

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

NÃO LILACS

28625

**ESTUDOS DA POTENCIALIDADE DO ÁCIDO
5-AMINOLEVULÍNICO NA TERAPIA FOTODINÂMICA
DO CÂNCER DE PELE: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE
LIPOSSOMOS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO**

Maria Bernadete Riemma Pierre

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª Drª Maria Vitória Lopes Badra Bentley

São Paulo
1999

16065

DEDALUS - Acervo - CQ



30100002441

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de São Paulo-
Ribeirão Preto-SP

Pierre, Maria Bernadete Riemma

Estudos da potencialidade do ácido 5 aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele: obtenção e avaliação de lipossomos como sistemas de liberação. São Paulo 1999.

118 p.: il., 30 cm

Bibliografia: p.95-114.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra

1. Ácido 5-aminolevulínico. 2. Lipossomos 3. Terapia Fotodinâmica 4.
Lipídeos do estrato córneo

615.451.3

Maria Bernadete Riemma Pierre

**Estudos da potencialidade do ácido 5-aminolevulínico
na terapia fotodinâmica do câncer de pele: obtenção e
avaliação de lipossomos como sistemas de liberação**

Comissão julgadora

**Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE**

Prof.^a Dr.^a Maria Vitória Lopes Badra Bentley
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco
1ºexaminador

Prof.^a titular Erika Rosa Maria Kedor
2ºexaminador

São Paulo, 15 de dezembro de 1999.

À Deus, que tornou possível a realização deste trabalho, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis, iluminando e depositando em mim a cada dia, confiança e determinação na busca deste objetivo.

À minha família, que sempre esteve presente, me apoiando e incentivando na realização desta conquista e souberam compreender meus momentos de ausência.

À minha mãe, pelo seu amor, dedicação e reconhecimento de meu trabalho.

À Profa. Dra. Maria Vitória Lopes
Badra Bentley, por confiar na
minha capacidade, sempre me
apoiando, incentivando e
orientando com carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

À todos os colegas do LABORATÓRIO DE FOTOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pela colaboração e auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CLÁUDIO TEDESCO do Departamento de Química da FFCLRP, pela colaboração, sugestões e pelos equipamentos utilizados durante este trabalho.

Ao Prof. DR. PIETRO CIANCAGLINI do laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pelo auxílio, amizade e valiosas sugestões.

Aos amigos do LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pelo companheirismo, amizade e alegria mesmo nas horas mais difíceis.

Aos amigos do LABORATÓRIO DE FARMACOTÉCNICA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. DR. JIVALDO DO ROSÁRIO MATOS, do laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito- LATIG- do Instituto de Química da USP- São Paulo, pela sua colaboração nas análises de DSC e pela sua amizade; e A LUCILDES PITTA MERCURI, pelo auxílio, carinho e amizade.

Ao funcionário ANDERSON ROBERTO DE SOUZA, do laboratório de Farmacotécnica, da FCFRP-USP, pela colaboração e auxílio.

À Profa. DRA. JULIANA MALDONADO MARCHETTI, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pela sua amizade, colaboração e incentivo.

Às funcionárias da SESSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO em Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP- São Paulo, Elizabete e Lucilene pelo excelente trabalho prestado.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e bolsa de mestrado.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

..."For me my research represents much more than three lines in my CV. It raised questions which I answered. It was a test which I passed. A battle which I won. It was an experience ingrained with long days and nights, and many tears of frustration. It was a work ethic and way of thinking that will be me forever.

I learnt that "what you do" is not as important as "the way that you do it". I learnt to do everything to the best of my ability, with motivation and enthusiasm.

I learnt how to be flexible and how to communicate, solve problems, manage my time, make decisions and set priorities. I learnt how to start again, and how to work with others and yet be responsible for my own direction.

I also learnt some technical skills. I confess that I did not learn moderation. I still burn with the passion and work long hours. My research was an education in life".

(Jacqueline Rowarth in [www. Newscientist.com](http://www.Newscientist.com), on July 11, 1998)

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ALA	→ ácido 5-aminolevulínico
DSC	→ calorimetria exploratória diferencial
EC	→ estrato córneo
HEC	→ hidroxietilcelulose
LUVs	→ vesículas unilamelares grandes
LUVETs	→ vesículas unilamelares grandes obtidas pela técnica de congelamento-descongelamento seguido por extrusão
MLVs	→ vesículas multilamelares grandes
PpIX	→ protoporfirina IX
REVs	→ vesículas unilamelares obtidas pela técnica de fase reversa
SUVs	→ vesículas unilamelares pequenas
T _c	→ Temperatura de transição de fase
TFD	→ Terapia Fotodinâmica
V _M	→ volume morto
λ	→ comprimento de onda

ÍNDICE

1. Introdução	02
1.1. Terapia Fotodinâmica	02
1.2. Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos	09
1.2.1. Composição dos lipossomos	12
1.2.2. Tipos de lipossomos	13
1.2.1.1. Vesículas grandes multilamelares (MLVs)	14
1.2.1.2. Vesículas pequenas unilamelares (SUVs)	14
1.2.1.3. Vesículas grandes unilamelares (LUVs)	14
1.2.3. Técnicas de obtenção de lipossomos	16
1.2.3.1. Injeção por solvente.	17
1.2.3.2. Sonicação	18
1.2.3.3. Extrusão	18
1.2.3.4. Congelamento-descongelamento	18
1.2.3.5. Evaporação em fase reversa	19
1.2.4. Métodos de avaliação dos lipossomos	21
1.2.4.1. Purificação dos lipossomos	23
1.2.4.2. Microscopia de luz polarizada	24
1.2.4.3. Determinação do tamanho das vesículas	25
1.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	28
1.4. Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos na pele	29
1.4.1. Lipídeos do estrato córneo	31
1.5. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutâneas	35
1.6. Determinação quantitativa do 5-ALA	36
2. Objetivos	39

3. Material e Métodos	41
3.1. Materiais	42
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas	42
3.1.2. Equipamentos e acessórios	42
3.1.3. Animais de laboratório	44
3.2. Métodos	44
3.2.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do 5-ALA	44
3.2.1.1. Reação de derivação	44
3.2.1.2. Obtenção da curva padrão para o 5-ALA	45
3.2.2. Obtenção dos lipossomos de lipídeos do estrato córneo	45
3.2.2.1. Obtenção dos lipossomos por técnica de congelamento-descongelamento (LUVETs) seguido por extrusão	45
3.2.2.2. Obtenção dos lipossomos por técnica de fase reversa (REVs)	46
3.2.3. Avaliação dos lipossomos obtidos	48
3.2.3.1. Caracterização dos lipossomos vazios (LUVETs e REVs) por cromatografia de exclusão em gel.	48
3.2.3.2. Caracterização dos lipossomos contendo 5-ALA (REVs) por cromatografia de exclusão em gel	49
a) Determinação do perfil de eluição do 5-ALA em solução	49
b) Determinação do perfil de eluição dos lipossomos com 5-ALA	49
c) Determinação do volume de etanol para a solubilização das vesículas lipossômicas	50
3.2.3.3. Microscopia de luz polarizada	50
3.2.3.4. Determinação do tamanho das vesículas por Espalhamento Dinâmico da Luz	50
3.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
3.2.4.1. Obtenção dos filmes lipídicos para análise de DSC	51
3.2.5. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutâneas	52

3.2.6. Análise Estatística	55
4. Resultados	56
4.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do 5-ALA	57
4.1.2. Obtenção da curva padrão para o 5-ALA	57
4.2. Avaliação dos lipossomos obtidos	58
4.2.1. Cromatografia de exclusão em gel	58
4.2.1.1. Determinação do volume morto da coluna	58
4.2.1.2. Perfil de eluição dos lipossomos vazios (LUVETs e REVs)	59
4.2.1.3. Determinação do perfil de eluição do 5-ALA em solução	61
4.2.1.4. Determinação do perfil de eluição dos lipossomos (REVs) contendo 5-ALA	63
4.2.1.4.1. Cálculo da porcentagem de 5-ALA encapsulado em lipossomos	63
4.2.1.5. Determinação do volume de etanol para solubilização das vesículas	64
4.2.2. Microscopia de luz polarizada	65
4.2.3. Determinação do tamanho das vesículas por Espalhamento Dinâmico da Luz	68
4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	69
4.4. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutâneas	72
4.4.1. Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea	72
4.4.2. Estudos <i>in vitro</i> de retenção cutânea	73
5. Discussão	76
6. Conclusões	92

7. Referências Bibliográficas	95
8. Resumo	115
9. Abstract	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Fotodinâmica

A incidência de câncer cutâneo têm aumentado rapidamente em populações brancas durante as últimas décadas, sendo a exposição excessiva ao sol sua principal causa (KATSAMBAS & NICOLAIDOU, 1996).

A depleção da camada de ozônio resulta em um aumento na radiação UV que atinge a superfície da terra e deve contribuir para o aumento da incidência do câncer de pele. Este aumento associado à exposição da luz solar pode ser devido, em parte, à imunossupressão induzida pela radiação UV. Estudos concluíram que há relação entre a depleção da camada de ozônio e o aumento na radiação UV na biosfera, resultando em um aumento da incidência de câncer de pele, principalmente não- melanoma. Uma diminuição de 1% na camada de ozônio pode elevar os índices de câncer de pele não-melanoma em torno de 2%; a porcentagem para melanomas é bem menor (0,6%) (URBACH, 1997).

Os **melanomas** têm origem nas células da pele produtoras de pigmento, os melanócitos; já os carcinomas ou câncer de pele **não- melanoma** são originados dos queratinócitos, células da epiderme que produzem a camada córnea.

Os cânceres de pele **não- melanoma** mais comuns são: *Carcinoma de Células Basais* e *Carcinoma de Células Escamosas*. Estes ocorrem quase exclusivamente em partes do corpo expostas ao sol e em pessoas que se queimam facilmente, o risco é maior. Os melanomas são tumores de extrema malignidade pois as metástases ocorrem rapidamente, já os não- melanomas, não produzem metástases.

Os tumores cutâneos (melanomas e não- melanomas) são evidenciados por lesões sólidas, consistentes e indolores (BEHELLI & CURBAN, 1988). Os principais tipos de melanoma são: melanoma maligno Lentigo, melanoma nodular e melanoma acrolentiginoso. Alguns melanomas ocorrem em partes do corpo que não são regularmente expostas ao sol, mas que receberam grande dose de luz solar num curto período (VAN DER LEUN, 1996).

O aumento da incidência desta doença têm estimulado a pesquisa de novas modalidades terapêuticas. Os métodos convencionais utilizados no tratamento de tumores não-melanoma superficiais incluem cirurgia (excisão), crioterapia, eletrodissecação, quimioterapia tópica e radioterapia (MARTIN et al., 1995).

