de camundongo durante 24 horas.

Conforme mencionado anteriormente, sabe-se que a isotretinoína sofre significativa isomerização em seu isômero mais estável *in vivo* e *in vitro*, a tretinoína (MARCHETTI et al, 1997; BLANER, 2001). Isto pode ser confirmado neste trabalho em dois momentos distintos, durante incubação com as células K562 e durante o ensaio de biodistribuição tissular em camundongos, onde foi possível monitorar apenas a tretinoína. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que demonstrasse a biodistribuição tissular da isotretinoína em animais.

A concentração plasmática da tretinoína, em camundongos, é rapidamente diminuída pelo grande seqüestro e metabolismo tecidual mantido interrompido mesmo após a eutanásia (KURLANDSKY, 1995). Chansri e colaboradores, utilizando marcador radioativo, demonstraram (2006) que a tretinoína quando incorporada em micelas poliméricas e lipossomas foi rapidamente eliminada da corrente sangüínea e recuperada no fígado nos primeiros 30 minutos. Suzuki e colaboradores (2006) demonstraram que quando encapsulada em lipossomas catiônicos o órgão de maior acúmulo da tretinoína foi o pulmão.

Através dos resultados obtidos neste trabalho em relação a biodistribuição tissular pôde-se observar que as nanocápsulas de PLGA foram rapidamente seqüestrados pelo fígado e pulmão assim como demonstrado por Chansri *et al* (2006) e Suzuki *et al* (2006) Estes tecidos demonstram maior acúmulo das nanocápsulas, pela presença de capilares fenestrados e células do sistema retículo endotelial. (KURLANDSKY et al, 1995; CHANSRI et al, 2006; KAWAKAMI et al, 2006; SUZUKI et al, 2006).

5. CONCLUSÕES.

- ✓ A obtenção de populações com diâmetro médio menor que 200 nm e PDI igual a 0,1 quando se utilizou gotejamento agulha com diâmetro interno de 0,317, foi reprodutível e garantiu o mesmo diâmetro médio para as gotículas da emulsão;
- ✓ Dentre as diversas formulações avaliadas, a que apresentou melhores características de eficiência de encapsulação e estabilidade foi a que contém 5 mg de isotretinoína/150 mg PLGA/150 mg PC/100 mg Óleo de soja /150 mg Poloxamer 188, para 10 mL da dispersão obtida através do método de deposição do polímero pré-formado;
- ✓ A dispersão de nanocápsulas de PLGA contendo isotretinoína (0,5 mg/mL) – NC-ISO 1, armazenada em geladeira se mostrou estável durante pelo menos 270 dias;
- ✓ A eficiência máxima de encapsulação foi alcançada com 98% de isotretinoína encapsulada, partindo da concentração inicial de 0,5 mg/mL. A razão molar de máxima encapsulação foi de 1:4 (isotretinoína: PLGA)
- ✓ A encapsulação da isotretinoína em nanocápsulas de PLGA reduziu os efeitos da radiação UVA sobre a isotretinoína na primeira hora de exposição.
- ✓ Utilizando-se 40 mM de fosfatidilcolina na preparação de lipossomas, foi possível encapsular a quantidade 6,3 mg de isotretinoína. A Razão molar entre isotretinoína (2,3 mM) e fosfatidilcolina (40 mM) foi de 1:17. Os lipossomas obtidos apresentaram diâmetro médio de 90 nm.
- ✓ A isotretinoína apresentou maior atividade citotóxica sobre células K562 quando encapsulada em lipossomas e nanocápsulas em comparação com o fármaco em sua forma livre.
- ✓ No ensaio de citotoxicidade sobre células de paciente foi possível alcançar 100% de morte celular com 48 horas de incubação, tanto para lipossomas quanto para nanocápsulas contendo isotretinoína, demonstrando efeito antitumoral superior àquele observado com as células K562.

- ✓ A isotretinoína sofre isomerização em tretinoína e outro retinóides, não identificados neste trabalho, na presença de meio de cultura. A encapsulação da isotretinoína tanto em lipossomas quanto em nanocápsulas (PLGA e PLA) não evitou a isomerização intracelular em tretinoína.
- ✓ Devido à isomerização intracelular e ao fato de que a atividade citotóxica é dose dependente, a atividade citotóxica dos retinóides parece ser devida ao efeito combinatório dos dois principais isômeros (isotretinoína e tretinoína), mesmo quando a inoculação inicial tenha sido apenas de um deles, no caso, a isotretinoína.
- ✓ A isotretinoína também sofre isomerização *in vivo* em tretinoína. A tretinoína monitorada nos experimento de biodistribuição tissular permite inferir que as nanocápsulas de PLGA distribuíram-se no fígado e pulmão.

6.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHFS-DRUG INFORMATION. Skin and Mucous Membrane Agents: Miscellaneous Skin and Mucous Membrane Agents. Bethesda, 1998, p. 2958-2963.

AHSAN, F; RIVAS, I. P; KHAN, M. A, SUÁREZ, A. I. T. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carries – liposome and microspheres – on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Rel.*, Amsterdam ,v. 79,n.1-3, p. 29-40, 2002.

ALIABI, H.M., LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for drug delivery. *Expert Opin Drug. Deliv.*, Orlando, v. 3, n. 1, p. 139-162, 2006.

ALI, S. A. M.; ZHONG, S. P.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F.; Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly (caprolactone). *Biomaterials*, Guilford, v.14,n.9, p.648-656, 1993.

ALONSO, M. J.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 68, n.1-3, p. 69 –76, 1991.

ALVES, C. P. I. Estudo e caracterização da encapsulação da isotretinoína em lipossomas unilamelares. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Farmácia, Goiânia, 2005.

AL-KHAWAJAH, M. M. Isotretinoin for acne vulgaris. *Int. J. Dermatol.*, Philadelphia, v.35, n. 3, p. 212-215, 1996.

ALLEN, J. G.; BLOXHAM, D. P. The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmac. Ther.*, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1-27, 1989.

AMIJI , M. M . Nanotechnology – Improving Targeted Delivery. *Drug Delivery* 2 0 0 7.

ANDREO-FILHO, N; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de fármacos. *Infarma.*, v. 9, n.1, p.18-21, 1999.

ANDERSON, M; OMRI, A. The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv.*, Orlando, v.11, n.1, p.33-39, 2004

ANDRESEN, T. L., JENSEN, S. S., JØRGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog. Lipid Res.*, Oxford, v. 44, n.1, p. 68-97, 2005.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.

AOKI, H.; TOTTORI, T.; SAKURAI, F.; FUJI, K.; MIYAJIMA, K.; Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.156,n.2, p.163-174, 1997.

ARCE, F.; GATJENS-BONICHE, O.; VARGAS, E.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C. Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-*cis*- retinoic acid on human heptoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Letters.*, Amsterdam ,v. 229, n.2, p. 271-281, 2005.

ARMSTRONG, J.L.; REDFERN, C.P.F.; VEAL, G.J. 13-*cis* Retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology – ischanging shape the Key to success. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 69, n.9, p. 1299-1306, 2005.

ATTWOOD, D., BOOTH, C., YEATES, S. G., CHAIBUNDIT, C., RICARDO, N. M.P.S. Block copolymers for drug solubilisation: Relative hydrophobicities of polyether and polyester micelle-core-forming blocks. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.345, n.1-2, p. 35-41, 2007.