Nos últimos anos a potencialidade do uso de substâncias fotossensibilizantes como agentes no tratamento fotoquímio-terápico de tecidos tumorais vêm sendo extensivamente investigada (DOUGHERTY & POTTER, 1991; KODERHOLD et al., 1996; OCHSNER, 1997 a; FRITISH et al., 1998), definindo-se uma nova modalidade terapêutica denominada **Terapia Fotodinâmica (TFD)**, a qual têm apresentado excelentes resultados. No geral, a TFD refere-se a ativação de um fotossensibilizante pela luz para gerar intermediários de oxigênio altamente reativos. Estes intermediários oxidam irreversivelmente componentes celulares essenciais, causando danos ao tecido e apoptose. A TFD vem sendo usada para o tratamento de vários tipos de câncer de pele e outras indicações. Para o tratamento de tumores do trato gastrointestinal, cerebral ou broncopulmonares, os compostos são administrados oralmente ou intravenosamente. Para o tratamento de tumores de pele, endometriais e carcinomas de bexiga, os fármacos são aplicados na maioria das vezes, topicamente.

Na dermatologia, a TFD têm sido empregada primariamente no tratamento de neoplasias cutâneas malignas e consiste da administração de fármacos fotossensibilizáveis (CAIRNDUFF et al., 1994; WOLF & KERL, 1995; SCHUTTMAKER et al., 1996). Esta técnica se baseia na foto-oxidação induzida dos materiais biológicos pela ação destes fármacos fotossensibilizantes (PASS, 1993; OCHSNER, 1997 b). Na primeira etapa deste tratamento, a substância fotossensibilizante é introduzida nos tecidos por meio de um veículo e, na segunda etapa, os tecidos contendo o corante fotossensibilizador são submetidos à irradiações com luz monocromática, usualmente no comprimento de onda máximo de absorção do fotossensibilizador.

Estudos farmacocinéticos utilizando sensibilizadores marcados comprovam que, tanto os tecidos normais quanto os neoplásicos, apresentam capacidade de reter estas substâncias, fato que justifica os esforços empregados na obtenção de novos compostos que possuam especificidade pelo tecido carcinogênico (JORI, 1996).

Um grande número de fotossensibilizantes têm sido testados para a TFD em experimentos *in vitro* e *in vivo*. As principais classes de fotossensibilizantes são (BOYLE & DOLPHIN, 1996; FRITISH et al., 1998):

- Porfirinas: derivado da hematoporfirina, diematoporfirina éter/éster;
- Precursores da porfirina: ácido 5-aminolevulinico e seus ésteres;
- Ftalocianinas: ftalocianina zinco II e naftalocianina silicone;

- Porfíricos;
- Clorinas: monoaspartil clorina e ϵ , diaspartil clorina e ϵ ;
- Feoforbides: Feoforbides a, bacteriofeoforbide;

Nos estudos iniciais de aplicação da TFD, o fotossensibilizante era administrado via intravenosa, porém, devido ao aparecimento de reações sistêmicas quando da exposição do paciente ao sol durante o período de tratamento, este procedimento apresentou vários inconvenientes.

A primeira substância fotossensibilizante empregada no tratamento de câncer de pele foi o derivado da hematoporfirina (DOUGHERTY, 1993). Como muitas outras porfirinas administradas intravenosamente, a hematoporfirina causa fotossensibilidade, havendo a necessidade de medidas fotoprotetoras por um período aproximado de 4 a 6 semanas. Nesta TFD padrão, podem ocorrer reações inflamatórias e efeitos vasculares, incluindo danos às células endoteliais, agregação das células sangüíneas, diminuição do fluxo sangüíneo, etc. Um procedimento alternativo para o tratamento de tumores malignos superficiais baseado na TFD, inclui a *aplicação tópica* de fármacos fotossensibilizáveis, apresentando a vantagem de ser bastante seletivo comparado à administração por via intravenosa.

Atualmente, o fármaco sob maior investigação para TFD tópica tem sido o **ácido 5- aminolevulínico (5-ALA)**. A terapia Fotodinâmica usando 5-ALA, aplicado topicamente, têm mostrado ser altamente eficiente no tratamento de tumores cutâneos pela formação de porfirinas endógenas como fotossensibilizantes.

MALIK & LUGACI (1987) foram os primeiros a usarem a fotossensibilização de células *in vitro* baseada em 5-ALA. KENNEDY & POTTIER (1992) empregaram clinicamente a TFD 5-ALA, no tratamento de carcinoma baso celular superficial, onde o fármaco aplicado topicamente foi utilizado para induzir a síntese de porfirinas endógenas da via biossintética do heme evitando, assim, a fotossensibilização generalizada da pele. O estudo realizado mostrou resultados favoráveis no tratamento de alguns tumores cutâneos superficiais tipo *não melanoma* e hoje, a ALA-TFD está sendo usada com sucesso no tratamento de uma variedade de alterações cutâneas neoplásicas e não- neoplásicas.

O 5- ALA já vem sendo estudado ao nível de aplicação tópica como um **pró-fármaco** associado a TFD (KENNEDY & POTTIER, 1992; SZEIMIES et al., 1996; ABELS et

al.,1997; FINK-PUCHES et al., 1998; WANG et al., 1999). Após sua aplicação ocorre a formação de uma substância altamente fluorescente e fotodinamicamente ativa, a **Protoporfirina IX (PpIX)**, a qual é sintetizada via ciclo heme, sendo o ALA seu precursor (**Figura 1**).

A PpIX já é bem conhecida como um fotossensibilizante, sendo associada à extrema fototoxicidade observada em pacientes com porfirias (BATLLE, 1993). A PpIX é altamente insolúvel em água e difícil de administrar em meio fisiologicamente compatível (GOFF et al., 1992). Naturalmente, a produção do ALA na via biossintética do heme é controlada por mecanismo de "feedback" negativo, onde a presença do heme livre inibe a sua síntese (KENNEDY, 1990). Entretanto, o controle de "feedback" ALA-heme pode ser desviado pela administração de ALA exógeno.

Quando um excesso de ALA "exógeno" é aplicado topicamente, esta inibição por "feedback" pode ser evitada, levando a produção de porfirinas endógenas, principalmente a PpIX, que se acumulam no tecido canceroso, resultando em fotossensibilização *in vitro* e *in vivo* quando estimuladas fotodinamicamente pela incidência, no tecido, de uma fonte de luz de comprimento de onda na região do visível (PENG et al., 1995; KRAMMER & UBERRIEGLER, 1996; GIBSON et al., 1997)

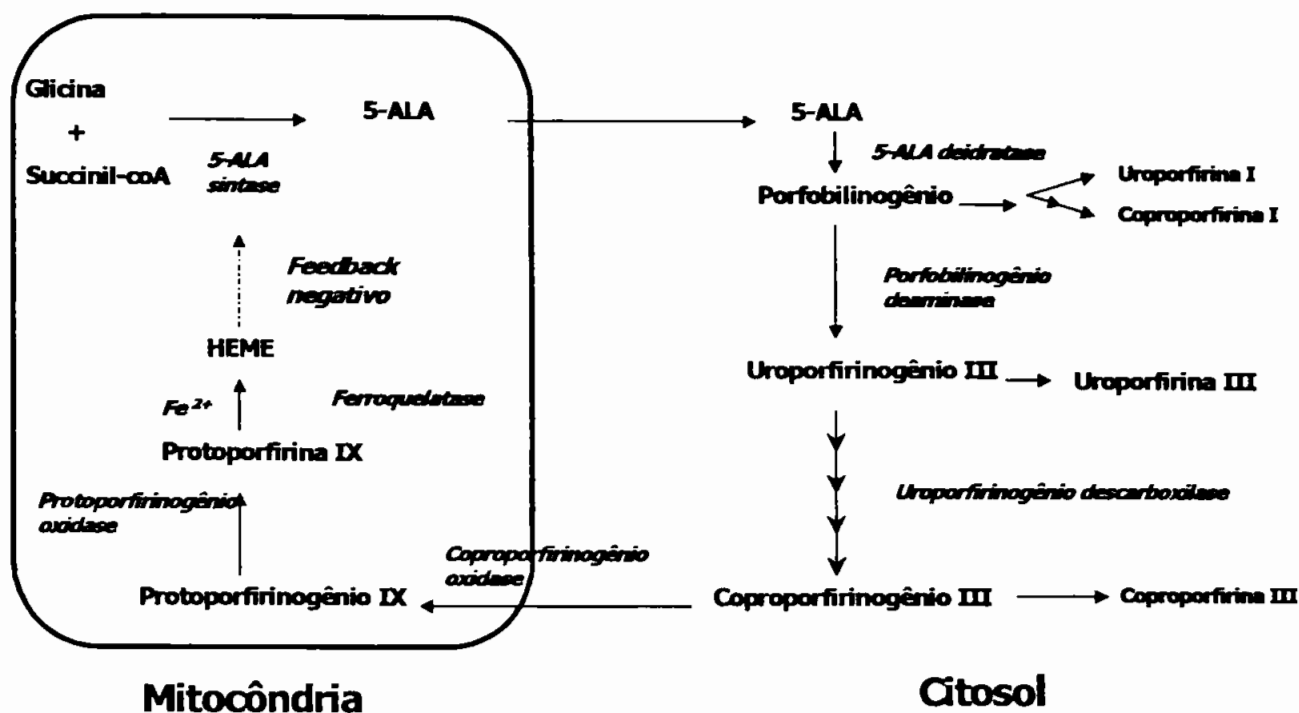


Figura 1. Via biossintética simplificada do grupo heme. O controle de *Feedback* está indicado pela linha tracejada (PENG et al., 1997).

As porfirinas endógenas causam fotossensibilização letal nas células cancerosas. A luz aplicada (faixa de 400-640 nm) ativa a PpIX, que é excitada a um nível de energia mais alto. O excesso de energia é transferido para o oxigênio tecidual (o estado triplete), o qual é então transformado para o estado singlete. O oxigênio singlete é um agente altamente citotóxico, de vida curta e que causa a necrose do tumor (BONNET & CHARALAMBIDES, 1980; OCHSNER 1997 b).

Em estudo recente foram comparadas as mudanças estruturais em células PAM 212, após tratamento fotodinâmico com o 5-ALA e com um derivado da hematoporfirina, o PHOTOSAN[®]. Os efeitos da TFD foram investigados após diferentes tempos de incubação, doses de luz e períodos de tratamento. Concluiu-se que, para as mesmas condições de exposição à TFD, o dano primário induzido pelo 5-ALA é restrito à mitocôndria, enquanto a citotoxicidade induzida por PHOTOSAN[®] foi mediada por dano no sistema lisossomal (RADAKOVIC-FIJAN et al., 1999).

Embora vários outros fotossensibilizantes venham sendo utilizados na TFD clínica, a ALA-FTD têm sido o campo mais ativo na pesquisa de TFD nos últimos cinco anos. O 5-ALA é o único agente para TFD em desenvolvimento clínico atual que é um precursor bioquímico de um fotossensibilizante. Tópicamente aplicado, o 5-ALA passa prontamente através da epiderme com estrato córneo (EC) anormal (tecido canceroso), mas não através da epiderme normal, permitindo a fotossensibilização altamente seletiva de tumores da pele. Isto evita o efeito generalizado de sensibilização da pele como ocorre na TFD padrão (GOFF et al., 1992; KENNEDY & POTTIER, 1992). Os danos causados a pele normal são mínimos (STENDER et al., 1997).