AZEVEDO, M.M. M. NANOESFERAS E A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS. Monografia.LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido. Instituto de Química. UNICAMP. 2002.

BANGHAM, A., STANDISH, M. M., WATKINS, J.C. The 1st description of liposomes - a citation classic commentary on diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *CURRENT CONTENTS/LIFE SCIENCES.*, Hilversum, v.13, p. 14, 1989.

BARBOZA, L. P; SOUZA, J. M; SIMÕES, F.V., BRAGANÇA, I. C; ABDELHAY, E. Análise dos transcritos de translocação t(9,22) em leucemia Mielóide Crônica. Ver. Brás. Hematol. Hemoter. v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.

BARRATT, G.M. Therapeutic application of colloidal drug carriers. *PSTT*. v. 3, n. 5, 2000.

BLANDER, W.S. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J.Am.Acad.Dermatol.*, Saint Louis, v.45, n.5, p.S129-135, 2001.

BENITA, S. Microencapsulation – Methods and Industrial Application. Informa Health Care. 664p. 1996.

BERBENNI, V.; MARINI, A.; CARDINI, A. Thermoanalytical and spectroscopic characterization of solid-state retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 221, n.1-2, p. 123-41, 2001.

BERGANTINI, A.P.F.; CASTRO, F.; SOUZA, A.M.; FETT-CONTE, A. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasI. *Rev. Bras. Hematol.Hemoter.*, v. 27, n. 2, p. 120-125, 2005.

BIGBY, M. D.; STERN, R. S. Adverse reactions to isotretinoin. A report from the Adverse Drug Reaction Reporting System. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 18, n. 3, p. 543-552, 1988.

BOEHM, M. F.; McCLURG, M.R.; PATHIRANA, C.; MANGELSDORF, D.; WHITE, S.K.; HEBERT, J.; WINN, D.; GOLDMAN, M.E.; HEYMAN, R.A. Synthesis of high specific activity [³H]-9-cis-retinoic acid and its application for identifying retinoids with unusual binding properties. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 37, n. 3, p. 408-414, 1994.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 280, n.1-2, p. 241-251, 2004.

BRAND, N.; PETKOVICH, M.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; de The H, MARCHIO, A.; TIOLLAIS, P.; DEJEAN, A. Identification of a second human retinoic acid receptor., *Nature.*, London, v. 332. n. 6167, p. 850-853, 1988.

BRANNON-PEPPAS L, BLANCHETTE JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 56, n.11, p. 1649-1659, 2004.

BRAZZELL, R. K.; COLBURN, W. A. Pharmacokinetics of the retinoids isotretinoin and tretinoin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 6, n. 4 Pt 2 Suppl, p. 643-651, 1982.

BREITMAN, T. R.; COLLINS, S.J.; KEENE, B,R. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood.*, New York, v. 57, n. 6, p. 1000-1004, 1981.

BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 199, n.1, p. 49-57, 2000.

BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin in creams. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 334, n.1-2, p. 56-61, 2007.

BRISAERT, M.; GABRIËLS,M.; MATTHIJS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J. Pharm. Biom. Anal.*, Oxford, v.26, n.5-6, p.909-917, 2001.

BONASSA, E.M.A. Conceitos gerais em quimioterápicos antineoplásicos. In: Bonassa, E.M.A . *Enfermagem em terapêutica oncológica*. 3ª Ed. Atheneu. 3p. 2005

BROOKING, J., DAVIS, S. S., ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J. Drug. Target.*, Yverdon, v.9, n.4, p.267-279, 2001.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers, *J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 85 ,n.5, p.530–536, 1996.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. *Biochem. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 733, n.2, p. 172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; YOSHIDA, L.S.; SESSO, A.; CHAIMOVICH, H. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. *J. Colloid. Interface Sci.*, New York, v. 100, n. 2, p. 433-443, 1984.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 250, n.1, p. 273-281, 2003.

CEH, B., WINTERHALTER, M., FREDERIK, P.M., VALLNER, J.J., LASIC, D.D. Stealth[®] liposomes: from theory to product. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 24, n.2-3, p.165-177, 1997.

CIANI, L.; RISTORI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; MARTINI, G. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential. *Biophys. Chem.*, Amsterdam, v.131, n.1-3, p.80-87, 2007.

CHABNER, B. A; RYAN, D.P; PAZ-AIRES, L; GARCIA-CARBONERO, R; CALABRESI, P. Antineoplastic agents. In: Goodman & Gilson .The Farmacological Basis of Therapeutics. 20th edition. 2001.

CHANDRARATNA, R. A. S. Tazarotene, first of a new generation of receptor selective retinoids. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 135, Suppl 49, p. 18s-25s, 1996.

CHANRSI,N.; KAWAKAMI, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Inhibition of liver metastasis by all-*trans* retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 321, n.1-2 , p. 42-49, 2006.

CHÉCOT-MOINARD, D., CHEVALIER, Y., BRIANÇON, S., BENEY, L., FESSI, H. Mechanism of nanocapsule formation by the emulsion-diffusion process. *J. Colloid Interface Sci.*, Orlando, v. 317,n.2, p. 458-468, 2008.

CHO, C.S.; CHO, K.Y.; PARK, I.K.; KIM, S.H.; SASAGAWA, T.; UCHIYAMA, M.; AKAIKE, T. Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 77, n.1-2, p. 7-15, 2001.

CHONN, A.; SEMPLE, S. C.; CULLES, P. R. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. *J. Biol. Chem.*, Berlin, v.267, n.26, p.18759-18765, 1992.

CHUNG Y.I., TAE G., YUK S.H.; A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials.*, Guilford, v.27, n.12, p.2621-2626, 2006.

CÓCERA, M.; LÓPEZ, O.; CODERCH, L.; PARRA, J.L.; MAZA, A. Permeability investigation of phospholipid liposomes by adding cholesterol. *Colloid and Surfaces.*, Amsterdam, v. 221, n.1-3, p. 9-17, 2003.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; GAMBARI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Liposome-associated retinoids: production, characterization and antiproliferative activity on neoplastic cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Bethesda, v. 2, n.4, p. 281-291, 1994.

CORTESI, R.; GUI, V.; GAMBARI, R.; NASTRUZZI, C. In vitro effect on human leukemic K 562 cells of co-administration of liposome-associated retinoids and cytosine arabinose (Ara-C). *Am. J. Hematol.*, New York, v.62, n. 1,p. 33-43, 1999.

COUVREUR, P., DUBERNET, C., PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart, v. 41,n.1, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, New York, v. 19, n.2, p.99-134, 2002.

COUVREUR P., GREF R., ANDRIEUX K., MALVY C.; Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases. *J. Solid State Chem.*, San Diego, v.34, n.2-4, p. 231-235, 2006 (A).

COUVREUR P., VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent desing to tret complex disease. *Pharm. Res.*, New York,v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006 (B)

CUNHA JUNIOR A.S., LIGÓRIO S.F., CARNEIRO L.B., ORÉFICE F: Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v.66, p.385-391, 2003.