O 5-ALA é uma substância altamente hidrofílica e que não penetra facilmente através da pele intacta ou através das membranas celulares (PENG et al., 1997). Quando é aplicado tópicamente, em tumores cutâneos, a seletividade para o tumor é decorrente do aumento da permeabilidade da pele tumoral (RICK et al., 1997).

A fotossensibilidade após a aplicação tópica de ALA geralmente desaparece dentro de 24 horas, limitando-se apenas a uma inflamação leve no local da aplicação. Os efeitos terapêuticos são, portanto, devidos à uma citotoxicidade direta sobre o tumor, não sendo observados danos vasculares nas biópsias após tratamento. Isto faz do ALA-TFD tópico uma modalidade de tratamento prática, que, com poucos anos de introdução, é usada experimentalmente em muitos centros clínicos no mundo (GOFF et al., 1992).

Até o momento, o 5-ALA tem se mostrado também eficaz para o tratamento de neoplasmas cutâneos, queratose solar (FINK-PUCHES et al., 1997) e tumores de pele não-melanoma como: carcinomas de células basais superficiais e carcinomas de células escamoso (FINK-PUCHES et al., 1998; GROB & SCHIMID-GRENDELMEIER, 1998) bem como para o tratamento tópico de doenças não tumorais como psoríase (COLLINS et al., 1997), acne, alopecia aerata, verruga viral, etc. (FRITSCH et al., 1998), condiloma acuminado (ROSS et al., 1997) e micose fungóide e ainda em avaliações para o diagnóstico de tumores de pele, de bexiga, do trato gastrointestinal e do pulmão (STENDER & WULF, 1996; STRINGER et al., 1996).

O mecanismo de captação preferencial intratumoral dos precursores e fotossensibilizantes ainda não está completamente elucidado. No caso do 5-ALA, o transporte ativo é a explicação mais provável, mas a difusão passiva pode também ser atuante. Antes da administração do 5-ALA, tanto o tumor quanto a pele adjacente normal apresentam concentrações similares de porfirinas, existindo, porém, um padrão diferente de metabólitos da porfirina entre os mesmos. Antes da aplicação de 5-ALA o metabólito principal encontrado na pele normal é a protoporfirina e uroporfirina; e, no tumor, além destas, grandes quantidades de coproporfirina são encontradas. Estes resultados sugerem que um acúmulo seletivo de porfirinas deve ser devido ao aumento da captação de 5-ALA e da síntese do heme, bem como da reduzida atividade da ferroquelatase no tumor (ABELS et al., 1997; FRITSCH et al., 1997).

A adição de 5-ALA exógeno leva ao acúmulo de PpIX devido a limitada capacidade da ferroquelatase. A atividade desta enzima é mais baixa em alguns tumores, de forma que PpIX acumula-se com algum grau de seletividade nos mesmos (PENG et al., 1997). Apesar desta seletividade, o efeito a longo prazo em alguns tipos de tumores grandes, tem mostrado resposta pequena para a TFD-5ALA tópica, mesmo após várias sessões de tratamento, devido à penetração insuficiente e não homogênea do 5-ALA e a uma irradiação de luz não adequada. Outros fatores importantes são que, alguns tumores apresentam-se cobertos por uma camada epitelial normal, o que reduz a penetração do 5-ALA e também a presença de ilhas de células tumorais resistentes à penetração do 5-ALA.

Um outro aspecto a ser considerado na TFD associada ao 5-ALA é que tumores de pele nodulares com espessura maior que 2-3 mm são refratários a esta terapia porque o ALA não penetra nesta profundidade (ORESTEIN et al., 1997; FINK-PUCHES et al., 1998).

Para melhorar a eficácia de ALA-TFD, particularmente em lesões espessas, várias opções tem sido investigadas, tais como, o uso de promotores que aumentam a taxa de distribuição do ALA na pele ou de quelantes de ferro como 1,10 fenantrolina e desferroxamina que aumentam a produção de PpIX, etc, (ROBINSON et al., 1998).

Assim, várias tentativas têm sido realizadas com o intuito de melhorar a eficácia do tratamento, como por exemplo, o fracionamento das sessões de TFD em 2 a 4 ciclos de irradiação (VAN DER VEEN et al., 1997; CURNOW et al., 1999). O uso

combinado de hipertermia, de agentes quimioterápicos, de compostos vasoativos, de substâncias biorredutivas, do fator α de necrose tumoral e da glicose, melhoraram eficácia do tratamento. A aplicação de múltiplos fotossensibilizantes e de irradiações com múltiplos comprimentos de onda também favoreceram a terapia (FRITISH et al., 1998). Outros modos ou períodos mais longos de aplicação do 5-ALA, assim como a pesquisa de outros veículos para o 5-ALA e a iontoforese têm sido objeto de pesquisa (FINK-PUCHES et al., 1997; FINK-PUCHES et al., 1998; ROBINSON et al., 1998; DE ROSA et al., 1999)

1.2. Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos

Os lipossomos são vesículas globulares submicroscópicas com diâmetro médio entre 0,25 e 5 μm , formados espontaneamente quando fosfolipídeos ou lipídeos são dispersos em um meio aquoso, formando sistemas multi e unilamelares.

Os lipossomos têm mostrado grande potencial como sistemas de liberação de fármacos. Muitas moléculas podem ser incorporadas nestas estruturas e administradas por diferentes vias. Devido ao seu alto grau de biocompatibilidade, os lipossomos foram inicialmente considerados como sistemas de liberação para uso intravenoso. Já é evidente que também podem ser usados para liberação de fármacos por outras vias (EGBARIA & WEINER, 1993).

De modo similar às células, os lipossomos podem aprisionar substâncias hidrossolúveis em seu interior, bem como substâncias lipofílicas e anfifílicas em suas membranas, onde estas são posicionadas para serem transferidas para outras membranas biológicas (**Figura 2**).

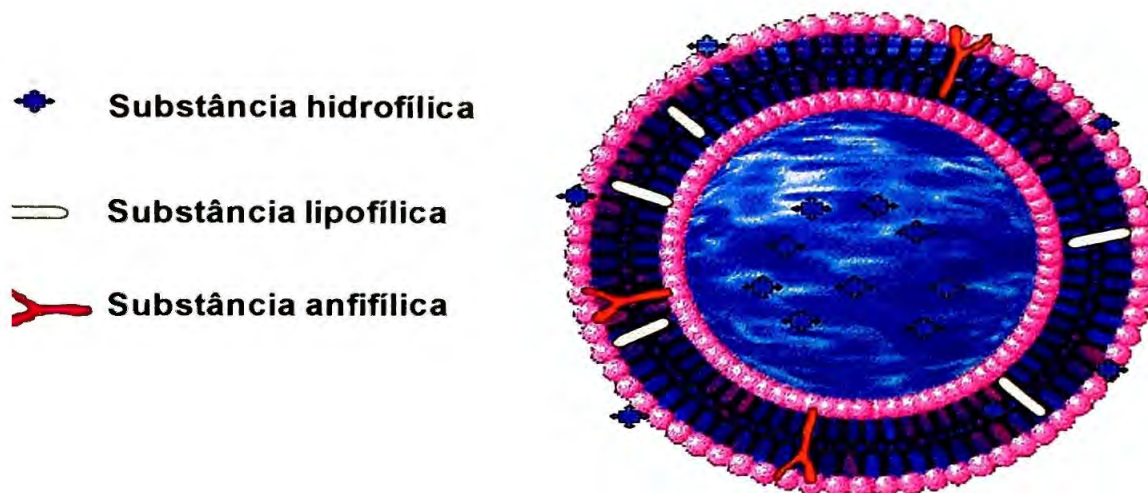


Figura 2: Representação esquemática de uma vesícula grande unilamelar (LUV)

Os recentes avanços na ciência e na química resultaram na síntese de muitos compostos com atividades farmacológicas potenciais, porém, a maioria destes fármacos têm falhado em seu potencial clínico; como por exemplo, pode-se citar os fármacos anti- câncer, que são altamente citotóxicos e não seletivos para as células tumorais.

Os lipossomos estão sob intensa investigação como carreadores de fármacos com o objetivo de melhorar a liberação de agentes terapêuticos. A formulação nesta forma permite melhorar os índices terapêuticos de vários fármacos, principalmente através de sua biodistribuição (GREGORIADIS, 1976; JULIANO & DAUD, 1989; REDDI, 1997).

O uso de lipossomos para a veiculação de fármacos é uma possibilidade interessante, uma vez que são constituídos de componentes lipídicos biodegradáveis, em uma configuração espontânea em bicamada, cuja composição pode variar em uma extensão significativa. Este sistema de liberação torna possível a utilização de doses mais altas do fármaco com efeitos colaterais reduzidos, mantendo a eficácia desejada (HOEBEKE, 1995).

As principais vantagens da veiculação de fármacos em lipossomos incluem (SHARMA & SHARMA, 1997):

- (i) **Proteção do organismo contra substancias irritantes.** Uma vez que os lipossomos não possuem propriedades irritantes, podem ser úteis para reduzir a irritação causada por fármacos administrados pela via parenteral, intramuscular ou até mesmo tópica. Alguns fármacos hidrofóbicos como a Ciclosporina e a Anfotericina B são formulados com tensoativos e co-solventes orgânicos para administração sistêmica em humanos. Estes solubilizantes causam toxicidade nas doses necessárias para dissolver o fármaco. Assim, uma alternativa a este problema é o uso de sistema lipossômico, os quais podem ser obtidos com lipídeos relativamente não tóxicos, não imunogênicos e biodegradáveis, além da capacidade de encapsular fármacos de diferentes solubilidades. Além disto, este tipo de formulação é bem tolerada pelo organismo;
- (ii) **Liberação sustentada do fármaco:** O efeito terapêutico de fármacos encapsulados em lipossomos pode ser drasticamente diferente daquele do fármaco livre. No caso de fármacos que são rapidamente eliminados do organismo e requerem concentrações plasmáticas a níveis terapêuticos por um período prolongado, os lipossomos podem atuar como uma forma de liberação sustentada *in vivo*. A formulação em lipossomos de liberação sustentada é possível, estendendo-se a meia-vida de circulação e otimizando-se assim uma razão de liberação *in vivo* (ALLEN & MOASE, 1996);
- (iii) **Vetorização:** Os fármacos usados no tratamento do câncer apresentam baixo Índice Terapêutico (IT) e podem ser altamente tóxicos para os tecidos normais. A toxicidade destes fármacos pode ser minimizada pela diminuição da liberação destes para os órgãos normais. Quando lipossomos contendo o fármaco é injetado intravenosamente, eles são pouco captados pelos tecidos como coração, rim e trato gastrintestinal, os quais são os maiores sítios para os efeitos colaterais tóxicos de uma grande variedade de fármacos antineoplásicos. Assim, os lipossomos podem melhorar o IT pela alteração na biodistribuição do fármaco. O fármaco encapsulado em lipossomos, pode atingir os tecidos alvo e, após alguma interação subsequente, é liberado no interior das células, evitando o contato com o sangue e os líquidos extracelulares. Desse modo, o fármaco pode

ser direcionado no sítio de ação desejado (*Vetorização*). A liberação de fármacos sítio-específicos podem ser melhoradas pelo encapsulamento destes em lipossomos, os quais são direcionados à células específicas, devido à presença de ligantes ou anticorpos na sua superfície, as quais se ligam na superfície celular de alvos específicos (ALLEN & MOASE, 1996; HARASHIMA & KIWADA, 1996).