CRUZ, L.; SHAFFAZICK, S.R.; COSTA, T.D.; SOARES,L.U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA N.P.; SHAPOVAL , E.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES,S.S. Physico-chemical characterization and in vivo evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Stevenson Ranch, v. 6, n. 9-10, p. 3154–3162, 2006.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; COSTA, T.D.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 313, n.1-2 , p. 198-205, 2006.

DAVDA, J., LABHASETWAR, V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.233, n.1, p.51-59, 2002.

DAVIDOVICI, B.B.; TUZUN, Y.; WOLF, R. Retinoid receptors. *Dermatol.Clin.*, Philadelphia, v. 25, n.4,p. 525-530, 2007.

DRAGNEV, K.H.; RIGAS, J.R.; DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist.*, Ohio, v. 5, n.5, p. 361-368, 2000.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart ,v.66, n. 1, p.34-41, 2007.

DESHPANDE, A. A.; HELLER, J.; GURNY, R. Biodegradable polymers for ocular delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*,New York, v.15, p.381-420, 1998.

DEWALD, G.W., BROCKMAN, S.R., PATERNOSTER, S.F. Molecular cytogenetic studies for hematological malignancies. *Cancer Treat Res.*, Boston, v. 121, p. 69-112, 2004.

DÍAZ, C.; VARGAS, E.; GATJENS-BONICHE, O. Cytotoxic effect induced by retinoic acid loaded into galactosyl-sphingosine containing liposomes on human heptoma cell lines. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 325, n.1-2, p. 108-115, 2006.

DI GIOVANNA J.J. Posttransplantation Skin Cancer: Scope of the problem, management and role for systemic retinoid chemoprevention. *Transplant Proc*, New York, v.30, n.6, p.2771-2775, 1998.

DOMB, A. J., KUMAR, N., SHERSKIN, T., BETONILA, A., STAGER, J., TEOMIM, D. Biodegradable polymers as drug carrier systems. In: DIMITRIU, S. *Polymeric Biomaterials*. 2ª Ed, Marcel Dekker, Basel, 2002.

DONBROW, M. *Microcapsules and Nanoparticules in Medicine e Pharmacy*. Boca Raton: CRC, 1991. p. 1-13.

DONG, W.Y.; KROBER, M.; ESGUERRA, V.L.; BODMEIER, R. Stability of poly (DL-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in situ forming drug delivery system. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 115, n.2, p.158-167, 2006.

DRUGDEX - DRUG EVALUATIONS. Isotretinoin. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.cdrompro.com.br/ufg>> acesso em: 26 mar 2008.

DUVIC M., APISARNTHNARAX N., COHEN D.S., SMITH T.L., HA C.S., KURZROCK R.; J. Analysis of long-term outcomes of combined modality therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Am. Acad. Dermatol.*, St.Louis, v.49, n.1, p. 35-49, 2003.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING, Disponível em: <<http://www.malvern.co.uk>>. Acesso em: Janeiro de 2005.

ELKE, M; ROLF-JOACHIM, M; WOLF – DIRTER, D. Interrelation between side chain crystallization and dynamics glass transitions in higher poly (n-alkyl methacrylates). *Termochimica acta.*, v.403, n.1, p.105-114, 2004.

ELLIS, C.N.; KRACH, K.J. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 45, n.5, p.S150-157, 2001.

ELSAYED, M.M.A.; ABSALLAH, O.Y.; NAGGAR, V.F.; KHALAFALLAH, N.M. Lipids vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 332, n.1-2, p. 1-16, 2007.

FANG, J.Y.; LIN, H.H.; TSAI, Y.H. Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 45, n.9, p.1504-1509, 1997.

FARRELL, S.; SIRKAR, K. K. Controlled release of liposomes. *J. Membrane. Sci.*, Amsterdam, v, 127,n.2, p.223-227, 1997.

FAWAZ F., BONINI F., GUYOT M., LAGUENY A.M., FESSI H., DEVISSAGUET J.D.; Disposition and protective effect against irritation after intravenous and retal administration of indomethacin loaded nanocapsules to rabbits. *Int J Pharm.*, Amsterdam, v. 133, n.1-2 p.107-115, 1996.

FENG, S; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Control. Release.*, Amsterdam,v. 71, n.1, p. 53-69, 2001.

FESSI H., PUISIEUX F., DEVISSAGUET J.PH., AMMOURY N., BENITA S.; Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int J Pharm.*, Amsterdam, v. 55, n.1, p.1-4,1989.

FIELDING, R. M. Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical Pharmacokinetic and therapeutic perspective. *Clin Pharmacokinetic.*,New York, v.21, n.3, p.155-164, 1991.

FINE J.D., JOHNSON L.B., WEINER M., STEIN A., SUCHINDRAN C. Chemoprevention of squamous cell carcinoma in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: Results of a phase 1 trial of systemic isotretinoin. *J Am Acad Dermatol.*, St.Louis, v.50, n. 4,p. 563-571, 2004.

FISHER D.C; PETERS W.P. Advances in the clinical use of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to intensify cancer chemotherapy. *Curr Opin Hematol.*, Philadelphia , v1, n.3, p.221-227, 1994.

FOURNIER, I.; BARWICZ, J.; AUGER, M.; TANCRÈDE, P. The chain conformational order of ergosterol- or cholesterol-containing DPPC bilayers as modulated by Amphotericin B: a FTIR study . *Chem Phys of lipids.*, Amsterdam, v.151, n. 1, p. 41-50, 2008.

GABIZON, A.; GOREN, D.; HOROWITZ, A.T.; TZEMACH, D.; LOSSOS, A.; SIEGAL, T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. *Adv Drug Deliv Rev.*, Amsterdam, v. 24, n. 2-3, p.337-344, 1997.

GALLAGHER, R.E. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.*, Baltimore v.16, n. 10, p. 1940-1958, 2002.

GARATTINI, E.; GIANNI, M.; TERAIO, M. Cytodifferentiation by retinoids, a novel therapeutic option in oncology: rational combinations with other therapeutic agents. *Vitamins & Homones.*, v. 75, p.301-354, 2007.

GAUCHER, G., DUFRESNE, M.H., SANT, V.P., KANG, N., MAYSINGER, D., LEROUX, J.C. Block copolymer micelles. Preparation, characterization and application in drug delivery. *J.Control. Release.*, Amsterdam, v. 109,n. 1-3, p. 169-188, 2005.

GEL FILTRATION: Principles and methods. Disponível em: <<http://www.chromatography.amershambiosciences.com>>. Acesso em: Janeiro de 2005.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of liposomes by size exclusion chromatography. *J. Biochem. Biophys. methods.* Amsterdam, v. 56, n.1-3, p.189-217, 2003.

GRAF, R., COUVREUR, P. Nanocpales: preparation, characterization and therapeutic application. In: Thorchilin, v. Nanoparticulates as Drug Carriers. ICP, 2006.255p.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech December*, v.13, p.527-537, 1995.

GIBSON,J.D.; KHANAL, B.P.; ZUBAREV, E.R. Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, Easton, v. 129, n.37, p. 11653-11661, 2007.

GIGUERE, V.; ONG, E.S.; SEGUI, P.; EVANS, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature.*, London., v. 330, n. 6149, p. 624-629, 1987.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.57, n.2, p. 171-185, 1999.