1.2.1. Composição dos lipossomos.

Segundo VEMURI & RODES (1995), os lipossomos são compostos basicamente por:

- (i) **Fosfolípidos ou lípidos:** Uma grande variedade de fosfolípidos ou lípidos naturais e sintéticos são adequados para a preparação de lipossomos. Os fosfolípidos mais abundantes nas plantas e animais são a fosfatidilcolina (lecitina da gema de ovo e do óleo de soja) e a fosfatidiletanolamina, que constituem também a maior parte estrutural das membranas biológicas sendo, assim, os mais utilizados na preparação de lipossomos. A estrutura geral de um fosfolípido é composta por um esqueleto central de glicerol, ácidos graxos de cadeia longa e um grupo fosfato. A parte fosfatídica consiste de ácidos graxos que formam uma ligação éster. Os ácidos graxos diferem com relação ao número de átomos de carbono na cadeia e ao grau de insaturação. As diferenças na porção graxa levam a mudanças nas características dos fosfolípidos.

- (ii) **Esteróides:** O colesterol e seus derivados têm sido utilizados na preparação de lipossomos com a finalidade de melhorar as características da bicamada para a liberação de fármacos *in vivo*, uma vez que: (1) melhora a fluidez da bicamada, (2) reduz a permeabilidade a moléculas solúveis em água através da membrana, diminuindo seu vazamento (3) melhora a estabilidade da bicamada na presença de fluidos biológicos como sangue e plasma. Os lipossomos sem colesterol tendem a reagir com as proteínas do sangue, as quais podem desestabilizar sua estrutura e reduzir sua utilização como sistemas de liberação. As moléculas de

colesterol se orientam entre as moléculas de fosfolípídeos ou lipídeos com seu grupo hidroxila posicionados em direção à fase aquosa e o anel tricíclico entre os carbonos das cadeias acilas graxas. Desse modo, o colesterol se encaixa nos espaços vazios entre as moléculas lipídicas da bicamada, ancorando-as mais fortemente em sua estrutura.

- (iii) **Outras substâncias:** Além dos componentes estruturais, agentes anti-oxidantes tais como α -tocoferol, butilhidroxitolueno (BHT) e o butilhidroxianisol (BHA) são utilizados para prevenir a oxidação das ligações insaturadas. Sais de amônio quaternário com uma ou duas cadeias de hidrocarbonetos longas (cloreto de dioctadecildimetil-amônio ou DODAC) podem formar lipossomos, sendo os últimos mais estáveis.

1.2.2. Tipos de lipossomos.

Numerosos procedimentos têm sido desenvolvidos para preparar lipossomos. Em vista dos vários métodos, há também várias classes de lipossomos. Eles podem ser classificados pelo *número de bicamadas* presentes nas vesículas, pelo seu *método de preparação* ou pelo seu *tamanho*. Quando os lipossomos são descritos baseados no *número de bicamadas*, são chamados de **Vesículas Unilamelares (ULV)** ou **Vesículas Multilamelares (MLV)**. Baseadas no método de preparação, tem-se as vesículas obtidas por **Evaporação em Fase Reversa (REV)** e as vesículas **French Press (FPV)**. Finalmente, quando são descritos baseados no seu *tamanho*, podem ser chamados de **Vesículas Grandes Unilamelares (LUV)** e **Vesículas Pequenas Unilamelares (SUV)**.

A descrição de lipossomos pela lamelaridade e pelo tamanho são mais comuns do que pelo seu método de preparo.

1.2.1.1. Vesículas Grandes Multilamelares (MLVs)

As MLVs possuem tamanhos na faixa de 0,1 a 10 μm , podendo consistir de duas ou mais lamelas concêntricas. O volume aquoso aprisionado por tais vesículas situa-se em torno de 0,5 a 4 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$. A taxa de encapsulamento pode variar de 5 a 15% (SZOCKA & PAPAHADJOPOULOS, 1978). As MLVs são mais adequadas para o encapsulamento de compostos lipofílicos devido à presença de várias lamelas lipídicas, nas quais as substâncias lipofílicas podem interagir. A principal desvantagem deste tipo de vesícula é a heterogeneidade com relação ao tamanho (LASIC, 1988).

1.2.1.2. Vesículas Pequenas Unilamelares (SUVs)

As SUVs são muito pequenas, com tamanho entre 0,025 e 0,05 μm . Como o volume aquoso aprisionado é pequeno ($< 0,5 \mu\text{L}/\mu\text{mol}$), a porcentagem de encapsulamento para solutos é baixa ($< 1\%$), principalmente para fármacos hidrossolúveis e macromoléculas (YATVIN & LELKES, 1982). Esta é uma das principais desvantagens das SUVs, além destas serem termodinamicamente instáveis e suscetíveis de agregação e fusão. Estes tipos de vesículas são bastante adequadas quando destinadas à administração endovenosa. Podem ser obtidas pelo método de injeção e por sonicação (NEW, 1989 a).

1.2.1.3. Vesículas Grandes Unilamelares (LUVS).

As LUVs possuem somente uma lamela lipídica e atingem diâmetros na faixa de 0,1 μm a 1 μm . Devido ao tamanho, uma porcentagem alta de captura de fase aquosa pode ser alcançada, em torno de 10 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ (YATVIN & LELKES, 1982). Assim, grandes volumes de fase aquosa podem ser aprisionados no seu interior, sendo maior a eficiência de encapsulação, comparada às MLVs. Estas vesículas são mais adequadas para o encapsulamento de solutos hidrofílicos e macromoléculas (NEW, 1989 a). Uma outra vantagem é a economia de lipídeos, resultando em maiores quantidades do soluto

encapsulado por quantidade de lipídeos (mg do fármaco/mg de lipídeo). Outras diferenças importantes entre LUVs e MLVs podem significar vantagens adicionais.

A Figura 3 representa os tipos de lipossomos de acordo com suas respectivas lamelaridades e tamanhos.

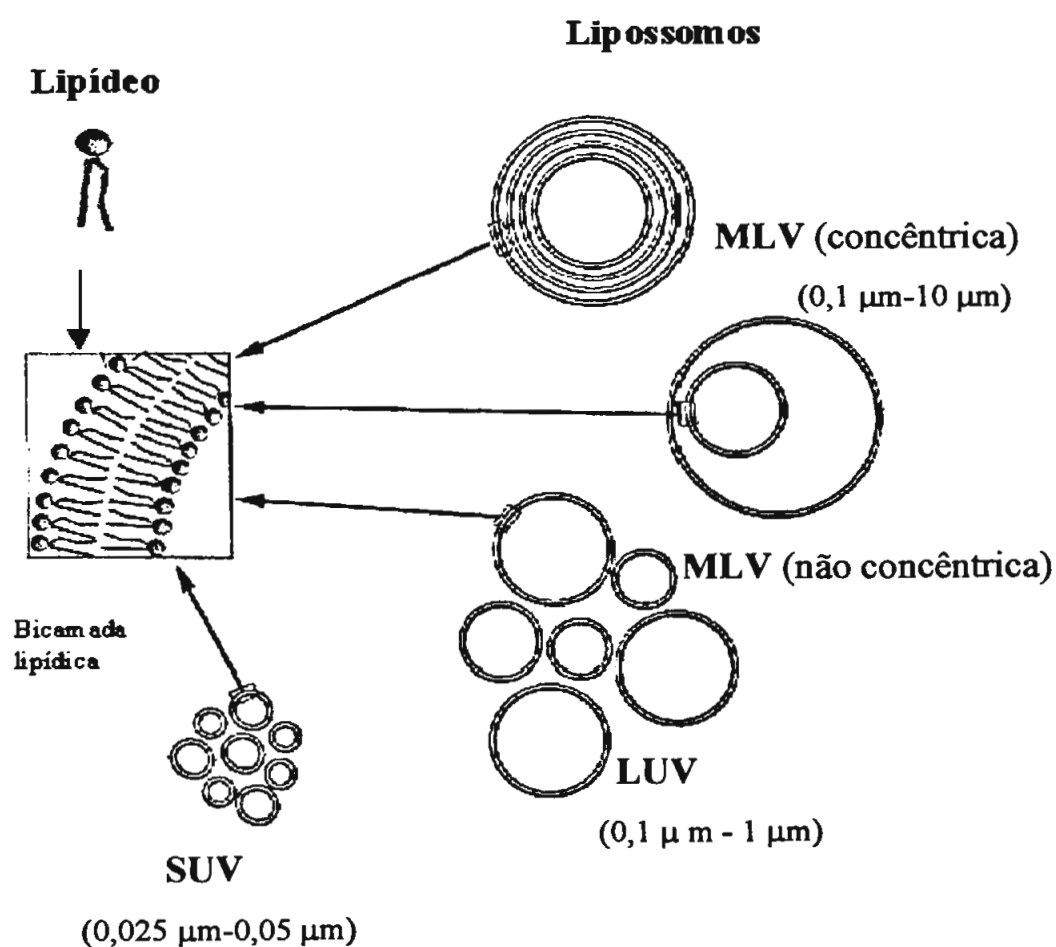


Figura 3. Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas: MLV (vesículas grandes multilamelares); LUV (vesícula grande unilamelar); SUV (vesícula pequena unilamelar).

1.2.3. Técnicas de Obtenção.

O método mais comum para a obtenção de lipossomos é a hidratação do filme lipídico, primeiramente descrita por BANGHAM et al. (1965). A mistura de lipídeos é inicialmente dissolvida em solvente orgânico, com posterior remoção deste sob corrente de nitrogênio a fim de evitar a degradação lipídica. Após a secagem, obtêm-se um filme lipídico no fundo do balão, que será posteriormente disperso em meio aquoso ou em solução tampão adequada, produzindo vesículas multilamelares (MLVs) de diferentes tamanhos (Figura 4).

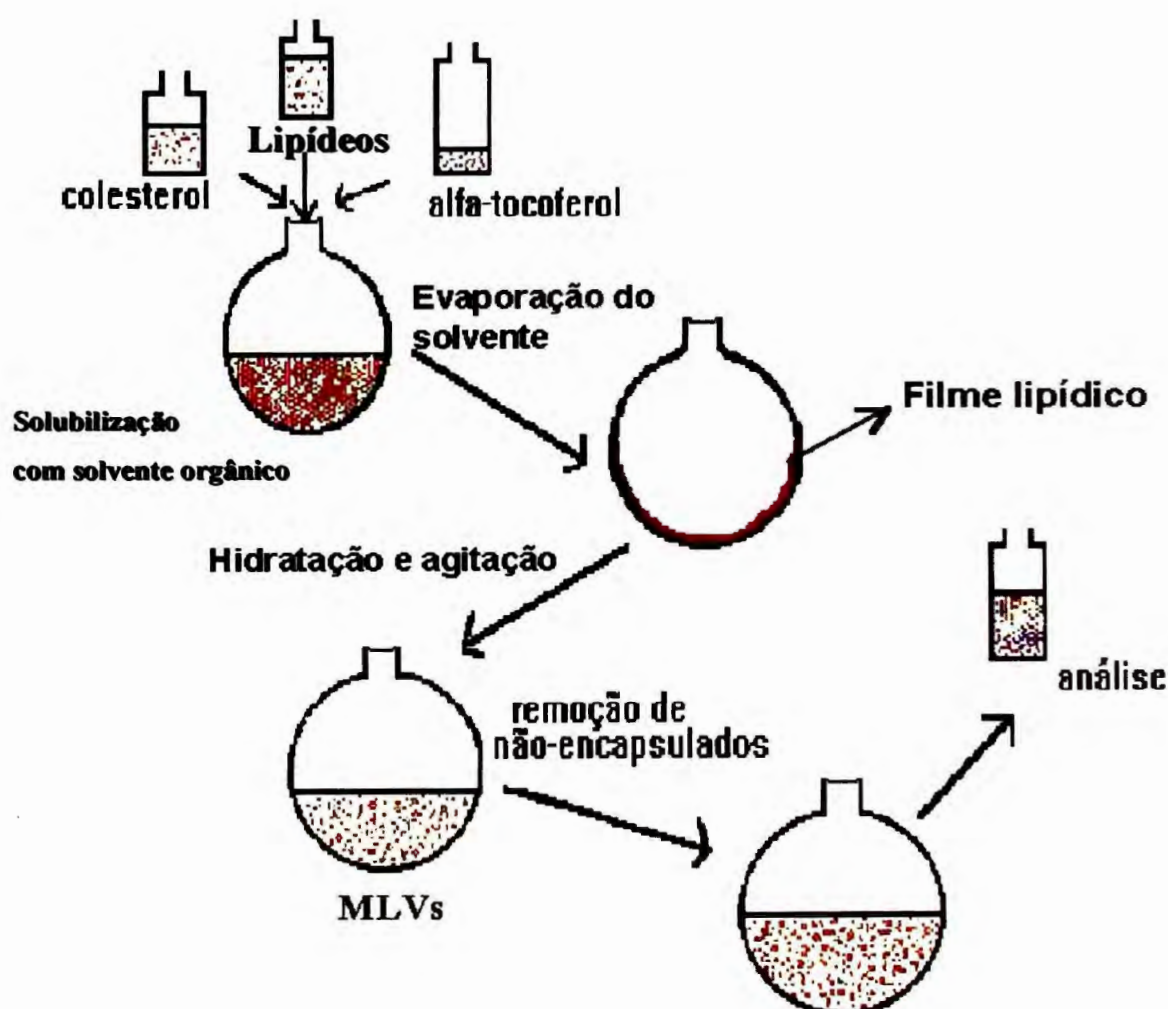


Figura 4. Esquema do método da hidratação do filme lipídico para obtenção da MLVs.

Após a preparação das vesículas multilamelares pela hidratação do filme lipídico seco, é possível continuar processando os lipossomos para modificar seu tamanho e também outras características. Muitos métodos têm sido usados para reduzir o tamanho das MLVs tais como: dispersão mecânica (sonicação e extrusão), microemulsificação e o uso de "French Pressure cell". Um segundo grupo de métodos é usado para aumentar o volume de aprisionamento dos lipídeos hidratados e/ou reduzir a lamelaridade das vesículas formadas, empregando procedimentos como: congelamento-secagem, congelamento-descongelamento ou indução da vesiculação por íons ou alteração de pH (NEW, 1989 a). Tem-se ainda a técnica de *dispersão por solvente (injeção)*, um método particular onde as vesículas pequenas unilamelares (SUVs) são obtidas diretamente, não originando inicialmente as MLVs.

1.2.3.1. Injeção por solvente

O método envolvendo a técnica de injeção baseia-se na metodologia descrita por BATZRI & KORN (1973). Neste método ocorre a injeção rápida de uma solução etanólica dos lipídeos através de microseringas em uma solução salina aquosa contendo o material a ser encapsulado. A força da injeção é geralmente suficiente para garantir uma mistura completa, pois o etanol é diluído quase que instantaneamente na água e as moléculas de fosfolipídeos estão dispersas em todo o meio. Na interface entre a fase orgânica e o meio aquoso, os lipídeos se alinham em monocamadas, as quais formam as bases para a metade da bicamada do lipossomo. Os métodos empregando dispersão por solvente se enquadram em três categorias: (i) o solvente orgânico é miscível com a fase aquosa; (ii) o solvente orgânico é imiscível com a fase aquosa em excesso e (iii) o solvente orgânico está em excesso e é novamente imiscível com a fase aquosa.

Estes procedimentos fornecem vesículas pequenas unilamelares de diâmetro médio de 0,025 μm (SUVs).

1.2.3.2. Sonicação.

O método da sonicação reduz as vesículas lipídicas ao menor tamanho possível (SUVs). No geral, as vesículas lipídicas hidratadas (suspensão das vesículas multilamelares obtidas inicialmente) são expostas à irradiação ultra-sônica através do uso de uma sonda ou ponta de titânio ou por um banho desintegrador ultra-sônico. A ponta de titânio é empregada para suspensões que requerem alta energia num pequeno volume, por exemplo, altas concentrações de lipídeos ou uma fase aquosa viscosa; enquanto o banho é mais adequado para grandes volumes de lipídeos diluídos. Durante o processo, é necessário que os lipídeos sejam sonicados acima das suas temperaturas de transição (T_c), pois a quebra das vesículas não ocorre eficientemente abaixo desta temperatura. Uma desvantagem é que resíduos de titânio podem permanecer na suspensão de lipossomos resultante, sendo necessário um método adicional para separação destes (NEW, 1989 a).

1.2.3.3. Extrusão

Nesta técnica, a dispersão contendo vesículas de diversos tamanhos passa através de filtros de membrana de policarbonato com tamanho de poro definido, sob altas pressões de nitrogênio (100 a 800 psi) em um extrusor. Na prática, a maioria dos métodos de preparação de vesículas resultam em uma população razoavelmente heterogênea, com uma maior população na faixa de menor tamanho (SZOCKA & PAPAHDJOPoulos, 1980).

1.2.3.4. Congelamento-descongelamento.

Este método pode ser incorporado à técnica de preparo dos lipossomos, na fase anterior à extrusão (DOWNING et al., 1993). O processo de congelamento-descongelamento é usado para romper e reunir as vesículas lipídicas hidratadas, ou seja, os lipossomos rompem-se, fundem-se e aumentam significativamente em tamanho,

tanto que seu volume de encapsulamento poderá aumentar para 30% do volume total da suspensão. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que os lipossomos formados são unilamelares (NEW, 1989 a). Este fato está associado a grandes mudanças na morfologia dos lipossomos, detectadas por microscopia eletrônica de cortes congelados.

1.2.3.5. Evaporação em Fase reversa.

Lipossomos preparados por este método foram desenvolvidos por SZOKA & PAPAHDJOPOULOUS (1978) empregando emulsões água/óleo. Já que o processo envolve uma emulsão a qual é o reverso da emulsão padrão óleo/água e também porque o novo passo na preparação é a remoção do solvente da emulsão por evaporação, esta técnica foi denominada Evaporação em Fase Reversa.

As vesículas preparadas por esta técnica são denominadas REV's e segundo os autores, encapsulam uma alta porcentagem de fase aquosa. As vesículas obtidas apresentam um diâmetro médio em torno de 0,5 μm . Uma fração substancial de fase aquosa (acima de 65% a baixa concentração de sal) pode ser encapsulada nestas vesículas, podendo-se encapsular grandes macromoléculas com alta eficiência. É uma técnica bastante simples, que apresenta vantagens únicas para o encapsulamento de materiais hidrossolúveis (SZOKA & PAPAHDJOPOULOUS, 1978).

Primeiramente, os lipídeos são dissolvidos em solventes orgânicos como o éter dietílico, o éter diisopropílico ou misturas de solventes orgânicos tais como diisopropiléter/ clorofórmio (1:1) ou fluorocarbonos de baixo ponto de ebulição. O material aquoso é adicionado diretamente a esta mistura fosfolipídeo/solvente. A razão de fase aquosa para solvente orgânico usada é 1:3 para éter dietílico e 1:6 para éter diisopropílico/clorofórmio. Em seguida, a preparação é sonicada em banho termostatizado à temperatura entre 5 e 30° C, dependendo do material a ser encapsulado, por breve período, formando uma emulsão homogênea.

Os solventes orgânicos são removidos por um procedimento que envolve dois passos: evaporação a 200- 400 mmHg, até que a emulsão se torne um gel. Nesta fase, pode-se adicionar ou não um excesso de fase aquosa, o que não diminuirá drasticamente a porcentagem de encapsulação do tampão aquoso inicial mas sim o tempo requerido

para ir do estado gel para a dispersão final de lipossomos. Após o estado gel ser atingido, procede-se a agitação em vórtex a fim de auxiliar a quebra do gel. Então, procede-se a evaporação a 700 mmHg até a formação de uma dispersão homogênea. Finalmente, deve-se remover os traços finais do solvente por métodos como diálise ou cromatografia em coluna, o que elimina a tendência de agregação das vesículas recém preparadas (SZOKA & PAPAHDJOPOULOS, 1981) (Figura 5).