GOYAL, P.; GOYAL, K.; KUMAR, S.G.V.;SINGH, A.; KATARE, O.P.;MISHRA, D.N. Liposomal drug delivery systems-clinical application. *Acta. Pharm.*, Zagreb, v. 55, n.1, p. 1-25, 2005.

GUINEBRETIERE S., BRIAÇON S., LIETO J., MAYER C.,FESSI H. Study of Emulsion - Diffusion of Solvent: Preparation and Characterization of Nanocapsules. *Drug Dev Res*, New York, v.57, n.1,p.18-33, 2002.

GULATI, M., GROVER, M., SINGH, S., SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int. J. Pharm*, Amsterdam, v.165,n.2, p.129-168, 1998.

GUNDERSEN, TH. E.; BLOMHOFF, R. Qualitative and quantitative liquid chromatography determination of natural retinoids in biological sample. *J.Chromatogr. A.*, Amsterdam, v. 935, n. 1-2, p.13-43, 2001.

GUTERRES, S. S.Ç FESSI, H.; BARRATT, G. ; DEVISSAGUET,J. P.; PUISIEUX F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study.*Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.113, n.2, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S.S., ALVES, M.P., POHLMANN, A.R. Polymeric Nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights.*, v. 2, n.2, p. 147-157, 2007.

HANGAN, S.A., COOMBES, A.G.A., GARNETT, M.C. DUNN, S.A., DAVIES, M.C., ILLUM, S., DAVIS, S.S., HARDING, S.E., PURKISS, S., GELLERT, P.R. Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system I. Characterisation of water disperbible micelle-forming system. *Langmuir.*,v. 12, p. 2153-2161, 1996.

HARISIADIS, L.R.; MILLER, R.C.; HALL, E.J.; BOREK, C. A vitamin A analog inhibits radiation-induced oncogenic transformation. *Nature*, London, v. 274, n. 3, p. 486-487, 1978.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.; BENOIT, J. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, Guilford, v. 24, n. 23, p.4283-4300, 2003.

HEYMAN, R. A. ; MANGELSDORF, D. J. ; DYCK, J. A. ; STEIN, R.B. ; EICHELE, G. ; EVANS, R.M. ; THALLER, C. 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, Massachusetts, v. 68, n.2, p. 397-406, 1992.

HILDER, T. A., HILL, J. M. Carbon nanotubes as drug delivery nanocapsules. *Current Applied Physics*, v. 8, n.3-4, p. 258-261, 2008.

HOFFMANN, F., CINATL J. R, J., KOVA, H. K., CINATL, J., KREUTER, J., STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.157, n. 2, p.189-198, 1997.

HONG, W.K., LIPPMAN, S.M., ITRI, L.M., KARP, D.D., LEE, J.S., BYERS, R.M., SCHANTZ, S.P., KRAMER, A.M., LOTAN, R., PETERS, L.J. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, Boston, v. 323, n.12, p. 795-801, 1990.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*, New York, v.1, n.1, p. 22-30, 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer.Ministério da Saúde. Ocorrência e magnitude do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Acesso em: março de 2008. Disponível em: www.inca.gov.br.

IOLE, G.; CIONE, E.; RISOLI, A.; GENCHI, G.; RAGNO, G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoína in liposomes formulations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.293, n.1-2, p.251-260, 2005.

ISHIHARA, K.; TSUJINO,R.; HAMADA, M.; TOYODA, N.; IWASAKI, Y. Stabilized liposomes with phospholipid polymers and their interactions with blood cells. *Colloids and Surfaces.*, Amsterdam, v. 25, n.4 ,p.325-333, 2002.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of retinoids. *J. Biol.Chem.*, Berlin, v. 258, n.9, p. 5329-5333, 1983.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 338, n.1-2, p. 297-305, 2007.

JABR-MILANE, L.; VLERKEN, L.; DEVALAPALLY, H.; SHENOY, D.; KOMAREDDY, S.; BHAVSAR, M.; AMIJI, M. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. *J. Control.Rel.*, Amsterdam, ***In Press***, 2008.

JALIL R., NIXON J.R.; Microencapsulation using poly (DL-lactic acid) I: Effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J Microencapsul*, London, v.7, p. 229-244,1990.

JEDERSTRÖM, G.; RUSSEL, G. Size exclusion chromatography of liposomes on different gel media. *J. Pharm. Sci*, Bethesda, v.70, n.8, p.874-878,1981.

JEONG, Y.; SONG, J.; KANG, S.;RYU, H.; LEE, H.; CHOI, C.; SHIN, B.; KIM, K.; AHN, K.; JUNG, S. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 259, n.1-2, p.79-91, 2003.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate.*Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 272, n.1-2, p. 45-55, 2004.

JIMÉNEZ -LARA, A.M.; CLARKE, N.; ALTUCCI L.; GRONEMEYER, H. Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *TRENDS Mol Med.*, Oxford, v.10, n.10, p. 508-515, 2004.

KANG, H.J.; SHIN, H.Y.; CHOI, H.S.; AHN, H.S. Novel regimen of the treatment of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leuk. Res.*, Oxford, v. 28, n. 2, p. 167-170, 2004.

KANTARJIAN, H.M; GILES, F.J; O`BRIEN, S.M; TALPAZ, M. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon alpha and chemotherapy. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, Philadelphia, v. 12, n.1, p. 31-80, 1999.

KAWAKAMI, S.; SUZUKI, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Induction of apoptosis in A 549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 110, n.3, p. 514-521, 2006.

KAWASAKI, E. S., PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine.*, New York, v 1, n. 2, p.101-109, 2005.

KECK, C.M.; MULLER, R.H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 3-16, 2006.

KIBBE, A. H. Handbook of excipients, 3^a edição, APHA, Washington , p. 13-17; 292-294, 2000.

KIM, S.Y., SHIN, I.G., LEE, Y.M., CHO, C.S., SUNG, Y.K. Methoxy poly(ethylene glycol) and ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelles containing indomethacin. II Micelle formation and drug release behaviours. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 35, n.1, p. 13-22, 1998.

KIM, K.Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine.*, New York, v. 3, n.2, p. 103-110, 2007.

KIZAKI, M.; UENO, H.; YAMAZOE, Y.; SHIMADA, M.; TAKAYAMA, N.; MUTO, A.; MATSUSHITA, H.; NAKAJIMA, H.; MORIKAWA, M.; KOEFFLER, H.P; IKEDA, Y. Mechanism of retinoid resistance in leukemic cells: possible role of cytochrome P450 and P-glycoprotein. *Blood.*, New York, v. 87, n. 2, p.725-733, 1996.

KITAREEWAN, S.; BURKA, L. T.; TOMER, K.B.; PARKER, L.J.; DETERDING, L.J.; STEVENS, R.D.; FORMAN, B.M.; MAIS, D.E.; HEYMAN, R.A.; McMORRIS, T.; WEINBERGER, C. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol. Biol. Cell*, Massachusetts, v. 7, n. 8, p. 1153-1166, 1996.

KLAASSEN, I.; BRAKENHOFF, R.H.; SMEETS, S.J.; SNOW, G.B.; BRAAKHUIS, B.J.M. Considerations for in vitro retinoid experiments: importance of protein interaction. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1427, n.2, p. 265-75, 1999.