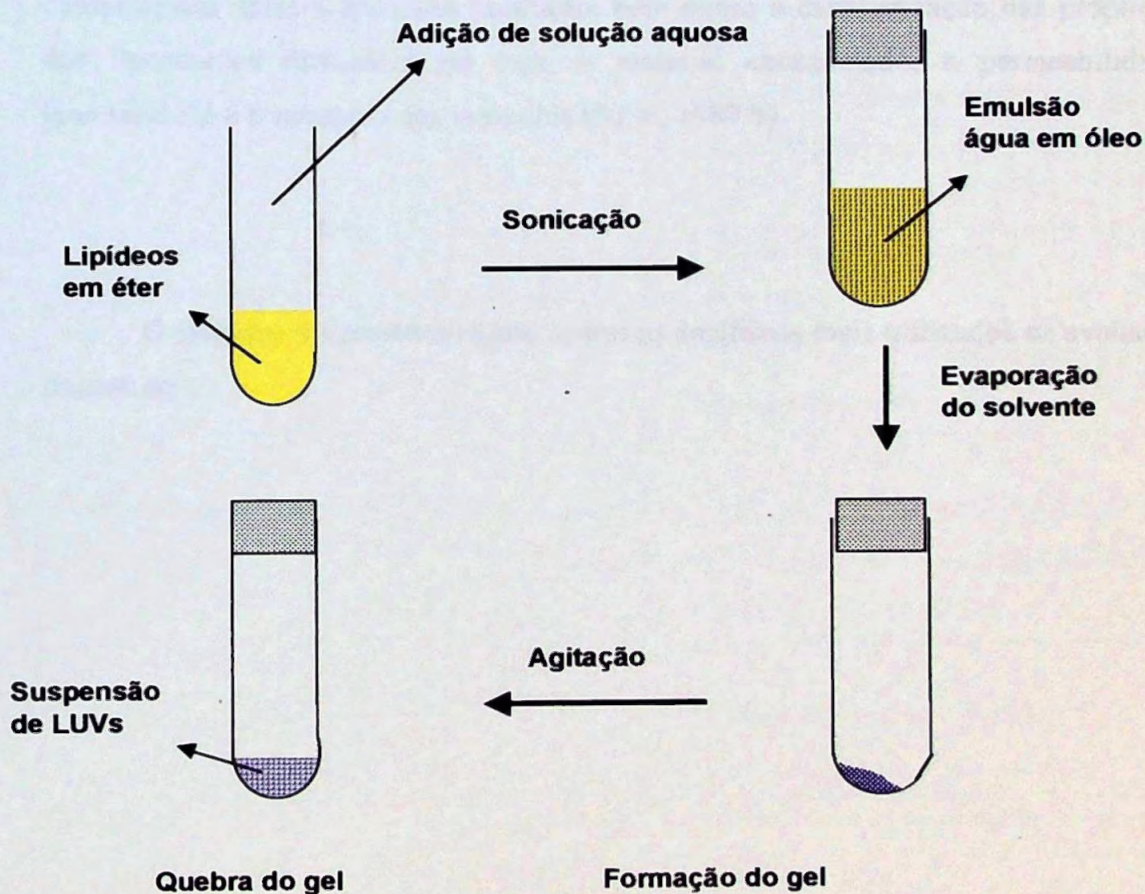


Figura 5: Esquema do preparo de LUVs pelo método da Evaporação em Fase Reversa.

1.2.4. Métodos de Avaliação de Lipossomos.

Métodos de caracterização de lipossomos imediatamente após sua preparação e também daqueles sob estocagem são requeridos para um controle de qualidade adequado da formulação. O comportamento dos lipossomos nos sistemas físicos e biológicos é determinado em grande extensão por fatores como o tamanho, a composição química, a permeabilidade da membrana, a quantidade de solutos encapsulados, e a qualidade e pureza dos materiais. Assim, é importante obter-se todas as informações possíveis com relação a estes parâmetros. Os métodos de caracterização de lipossomos envolvem a análise química qualitativa e quantitativa dos seus componentes antes e após sua produção, bem como a caracterização das propriedades dos lipossomos formados, ou seja, o material encapsulado, a permeabilidade, a lamellaridade e o tamanho das vesículas (NEW, 1989 b).

O **Quadro 1** apresenta alguns métodos analíticos mais utilizados na avaliação de lipossomos.

Quadro 1: Alguns métodos de avaliação de lipossomo (New, 1989 b)

Avaliação	Método Analítico
Análise dos fosfolípidos	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de fósforo • Cromatografia em camada delgada (CCD) • Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). • Estimativa da oxidação fosfolipídica
Determinação da liberação do soluto encapsulado	<p>Ensaio com marcadores detectados por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Densidade óptica: Arsenazo III • Fluorescência: carboxifluoresceína e calceína. • Enzimático: glicose, superóxido dismutase. • Radiomarcadores: [¹⁴C] glicose; [¹⁴C] inulina.
Purificação e eficiência de encapsulamento	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia em coluna • Centrifugação • Diálise (mg fármaco encapsulado/total fármaco aplicado x 100).
Volume de encapsulamento	<ul style="list-style-type: none"> • % de encapsulamento x volume da solução do fármaco (µL)/ 100 x total lipídeos (mg) • NMR da água em D₂O
Lamelaridade	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia de Luz Polarizada
Tamanho	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia eletrônica de imagem negativa. • Espectroscopia de correlação de fótons ("Light Scattering").

1.2.4.1. Purificação de lipossomos.

Para o uso de lipossomos como sistemas de liberação, é necessário a completa remoção do fármaco não encapsulado. Se as vesículas e o fármaco livre possuírem diferenças de cargas líquidas, sugere-se a *cromatografia de troca iônica* para esta finalidade. A técnica de *ultracentrifugação* também é adequada para a remoção de fármacos hidrossolúveis não encapsulados.

Entretanto, o método mais comum para a separação do fármaco não encapsulado é a *cromatografia de exclusão em gel*. Devido ao fato dos lipossomos serem muito maiores que os materiais que neles são encapsulados, a separação do material não incorporado pode ser feita com base na diferença de tamanho por uma coluna cromatográfica de filtração em gel. Sephadex G-50 ou G-75 são os materiais mais utilizados para este tipo de separação. O gel de dextrano (Sephadex) é um polissacarídeo com unidades de glicose, obtido por fermentação da sacarose. As ligações são do tipo α -1-6 e as ramificações podem variar entre 1-2, 1-3 e 1-4 (ROTHSCHILD, 1995).

A *cromatografia por exclusão* baseia-se em um processo puramente mecânico. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. As moléculas da amostra são separadas porque as menores são capazes de penetrar facilmente em todos os poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros, passando entre os grânulos acompanhando a fase móvel intersticial. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidades variáveis entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada ao seu tamanho efetivo (ROTHSCHILD, 1995).

1.2.4.2. Microscopia de Luz Polarizada

Métodos microscópicos têm sido usados extensivamente para caracterizar lipossomos, não somente em relação ao tamanho, mas também à sua forma e à sua estrutura. A microscopia de luz polarizada tem a vantagem de determinar a forma da partícula e, em algumas vezes, a multilamellaridade. A principal limitação é a falta de resolução abaixo de $0,5 \mu\text{m}$ (WOODLE & PAPAHDJPOULOS, 1989).

O microscópio de polarização se distingue de um microscópio comum por possuir um dispositivo para a produção de luz polarizada em linha reta. “Polarizar” um raio de luz é dirigi-lo para uma só direção. A princípio, qualquer microscópio comum pode ser adaptado para produzir luz polarizada por meio de dois sistemas ópticos, chamados respectivamente de polarizador e analisador. O polarizador é colocado no vão do anel do condensador, abaixo da platina e acima do espelho; ou então troca-se o condensador comum por um condensador de polarização. O prisma analisador é colocado sobre a ocular (BURCHEL, 1972).

Os filtros polarizantes consistem de bilhões de cristais submicroscópicos em uma única direção, de modo que a matriz do filme de acetato de celulose atua como um cristal único que orientará as ondas de luz numa única direção. Quando a orientação do polarizador e analisador estão em posição leste-oeste ou paralelos um ao outro, ondas de luz emanam somente naquela direção e são chamadas *polarizadas*. Quando o analisador é girado 90° ao eixo do polarizador, a luz polarizada é cancelada, o que chamamos de extinção, e resulta em um fundo escuro. Quando os polarizadores e os analisadores estão orientados a 90° um do outro, somente substâncias que tem dois ou mais índices refrativos aparecerão luminosas ou coloridas e são chamadas *anisotrópicas*. Se uma espécie não influencia o raio de luz, permanecerá invisível e escura, e é chamada *isotrópica*. Assim, o filtro polarizador é capaz de diferenciar espécies isotrópicas e anisotrópicas e além disso, fornece um meio de obtenção de contraste nas espécies anisotrópicas coloridas (SMITH, 1994). Para que substâncias sejam visualizadas por microscopia de luz polarizada é necessário, portanto, que apresentem a propriedade de birrefringência. Esta, é uma propriedade característica de fase cristalina esmética (lipossomos) e pode ser observada por microscopia de luz polarizada (BANGHAM et al., 1965).

1.2.4.3. Determinação do tamanho das vesículas.

Alguns métodos mais usados estão relatados abaixo (WOODLE & PAPAHAJIOPOULOS, 1989):

(i) Métodos microscópicos: tem apresentado grande aplicação na caracterização de lipossomos, não somente pelo seu tamanho, mas também pela sua forma e estrutura. Entretanto, a vantagem da medida de partículas individuais é compensada pela necessidade de contagem de um grande número de partículas para uma boa representação da amostra total. Além disso, a quantificação de imagens é difícil, especialmente para um grande número de estruturas. A *Microscopia de Luz* tem a vantagem de determinação da forma da partícula e em alguma extensão a multilamellaridade. Na *Microscopia eletrônica* as amostras devem ser fixadas, o que inclui a introdução de artefatos especiais. A *Microscopia de corte-congelado* também é uma técnica muito usada, na qual usa-se menos artefatos. O contador Coulter é muito útil para a determinação da distribuição por volume de partícula, mas somente para aquelas de 1 μm ou mais e é dependente da assimetria da partícula. Devido à faixa de limitação, é melhor para determinação de um número de partículas acima de 1 μm ou para uso em combinação com outros métodos;

(ii) Raio hidrodinâmico usando cromatografia de exclusão em gel. este método fraciona a amostra pelo raio hidrodinâmico, permitindo a determinação da quantidade de fosfolípídeo (ou lipídeo) em cada fração eluída, mas com algum limite para resolução. Quando a coluna é calibrada, a quantidade de massa de lipídeo (ou fármaco) versus tamanho pode ser determinada. Todas as partículas maiores são eluídas com o volume da fração do "void" ou volume morto da coluna. O uso de cromatografia de permeação em gel combinada com o contador Coulter pode fornecer caracterização de tamanho de 10 nm a mais de 1 μm , mas com uma falha de 0,2 a 1,0 μm ;

(iii) Densidade: a centrifugação pode ser usada para fracionar preparações lipossomais pelas diferenças na razão de sedimentação; a separação resultante deve ser devido à diferenças no tamanho ou algum outro fator que afete a densidade do lipossomo, como

o número de lamelas. Para o método ser aplicável, deve haver diferenças de densidade suficientes entre as partículas e o solvente. Para lipossomos, a ultracentrifugação ou alteração da densidade do tampão devem ser requeridos, especialmente para pequenas partículas. Se a densidade da partícula é homogênea e conhecida, a distribuição do tamanho pode ser calculada. Já que a densidade de lipossomos pode variar, isto representa uma limitação da segurança do método;

(iv) Espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering): quando uma fonte de luz laser (Hélio, Argônio) incide sobre a preparação lipossômica, as vesículas de diferentes tamanhos vão espalhar ou dispersar a luz numa determinada intensidade. Este espalhamento da luz pelas vesículas de diferentes tamanhos é detectado por um fotomultiplicador. Assim, obtêm-se um gráfico padrão que relaciona diâmetro médio das vesículas com a intensidade da luz espalhada, podendo-se determinar a porcentagem do diâmetro médio das vesículas. Este método é referido como Espectrometria de Fotocorrelação ou Espalhamento da Luz Quase Elástico e refere-se à análise da dependência de tempo de flutuações da intensidade da luz espalhada devido ao movimento Browniano das partículas em solução/suspensão. O movimento Browniano está relacionado ao movimento térmico randômico das moléculas de solvente colidindo com as partículas suspensas (soluto). Este movimento espontâneo das partículas submicroscópicas em solução/suspensão pode hoje ser monitorado por técnicas genericamente referidas como Espalhamento Dinâmico da Luz. Estes métodos verificam, portanto, a dependência de tempo da intensidade de luz espalhada pelo meio (NEW, 1989 b). A razão na qual a intensidade de luz espalhada flutua, depende da razão na qual os elementos se movem na solução, sendo o último caracterizado por um coeficiente de difusão aparente. Já que pequenas partículas se difundem mais rapidamente que partículas grandes, a razão de flutuação de intensidade da luz espalhada varia de acordo com o tamanho ou seja, são medidas as flutuações da intensidade de luz em relação ao tamanho da partícula. O movimento das partículas grandes em um meio fluido é menor do que para partículas pequenas e as flutuações na intensidade de luz são, conseqüentemente menores (SCHMITZ, 1990).