KLIGERMAN J. Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil; *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.48, n.2 , 2002

KREUTER J, SHAMENKOV D, PETROV V, RAMGE P, CYCHUTEK K, KOCH-BRANDT C, ALYAUTDIN R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target.*, Yverdon, v. 10, n.4, p.317-325, 2002.

KWON, G. S. Block copolymer micelles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v.54, n.2, p.167, 2002.

KUYKENDALL, D. W.; ZIMMERMAN, S. C. A very versatile nanocapsule. *Nature nanotechnology.*, v. 2 , p. 201-202, 2007. Avaliado em: maio/ 2008. Disponível em: www.nature.com/naturenanotechnology.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e Fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e Prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 1277-1355, 2001.

LAI, PING-SHAN.; LOU, PEI-JEN; PENG, CHENG-LIANG; PAI, CHIN-LING; YEN, WEI-NEN; HUANG, MING-YI; YOUNG, TAI-HORNG; SHIEH, MING-JIUM. Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v. 122, n.3, p. 39–46, 2007.

LAMPRECHT A.; UBRICH N.; PEREZ M.H.; LEHR C.M; HOFFMAN M.; MAINCENT P.; Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *Int J Pharm.*, Amsterdam, v.184, n.1, p. 97-105, 1999.

LANVERS, C.; HEMPEL, G.; BLASCHKE, G.; BOSS, J. Chemical induced isomerization and differential uptake modulate retinoic acid disposition in HL-60 cells. *FASEB.*, v. 12, p. 1627-1633, 1998.

LASIC, D. D., MARTIN, F.J. Liposome. *Farm Vestn.*, Ljubljana, v.40, p.197-208, 1989.

LASIC, D. D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J.Control. Release*, Amsterdam, v.48, n.2-3, p.203-222, 1997.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Tibtech*. London, v.16, n.7, p.307-321, 1998.

LAO, L. L.; VENKATRAMAN, S. S. Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, **In Press**, 2008.

LEBOWITZ, M.; BERSON, D.S. Ocular effects of oral retinoids. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 19, n. 1, p. 209-211, 1988.

LEE, V. H. L; ROBINSON, J. R. Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems. In: *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications*. Marcel Dekker. 1987.

LEE, J. S.; BAE, J. W.; JOUNG, Y. K.; LEE, S. J.; HAN, D. K.; PARK, K. D. Controlled dual release of basic fibroblast growth factor and indomethacin from heparin-conjugated polymeric micelle. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 346, n. 1-2, p. 57-63, 2008.

LEGRAND, P., LESIEUR, S., BOCHOT, A., GREF, R., RAATJES, W., BARRATT, G., VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.344, n.1-2, p. 33-43, 2007.

LEHMANN, S.; PAUL, C.; TORMA, H. Retinoid receptor expression and its correlation to retinoid sensitivity in Non-M3 acute myeloid leukemia cells. *Clin. Cancer Res.*, Denville, v. 7, n.2, p.367-373, 2001.

LEVIN, A. A. ; STURZENBECKER, L. J.; KAZMER, S. ; BOSAKOWSKI, T. ; HUSELTON, C. ; ALLENBY, G. ; SPECK, J. ; KRATZEISEN, CI. ; ROSENBERGER, M. ; LOVEY, A. ; GRIPPO, J.F. 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature.*, London, v. 355, n.6358, p.359-361, 1992.

LIMA, E. M. Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações. São Paulo. 1995. 209 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

LIMA, E.M; OLIVEIRA A.G. Tissue tolerance of diclofenac sodium encapsulated in liposomes after intramuscular administration .*Drug Dev Ind Pharm.*, New York, v. 28, n. 6, p. 673-680, 2002

LIMA, E. M; DINIZ, D.G.A.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Development of a gas chromatography method for the determination of isotretinoin and its degradation products in pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* Irlanda, v. 38, n.4, p. 678-685, 2005.

LIM, S.J.; LEE, M.K.; KIM, C.K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticles powders.*J. Control. Rel.*, Amsterdam, v. 100, n.1, p. 53-61, 2004.

LIN, HAI-SHU.; LEONG, W.W. Y.; YANG, J.A.; LEE, P.; CHAN, S.C.; HO, P.C. Biopharmaceutics of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) formulated with modified β -cyclodextrins.,*Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 341, n.1-2, p. 238-245, 2007.

LOCKMAN, P. R., MUMPER, R. J., KHAN M. A., ALLEN, D. D. The transport of choline. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, New York, v.28, n.7, p.749-771, 2002.

LOPES, E.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S.S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie.*, Berlin, v. 55, n. 7, p. 527-530, 2000.

LORENZI, T.F. Patologia dos Leucócitos. In: Manual de Hematologia. Procedência e Clínica. 3ª Edição.200.

LOTAN, R. Effects of vitamina A and its analog (retinoids) on normal and neoplasics cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 605, n. 1, p.33-91, 1980 (A).

LOTAN, R et al. Comparison of the level of cellular retinoic-binding proteins and suceptibility to retinoid induced growth inhibition of various neoplastic cell lines.*J. Natl.Cancer. Inst.*, Bethesda, v. 64, n.5,p. 1259-1262, 1980 (B).

LUZZI, L.; PALMIERI, A. An overview of pharmaceutical applications. In: LIM, F. Biomedical Applications of Microencapsulation. Boca Raton: CRC, 1985. p. 2-14.

MCCARTER, T. L.; CHEN, Y. K. Marked hyperlipidemia and pancreatitis associated with isotretinoin therapy. *Am. J. Gastroenterol.*, Baltimore, v. 87, n. 12, p. 1855-8, 1992.

MACHY, P.; LESERMAN, L. "Piloting of drugs and biological macromolecules: approaches to therapy. In: Liposomes in cell biology and pharmacology. Les editions Inserm, Cheshire .p.34-97, 1987.

MALPEZZI, L.; BOSCHETTI, C.; FUGANTI, C.; GRASSELLI, P.; MAGNONE, G.A.; PELLEGGATTA, C. Stability of 13-*cis*-retinoic acid an x-ray diffraction study. *Pharm. Ind., Postfach.*, v. 60, n. 11, p. 983-985. 1998.

MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; LOY, G.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin II. Preparation and properties. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.234, n.1-2, p.237-248, 2002.

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.*, Amsterdam, v.260, n.2, p.261-272, 2003.

MANGELSDORF, D. J.; ONG, E. S.; DYCK, J. A.; EVANS, R.M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature.*, London., v. 345, n.6272, p. 224-229, 1990.

MANGELSDORF, D. J.; UMESONO, K.; KLIEWER, S. A.; BORGMEYER, U.; ONG, E. S.; EVANS, R.M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell.*, Massachusetts, v. 66, n.3, p. 555-561, 1991.

MARCELINO, J.; LIMA, J. L.F.C., REIS, S; MATOS, C. Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes. *Chem Phys Lipids.*, Amsterdam, v.146, n.2, p. 94-103, 2007.

MARCHETTI, M.N.; SAMPOL, E.; BUN, H.; SCOMA, H.; LACARELLE, B.; DURAND, A. In vitro metabolism of three major isomers of retinoic acid in rats. Intersex and interstrain comparison. *Drug. Metab. Dispos.*, Bethesda, v.25, n. 5, p. 637-646, 1997.

MARCUS, R., COULSTON, A. M. Fat-Soluble Vitamins In: HARDMAN, J.G., GOODMAN GILMAN, N.A., LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. p. 1773-1791, New York: Mc Graw Hill, 2001.

MARTINDALE. The Extra Pharmacopéia. 35th ed, London, Pharmaceutical Press, p. 1440-1443, 2007.

MATSUZAKI, K., MURASE, O., SUGISHITA, K., YONEYAMA, K.A., UEHA, M., NAKAMURA, A., KOBAYASHI, S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1467, n.1, p.219-226, 2000.

McPHAIL, D.; TETLEY, L.; DUFES, C.; UCHEGBU, I.F. Liposomes encapsulating polymeric chitosan based vesicles – a vesicle in vesicle system for delivery. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 200, n.1, p. 73-86, 2000.

MEN, Y; AUDRAN, R; THOMASIN, C; EBERL, G; DEMOTZ, S; MERKLE, H.P; GANDER, B; CORRADIN, G. MHC class I- AND class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. *Vaccine.*, Guildford, v. 17,n.9-10, p. 1047-1056, 1999.

MO Y., LIM L.Y. Preparation and in vitro anti cancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl miristate. *J Control Release*, Amsterdam, v.107, n.1, p.30-42, 2005.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review .*Trop J Pharm Res.*, v.5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOINARD-CHÉCOT, D.;CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocápsulas formation by the emulsion-diffusion process.*J. Colloid. Interface. Sci.*, New York, v. 317,p. 458-468, 2008.

MONTASSIER, P.; DUCHENE, D.; POELMAN, M.C. Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 153, n.2, p. 199-209, 1997.

MOON, T.E., LEVINE N., CARTMEL B., BANGERT J.L.; Retinoids in prevention of skin cancer. *Cancer Letters*, Amsterdam, v.114, p.203-205, 1997.

MOSQUEIRA,V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties, *J. Pharm. Sci.*, Easton, v. 89, pp. 614–626, 2000.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, Amsterdam, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MU L., FENG S.S.; A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J Control Release*, Amsterdam, v. 86, n.1, p.33-48, 2003.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug. Del. Rev.*, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 3-19, 2001.

MULLER C.R., HAAS S.E., BASSANI V. L., GUTERRES S.S.; Degradação e Estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Química Nova*, São Paulo, Vol.27, n.4, p.555-60, 2004.

MUNDARGI, R.C.; BABU, V.R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L- lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v. 125, n.3, p. 193-209, 2008.

NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv Drug Del. Rev.*, Amsterdam, v.40, p. 75-87, 1999.

NAGPAL, S.; ATHANIKAR, J.; CHANDRARATNA, R.S.A. Separation of trans-activation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor α . *J.Biol.Chem.*, Berlin, v.270, n.,p.923-927, 1995.

NAMBA, Y.; SAKAKIBARA, T.; MASADA, M.; ITO, F.; OKU, N. Glucuronate-modified liposomes with prolonged circulation time. *Chem. Pharm. Bull*, Tokyo, v.38, p.1663-1666, 1990.

NANKERVIS R., DAVIS S.S., DAY N.H., SHAW P.N.; Studies on the intravenous pharmacokinetics of the three retinoids in the rat. *Int J Pharm.*, Amsterdam, v. 101, n.3, p.249-56, 1994.

NANKERVIS, R.; DAVIS, S.S.; DAY, N.H.; SHAW, P.N. Effect of lipid vehicle on intestinal lymphatic transport of isotretinoin in the rat. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 173-181,1995.

NAPOLI, J. L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 1440, n. 2-3, p. 139-62, 1999.

O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 28, p. 25-42, 1997.

NASTRUZZI, C.; WALDE, P.; MENEGATTI, E.; GAMBARI, R. Liposome-associated retinoic acid. Increase in vitro antiproliferative effects on neoplastic cells.FEB., v. 259, n. 2, p. 293-296, 1990.

O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, Amsterdam, v. 28, p. 25-42, 1997.

O'HAGAN D.T., SINGH M., GUPTA R.K.; Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, Amsterdam,v.32, p.225-246, 1998.

OLBRICH. C., BAKOWSKYB, U., LEHRC , C.M., MU"LLERA, R. H., KNEUERC, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 77, n.3, p. 345-355, 2001.

ORTIZ, M.A.; BAYON, Y.; LOPEZ-HERNANDEZ, F.J.; PIEDRAFITA, F.J. Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. *Drug Resist Updat.*, Philadelphia, v. 5, p. 162-175, 2002.

OSTRO, M. J.; CULLIS, P. R. Use of liposomes as injectable drug delivery systems. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Bethesda, v.46, p.1576-1587, 1989.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; beck, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 352, n.1-2, p.1-4, 2008.

PAGE-CLISSON M.E, ALPHANDARY H.P., OUREVITCH M., ANDREMONT A, COUVREUR P.; Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: Physicochemical study of the drug carrier. *J Control Release.*, Amsterdam, v.56, n.1-3, p.23-32, 1998.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J.Control. Release.*, Amsterdam, v. 120, n.1, p. 1-3, 2007.

PARKER A.N; PRAGNELL I.B. Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. *Blood Rev.*, New York, v.9, n.4, p.226-233, 1995.

PARTHASARATHY, R., MEHTA, K. Altered metabolism of all-trans-retinoic acid in liposome-encapsulated form. *Cancer Letters.*, Amsterdam, v. 134, n.2, p.121-128, 1998.

PERUGINI, P.; SIMEONI,S.; SCALIA, S.; GENTA, I.; MODENA, T.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 246, n.1-2, p. 37-45, 2002.

PETKOVICH, M.; BRAND, N. J.; KRUST, A.; CHAMBON, P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature.*, London, v. 330, n. 6147, p. 444-450, 1987.

POHLMANN, A.R., WEISS, V., MERTINS, O., SILVEIRA, N.P., GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 16, p. 305-312, 2002.

POLETTO, F.S.; JAGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsule. *Materials and engineering C*. v. 28, n. 4, p. 472-478, 2008.

PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Formas farmacêuticas obtidas por operações complexas ou múltiplas, IN : Tecnologia Farmacêutica, 4ª Edição, Fundação Calouste Gul Benkian, Lisboa, v.3 , p. 1179, 1993 (A).

PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Novos Sistemas Terapêuticos, IN : Tecnologia Farmacêutica, 4ª Edição, Fundação Calouste Gul Benkian, Lisboa, v.3 , p. 2055, 1993 (B).

PUISIEUX, F. Les Liposomes. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.41, p.3-13, 1983.

PURI, S., KALLINTERI, P., HIGGINS, S., HUTCHEON, G. A., GARNETT, M. C. Drug incorporation and release of water soluble drugs from novel functionalised poly(glycerol adipate) nanoparticles. *J. Control. Release.*, Amsterdam, **In Press**, 2007

QUADIR A.; Application of Micronized Poloxamer in Pharmaceutical Development. AAPS Pharmaceutical Technologies, San Antonio, 2006.