De modo geral, um feixe de luz laser passa através de uma célula de quartzo contendo a amostra a qual espalha luz em todas as direções na solução. A luz espalhada

a 90° no caminho do feixe é coletada por pequenas lentes e transmitida a um fotodiodo. Este recebe os fótons de luz espalhada e as converte em pulsos elétricos, e estes podem ser analisados e processados. As moléculas em movimento Browniano causam flutuações na intensidade da luz espalhada, e esta flutuação apresenta uma escala de tempo que está relacionada à velocidade do movimento das moléculas, e então, ao seu tamanho. Os fótons são coletados em canais e a análise destes dados (autocorrelação) produz o Coeficiente de Difusão Translacional (DT). Uma vez determinado DT, o raio hidrodinâmico (RH) pode ser calculado usando a equação de Stokes-Einstein (NEW, 1989 b):

$$RH = \frac{kb T}{6 \pi n DT}$$

onde kb é a constante de Boltzman, T é a temperatura absoluta em Kelvin, n representa a viscosidade do solvente e $\pi = 3,1416$.

Há equipamentos mais modernos atualmente, os quais podem medir o tamanho de partículas com diâmetros na faixa de 5 a 5000 nm, usando o método de espectroscopia de correlação de fótons citada anteriormente.

(v) Outros: uma variedade de outros métodos tem sido usados para caracterização de tamanho dos lipossomos baseados sobre parâmetros influenciados pelo tamanho, em adição à outras propriedades: NMR, potencial zeta, etc. Na maioria dos casos, a dependência do método sobre tamanho varia e a extensão da influência de outros parâmetros tornam os resultados incertos. Todavia, os resultados de cada um destes métodos podem fornecer importante informação alternativa para uma completa caracterização dos lipossomos.

1.3. Calorimetria exploratória Diferencial (DSC)

Métodos térmicos de análise são técnicas que medem a mudança das propriedades físicas ou químicas de um material em função da temperatura, enquanto a amostra é submetida a um programa de temperatura definido (FORD & TIMMINIS, 1989; CLAS et al., 1999).

Em DSC, o calor requerido por uma amostra para manter uma elevação constante na temperatura é relacionado à variação de temperatura. Em resumo, duas pequenas cápsulas de alumínio são comparadas, uma vazia ou contendo um material inerte adequado, e outra contendo a amostra. Termosensores monitoram a temperatura de cada cápsula, já que estas são aquecidas separadamente. O calor de entrada na cápsula contendo a amostra é ajustado para que a temperatura iguale àquela de referência. Na temperatura de transição de fase, um calor extra é requerido para manter o aumento na temperatura da cápsula contendo a amostra igual àquela da referência. Este fluxo de calor é registrado e fornece uma medida da quantidade de energia absorvida ou envolvida na transição particular (a integral sob a curva é igual à mudança de entalpia da transição).

As técnicas de análise térmica, principalmente DSC, tem sido aplicadas no estudo do comportamento térmico de lipossomos (BILTONEN & LICHTENBERG, 1993). As mudanças nos principais parâmetros que podem ser medidos das curvas de DSC, como por exemplo, a temperatura de transição de fase dos lipossomos de gel para líquido cristalino (T_c) e a mudança de entalpia envolvida nesta transição, são indicadores sensíveis das alterações do empacotamento lipídico dentro da bicamada.

Frente a mudanças de temperatura, lipídeos ou membranas lipídicas podem existir em diferentes fases, e as transições de uma fase a outra podem ser detectadas por técnicas físicas quando a temperatura é aumentada. A transição de fase mais observada é aquela na qual os fosfolipídeos e/ou lipídeos passam de um estado altamente ordenado "gel" ou fase "sólida" para uma fase líquida cristalina a temperaturas elevadas, onde a liberdade de movimento das moléculas individuais é maior. Assim, o método mais usado para a determinação da temperatura de transição de fase (T_c) e as entalpias de transição (ΔH) destas transições de fase é a Microcalorimetria ou DSC. A Análise Térmica tem desempenhado um importante papel na caracterização dos lipossomos,

pois quando estes diferentes fosfolípidos ou lípidos estão arranjados em uma configuração em bicamada (vesículas ou lipossomos), estas transições de fase reversíveis e dependentes da temperatura (transições térmicas) correspondem à fusão dos lípidos que compõe a estrutura lipossômica. A importância da Análise Térmica neste tipo de preparação é portanto, a caracterização do estado físico da bicamada, o qual afeta sua permeabilidade, o aprisionamento e a estabilidade do lipossomo.

Na análise de fosfolípidos e/ou lípidos, suas transições ocorrem na realidade em duas fases: a pré- transição e a transição principal. A *pré-transição*, quando ocorre, se dá a poucos graus abaixo da transição principal, e é causada pela rotação da porção cabeça polar das moléculas ou à inclinação das cadeias de hidrocarbonetos (HC) antes de ocorrer a fusão. A pré-transição é seguida pela *transição principal*, a qual representa a maior transição e a mais importante, e é uma transformação do estado gel para o líquido-cristalino, resultado da desordem das configurações *trans* do estado gel para o estado fluido, ou seja, fusão das cadeias de hidrocarbonetos (NEW, 1989).

A inclusão de agentes terapêuticos nos sistemas lipossômicos podem ter efeito pronunciado sobre o comportamento das transições de fase dos lípidos e conseqüentemente na fluidez da bicamada. Estes efeitos são determinados pela posição do agente terapêutico na bicamada. Por exemplo, fármacos hidrofílicos, como ficam localizados preferencialmente nos compartimentos aquosos entre as bicamadas de lípidos ou no núcleo aquoso interno do lipossomo, são improváveis de perturbar a organização das moléculas lipídicas constituintes das bicamadas. Por outro lado, fármacos lipofílicos interagem com as bicamadas e perturbam sua organização. A organização das bicamadas pode deste modo ser avaliada pelas curvas de DSC, as quais se tornam úteis na avaliação das interações fármaco- lípido nos lipossomos (TAYLOR & MORRIS, 1995).

1.4. Lipossomos como sistemas de liberação de fármacos na pele.

As formulações lipossômicas contendo fármacos têm se mostrado vantajosas especialmente para uso tópico, quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais. A potencialidade dos lipossomos como sistemas de liberação de

fármacos na pele baseia-se nos seguintes fatores (EGBARIA E WEINER, 1993; SHARMA & SHARMA, 1997): (i) Os veículos convencionais não são eficientes para liberar seus princípios ativos na pele visto que não podem penetrar na camada córnea. As bicamadas dos lipossomos, por outro lado, interagem mais eficientemente na pele; (ii) a incorporação lipossômica de fármacos que penetram prontamente na pele, resultam em uma diminuição da absorção sistêmica, quando comparado à aplicação tópica usando veículos convencionais; (iii) a deposição de lipossomos no estrato córneo, resultando em um substancial efeito reservatório e; (iv) os lipossomos podem ser atóxicos, biodegradáveis e preparados em larga escala. A retenção das vesículas carreadoras de fármacos no sítio de aplicação é acompanhada por uma *diminuição* do acúmulo do mesmo nas áreas não alvo. Ou seja, se o fármaco é mais retido no sítio de ação tópico, outros órgãos serão menos atingidos, diminuindo assim a toxicidade.

Devido às suas vantagens, os lipossomos têm sido propostos por vários autores como sistemas de liberação de fármacos (FOLDVARI, 1991; BONINA et al., 1995; VEMURI & RHODES, 1995; REDI, 1997). As características estruturais dos sistemas lipossômicos já são bem conhecidas (vesículas uni- e multilamelares), bem como sua capacidade de aprisionar substâncias de diferentes solubilidades. O fato das membranas destas vesículas serem estruturalmente semelhantes às membranas biológicas (bicamada lipídica) pode facilitar, de certa forma, a penetração de fármacos encapsulados nos tecidos.

Em 1980, introduziu-se a primeira preparação lipossômica no comércio, o antifúngico "Pevaryl Lipogel", que continha 1% de econazol. Dentre a grande variedade de candidatos adequados para encapsulação em lipossomos para aplicação tópica, como os antifúngicos, os antibióticos, os desinfetantes, e os imunossupressores, três grupos de fármacos merecem destaque: os corticosteróides para o tratamento de eczema atópico (KORTING et al., 1991), os retinóides como tretinoína para o tratamento da acne e os anestésicos locais como lidocaína e tetracaína (GESZTES & MEZEL, 1988).

Em uma série de trabalhos, MEZEI & GULASEKHARAM (1980, 1982) relataram a aplicação tópica de corticosteróides tais como triancinolona acetona em lipossomos resultando numa concentração do fármaco na epiderme quatro vezes maior que aquela obtida usando um outro veículo (pomada ou solução), enquanto a excreção urinária e a

absorção sistêmica do mesmo foi diminuída. Além disto, os efeitos colaterais podem ser diminuídos nesta forma de administração, o que significa uma grande vantagem em relação a outras vias. Estes resultados sugeriram o potencial dos lipossomos como sistema de liberação de fármacos para aplicação tópica.

Um outro campo promissor para a aplicação tópica de preparações lipossômicas é o tratamento de câncer de pele. YAROSH et al. (1994), investigaram o efeito dos lipossomos contendo enzimas reparadoras de DNA *in vitro* e *in vivo* em ratos. Os autores verificaram que os lipossomos podem liberar as proteínas encapsuladas, nas células da pele, levando a uma redução do câncer de pele induzido pela radiação UV. Estudos recentes, realizados em humanos demonstraram um aumento no efeito reparador de DNA em pacientes com xeroderma pigmentoso ou câncer de pele (YAROSH et al., 1999).

1.4.1. Lipídeos do estrato córneo (EC).

Os lipídeos intercelulares que envolvem os corneócitos constituem a principal via de difusão de fármacos através do EC (ROUGIER et al., 1985; KNUTSON 1985; IMOKAWA et al., 1991). As células epiteliais possuem como função principal a produção de camadas de células mortas que atuam como barreira à água e à outras substâncias e, os lipídeos neutros do EC apresentam um papel importante nesta função de barreira (SWARTZENDRUBER et al., 1989; ELIAS, 1991). Os lipídeos da pele são organizados em estruturas lamelares. Algumas moléculas de água podem estar incorporadas nas regiões interlamelares entre os principais grupos hidrofílicos dos lipídeos. Como resultado desta estrutura dos lipídeos da pele, alternam-se domínios hidrofílicos e lipofílicos, formando-se, assim, caminhos para que os fármacos penetrem no EC. (**Figura 6b**) (JUNGINGER et al., 1992).