RAFFAGHELLO, L.; PAGNAN, G.; PASTORINO, F.; COSIMO, E.; BRIGNOLE, C.; MARIMPIETRI, D.; MONTALDO, P.G.; GAMBINI, C.; ALLEN, T.M.; BOGENMANN, E.; PONZONI, M. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of liposomal fenretinide targeted to human neuroblastoma. *Int.J.Cancer.*, Geneve, v. 104, p. 559-567,2003.

RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S., SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicles for bioactive drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.29, n.9, p. 1790-1798, 2006.

REIS, C.P., NEUFELD, R.J., RIBEIRO, A.J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.*, New York, v.2, p. 8-21, 2006.

REYNOLDS, C.P.; MATTHAY, K.K.; VILLABLANCA, J.G.; MAURER, B.J. Retinoid therapy of high-risk of neuroblastoma. *Cancer Lett.*, Amsterdam, v.197, p. 182-192, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBAS, P.T. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo isotretinoína. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). UFG. Goiânia. 2007.

RIBEIRO S., HUSSAIN N., FLORENCE A.T. Release of DNA from dendroplexes encapsulated in PLGA nanoparticles. *Int J Pharm.*, Amsterdam, v.298, n.2, p.354-360, 2005.

RIBEIRO, H. S. ; CHU, BOON-SEANG.; ICHIKAWA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids.*, v.22, n. 1, p. 12-17, 2008.

RODRIGUES, J.S., SANTOS-MAGALHAES, N.S., COELHO, L.C.B.B., COUVREUR, P., PONCHEL, G., GRELL, R. Novel core(polyester) shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J. Control. Release.*, Amsterdam v. 92, n.1-2, p.103-112, 2003.

ROJAS-CHAPANA, J.; TROSZCZYNSKA, J.; FIRKOWSKA, I.; MORSCZECK, C.; GIERSIG, M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab. Chip.*, Cambridge, v. 5, p. 536-539, 2005.

SATO, A.; IMAIZUMI, M.; HOSHI, Y.; RIKIISHI, T.; FUJII, K.; KIZAKI, M.; KAGECHIKA, H.; KAKIZUKA, A.; HAYASHI, Y.; IINUMA, K. Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RAR α chimeric gene. *Leuk Res.*, Oxford, v.28, p. 959-967.

SAKS, S. R; GARDNER, L.B. The pharmaco-economic value of controlled release dosage forms. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.48, n.2-3, p. 237-242, 1997.

SAMUNI, A.M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ Y. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. *Chem Phys of Lipids.*, Amsterdam, v. 105, p. 121-134, 2000.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Usnic acid nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *J. Drug.Sci. Tech.*, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

SANTOS, N.P.S., NASCIMENTO, S.C., WANDERLEY, M.S.O., PONTES-FILHO, N.T., SILVA, J.F., CASTRO, C.M.M.B., PEREIRA, E.C., SILVA, N.H., HONDA, N.K., SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm.*, Stuttgart, v. 64, p.154-160, 2006.

SANTOS- MAGALHÃES N.S.S., PONTES A., PEREIRA V.M.W, CAETANO M.N.P.; Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 208, n.1-2, p.71-80, 2000.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog.Lipid Res.*, Oxford, v. 42, p. 439-462, 2003.

SAVIC, R., EISENBERG, A., MAYSINGER, D. Block copolymer micelles as delivery vehicles of hydrophobic drugs: micelle-cell interaction. *J. Drug. Target.*, New York, v.14, p. 343-355, 2006.

SAVVA, M.; TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. *J. Colloid. Interface Sci.*, New York, v.217, p.166, 1999.

SAXENA V., SADOQI M., SHAO J.; Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int J Pharm.*, Amsterdam, v. 278, n.2, p.293-301, 2004.

SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim.Nova*, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J. Braz. Chem. Soc.* v.17, n.3, p. 562-569, 2006.

SEMPLE, S.C.; CHONN, A.; CULLIS P.R. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. *Adv Drug Del.*, Amsterdam, v. 32, p. 3-17, 1998.

SENIOR, J. H. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, Boca Raton, v. 2 p.123-193,1987.

SHAH, K. A.; DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery . *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 345, n. 1-2, p. 163-171, 2007.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, Oxford, v.26, p. 246-265, 2008.

SHARMA, A; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 154, n. 2, p.123-140, 1997.

SHERSTOV A.YU., KIVMAN G.YA., VASSILIEV A.YE., GELPERINA S.E., ANTROPOV A.S., ANISSIMOVA E.V., GULYAEV A.E. Interaction of nanoparticle-bound ampicillin with the leucocytes of peripheral blood Abstr. III Conf. Pharm.Sci. Clin. Pharmacol., Jerusalem. p.26, 1996.

SIGLA, A.K; GARG, A; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. *Int.J. Pharm.*, Amsterdam, v. 235, n.1-2, p. 179-192, 2002.

SIKIC, B. I. Fármacos Antineoplásicos In: CRAIG, C. R; STITZEL, R.E Farmacologia Moderna. Guanbara Koogan. 1996.

SILVER, R.D.; ADAMS, G.L.;DERKAY, C.S.; HESTER, R. Diagnosis and management of pulmonary metastasis from recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, Rochester, v. 129, n. 6, p. 622-629, 2003.

SMITH, W.; SABA, N. Retinoids as chemoprevention for head and neck cancer: where do we go from here? *Crit Rev Oncol. Hematol.*, Boca Raton, v. 55, p. 143-152, 2005.

SONG C.X., LABHASETWAR V., MURPHY H., QU X., HUMPHREY W.R., SHEBUSKI R.J., LEVY R.J.; Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *J Control Release.*, Amsterdam, v.43, n.2-3,p.197-212, 1997.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSK, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

SOU, K; GOINS, B; TAKEOKA,S; TSUCHIDA, E; PHILLIPS, W. T. Selective uptake of surface-modified phospholipid vesicles by bone marrow macrophages in vivo. *Biomaterials.*, Guilford, v. 28, p. 2655–2666, 2007.

SPORN, M.B; ROBERTS, A.B. What is a retinoid? In-Retinoids differentiation and disease. *Ciba Found Symp.*, Amsterdam, v.113, p. 1-5, 1985.

STOVER, T. C.; KIM, Y. S.; LOWE, T. L.; KESTER, M. Thermoresponsive and biodegradable linear-dendritic nanoparticles for targeted and sustained release of a pro-apoptotic drug. *Biomaterials.*, Guilford, v. 29, p. 359–369, 2008.

STROMSKAYA, T.P.; RYBALKINA, E.Y.; ZABOTINA, T.; SHISHKIN, A.A.; STAVROSKAYA, A.A. Influence of RAR α gene on MDRI expression and P-glycoprotein function in human leukemic cells. *Cancer Cell Int.*, London, v.5, n. 15, p. 2-9, 2005.

SUN, SHI-YONG.; LOTAN, R. Reinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* Boca Raton, v. 41, p. 41-55, 2002.

SUNAMOTO, J.; SATO, T.; HIROTA, M.; FUKUSHIMA, K.; HIRATANI, K.; HARA, K. A newly developed immunoliposome – an egg phosphatidylcholine liposomes coated with

pullulan bearing both a cholesterol moiety and an IgMs. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.898, p.323,1987.

SUZUKI, S.; KAWAKAMI, S.; CHASRI, N.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Inhiition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposome. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 116, n.1 , p. 58-63, 2006.

STEWART, B.W., KLEIHUES, P. World Cancer Report. IARC Nonserial Publication. World Health Organization. International Agency for Research Cancer. 2007.

TAKESHITA, A.; SHIJO, K.; NAITO, K.; OHNISHI, K.; SUGIMOTO, Y.; YAMAKAWA, Y.; TANIMOTO, M.; KITAMUTRA, K.; NAOE, T.; OHNO, R. Role of P-glycoprotein in all-*trans* reinoic acid (ATRA) resistance in acute promyelocytic leukaemia cells: analysis of intracelular concentration of ATRA. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v. 108, n., p. 90-92, 2000.

TAKEUCHI, H.; KOJIMA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and RES uptake in rats. *J. Control. Release*, Amsterdam, v.68, n.2, p.195-201, 2000.

TAN, X., MELTZER, N., LINDENBAUM, S. Solid-state stability studies of 13-*cis* retinoic acid and all *trans* retinoic acid using microcalorimetry and HPLC analysis. *Pharm. Res.*, New York, v. 9, n. 9, p. 1203-1208, 1992.

TAN, X. MELTZER, N. LINDENBAUM, S. Determination to the kinetics of degradation to 13-*cis*-retinoic acid and all-*trans* retinoic acid in solution. *J. Pharm. Biomed .Anal.*, Oxford, v. 11, n. 9. p. 817-822, 1993.

TANOSAKI R; OKAMOTO S; AKATSUKA N; ISHIDA A; MICHIKAWA N; MASUDA Y; UCHIDA H; MURATA M; KIZAKI M; IKEDA Y. Dose escalation of biweekly cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone using recombinant human granulocyte colony stimulating factor in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer.*, New York, v.74, n. 7, p.1939-1944,1994.

TALLMAN, M.S. Relevance of pathologic classification and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical pratices. In: FIN, W.G., PETERSON, L.C. Hematopathology in Oncology., Kluwer Academic Publishiers. 45p. 2004.

TASHTOUSH, B.M.; JACOBSON, E.L.; JACOBSON, M.K. UVA is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin: Implications for development of improved pharmaceutical formulation. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 352, n.1-2, p.123-128, 2008.

TEIXEIRA, M., ALONSO, M.J., PINTO, M.M.M., BARBOSA, C.M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Stuttgart, v. 59, p. 491-500, 2005.

TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 225, n.1-2, p. 1-14, 2001.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Stuttgart, v.11, n. 2, p.S81-S91, 2000.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 73, n.1-2, p. 137-172, 2001.

TORCHILIN, V.P.; LEVCHENKO, T.S. TAT-liposomes: A novel intracellular drug carrier. *Curr. Protein Pept. Sci.*, Hilversum, v.4, n. 2, p. 133-140, 2003 (A)

TORCHILIN VP, LEVCHENKO TS, RAMMOHAN R, et al. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 100, n. 4, p. 1972-1977, 2003 (B).

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature*, London, v. 4, p.145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Drug carriers. 724 p. 2006.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug. Deliv.*, Amsterdam, v.58, p.1532-1555, 2006.

TORCHILIN, V. P. Target pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J.*, Arlington, V.9, n.2,p.128-147,2007.

TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives *Pharm. Res.*, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 1-16, 2007.

UMESONO, K.; GIGUERE, V.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G.; EVANS, R. M. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature.*, London, v. 336, n. 6196, p. 262-265, 1988.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.*, Zurich, v. 70, p.95-111, 1995(A).

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Encapsulation of a water soluble drug in a liposome preparation: removal of free drug by washing. *Drug Dev. Ind. Pharm*, New York, v.21, p.1329-1338,1995(B).

XU, XIAO-CHUN. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- β in cancer. *Cancer Letters.*, Amsterdam, v. 253, p. 14-24, 2007.

WANG, D; ROBINSON, D.R; KWON, G.S; SAMUEL, J. Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D,L-Latic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 57, n.1, p. 9-18, 1999.

WANG Y.M., SATO H., HORIKOSHI I.; In vitro and in vivo evaluation of taxol® release from poly(latic-co-glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *J Control Release*, Amsterdam, v.49, n.2, p.157-166, 1997.

WASAN, K.M; MORTON, R. E. Differences in lipoprotein concentration and composition modify the plasma distribution of free and liposomal anmycin. *Pharm. Res.*, Sttutgart, v.1, p. 462-468, 1996.

WARREL, R.P.; FRANKELL, W.H.; MILLER JR., W.H.; SCHEINBERG, D.A.; ITRI, L.M.; HITTELMAN, W.N.; VYAS, R.; ANFREEF, M.; TAFURI, A.; JAKUBOWSKI, J.; GABRILOVE, J.; GORDON, M.; DMITROVSKY, E. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.324, n. 20, p. 1385-1393, 1991.

WARREL, R.P. Retinoid resistance in acute promyelocytic leukemia: New mechanisms strategies and implications. *Blood.*, New York, v.82, n. 1, p. 1949-1953, 1993.

WEINER, N.; MARTIN, F.; RIAZ, M. Liposome as a drug delivery system. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 15, p. 1523-1554, 1989.

WEINSTEIN, J.N; LESERMAN, L.D. Liposomes as drug carries in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 24, p. 207-133, 1984.

WIN K.Y., FENG S.S.; In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials.*, Guilford, v. 27, p.2285-2291, 2006.

WHITE, G. M. Acne therapy. *Disease-a-month.*, Chicago, v. 45, n. 8, p. 301-332, 1999.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Del Rev.*, Amsterdam, v. 59, p.491–504, 2007.

WOODLE, M. C.; LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys Acta*, Amsterdam, v.1113, p.171, 1992.

YE, YI-QING; YANG, FENG-LIANG; HU, FU-QIANG; DU, YONG-ZHONG; YUAN, HONG; YU, HE-YONG. Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 352, n.1-2, p. 294-301, 2008.

YAP, K.L.; LIU, X. Characterization of the 13-*cis*-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complex by phase solubility, photostability, physicalchemical and computational analysis. *Eur.J. Pharm. Sci.*, Guildford, v. 25, p. 49-56, 2005.

ZANDWIJK, N. V. Chemoprevention in lung carcinogenesis - An overview. *Eur. J. Cancer.*, Oxford, v. 41, p. 1990-2002, 2005.

ZHANG, X., JACKSON, J.K., BURT, H.M. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carrier of taxol. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 132, n.1-2, p.195-206, 1996.

ZHANG, X.F., DONG, X.L., HUANG, H., LEI, J.P., MA, S., LIU, M., W., ZHANG, Z.D. Synthesis, structure and magnetic properties of B₂O₃/H₃BO₃-coated Fe nanocapsules. *Materials Science and Engineering B.*, v. 143, p. 76-80, 2007.

ZOLNIK, B.S.; BURGESS, D.J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 338-344, 2007.

ZUCCARI, G.; CAROSIO, R.; FINI, A.; MONTALDO, P.G.; ORIENTI, I. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *J. Control. Release.*, Amsterdam, v. 103, n.2, p. 369-380, 2005.