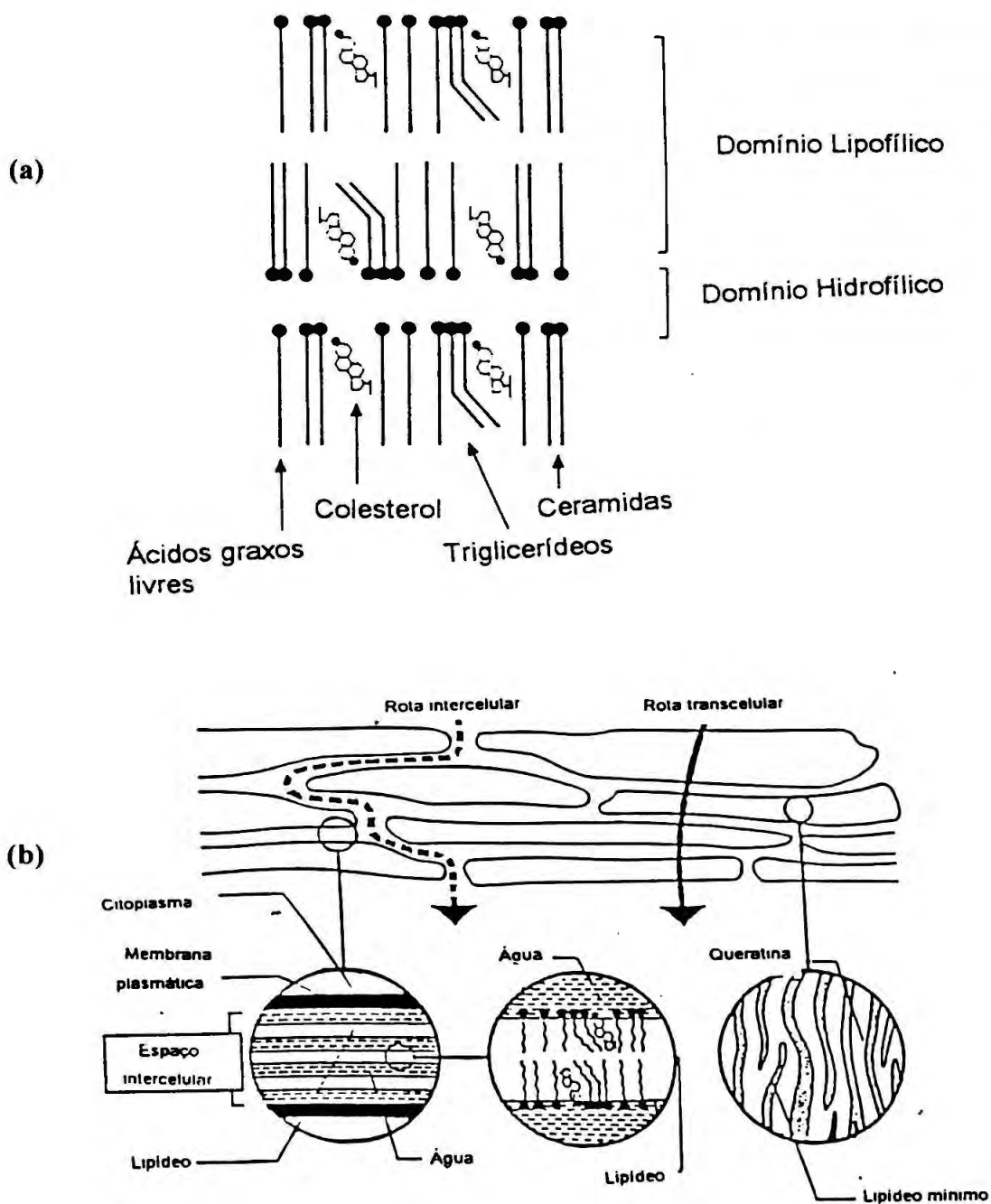


Figura 6: Representação esquemática (a) estrutura da camada córnea; (b). possíveis caminhos de penetração de fármacos através do EC (caminho intercelular e transcelular) (JUNGINGER et al., 1992).

GRAY & YARDLEY (1975) sugeriram que os lipídeos polares, tais como ceramidas e colesterol, participam da formação de bicamadas no EC, proporcionando uma seletividade na permeação transcutânea de substâncias hidro e lipossolúveis.

A lamela lipídica do EC consiste predominantemente de ceramidas (50%), colesterol (25%), ácidos graxos livres (10 a 15%); e sulfato de colessterila (5%), sendo porém destituída de fosfolipídeos, os quais são componentes formadores de bicamadas em todas as outras membranas celulares e intracelulares (DOWNING et al., 1993).

Os lipídeos do EC são originados de precursores polares lipídicos (fosfolipídeos e glicosíngolipídeos), fornecidos pelas células do estrato granuloso (FARTASH, 1996). As ceramidas constituem a maior parte dos lipídeos do EC e compreende um grupo estruturalmente heterogêneo. Seis frações de ceramidas separadas cromatograficamente têm sido isoladas e caracterizadas (**Figura 7**). A ceramida 1 é derivada de acilglucosilceramida rica em linoleato. A ceramida 2 consiste de ácidos graxos saturados ligados à amida em bases esfingosina e diidroesfingosina. Os ácidos graxos nesta ceramida são principalmente constituídos de 24, 26 e 28 carbonos. A ceramida 3 contém a mesma faixa de ácidos graxos saturados, porém, o componente base é a fitoesfingosina, a qual apresenta um grupo hidroxila adicional no carbono 4. As ceramidas 4 e 5 consistem de α - hidroxiácidos ligados à amida em bases esfingosina e diidroesfingosina. Finalmente, a ceramida 6, a mais polar, contém α - hidroxiácidos ligados à amida em base fitoesfingosina.

O colesterol, representa aproximadamente 25% dos lipídeos totais e sulfato de colessterila, em torno de 5%. Pequenas quantidades de outros dois diferentes tipos de ésteres do colesterol também estão presentes. Um deles consiste principalmente de oleato de colesterol e o outro contém éster ligado a α - hidroxiácido. Estes ésteres de colesterol não são lipídeos formadores de bicamadas e, não são geralmente bem acomodados pelas bicamadas formadas de outros lipídeos. Eles devem, entretanto, estar presentes em estruturas não lamelares no EC.

Os ácidos graxos livres compreendem de 10 a 15% da massa lipídica do EC e consistem predominantemente de espécies saturadas de cadeia reta. Possuem de 14 a 28 carbonos, sendo os mais abundantes contendo 22 e 24 carbonos. Os ácidos graxos e o sulfato de colesterol são os lipídeos ionizáveis do EC e são necessários para a formação de bicamadas (WERTZ, 1996).

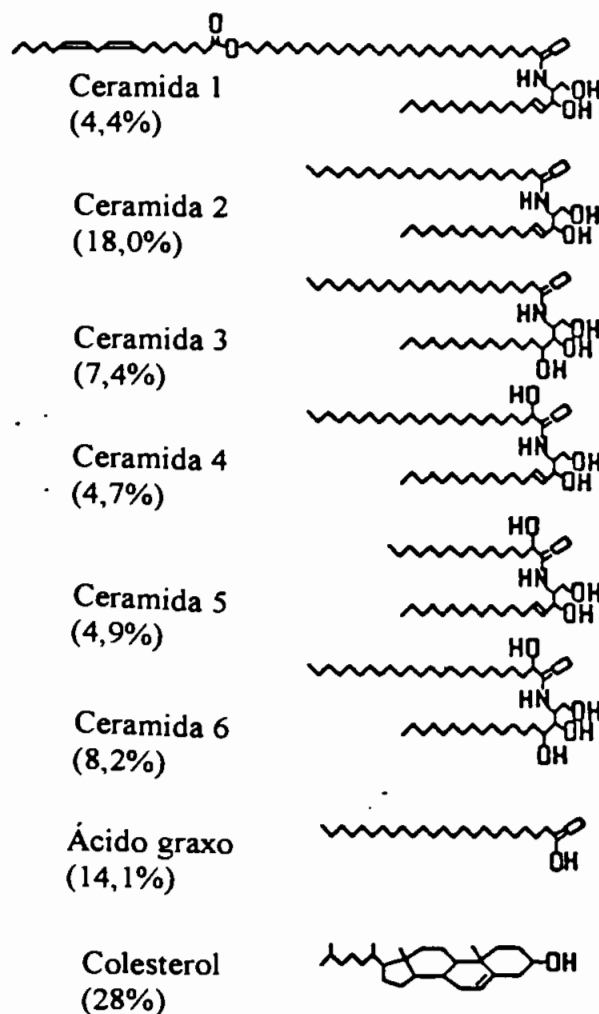


Figura 7. Representação dos diferentes tipos de ceramidas e estruturas lipídicas encontradas no EC. As respectivas porcentagens em peso de cada lipídeo estão descritas entre parênteses (WERTZ, 1996).

Os sistemas lipossomais, de composição lipídica semelhante ao do EC, têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores quando se pretende veicular fármacos na pele (WERTZ et al., 1986; ABRAHAM et al., 1988; WOLF & RIEGER, 1993; LASCH et al., 1998). A penetração das vesículas lipossômicas na pele depende das características físico-químicas dos lipídeos que estas são formadas. Os lipídeos do EC previamente descritos, estão arranjados em estrutura de bicamadas que preenchem espaços intercelulares no EC. A similaridade dos lipídeos constituintes dos lipossomos, com os lipídeos do estrato córneo é um fator que determina uma maior interação formulação-

pele e, conseqüentemente, uma maior penetração do fármaco encapsulado neste tecido (KORTING et al., 1995).

1.5. Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutâneas.

Métodos experimentais *in vitro* para liberação de fármacos através da pele são necessários para a avaliação de produtos tópicos e/ou transdérmicos. A razão limitante do processo parece ser a difusão passiva de substâncias químicas através da barreira. Para a maioria dos compostos, a membrana controladora é o EC mas, para compostos lipofílicos, a difusão através da epiderme viável é o passo limitante.

A absorção e/ou retenção podem ser medidas por técnicas *in vitro* dada a simplicidade das condições experimentais. Os estudos *in vitro* podem minimizar ou eliminar o uso de pele animal, as quais podem ser substituídas por membranas sintéticas. Os compostos potencialmente tóxicos são freqüentemente estudados *in vitro*. De maneira geral, para a administração tópica de fármacos, uma absorção percutânea excessiva não é desejada, mas sim um efeito sustentado no local ou próximo à superfície da pele. Vários tipos de células de difusão podem ser utilizados para estes estudos, baseados em dois tipos básicos: células de uma só câmara e células de duas câmaras (BRONAUGH & COLLIER, 1993).

Para o estudo de fármacos que serão aplicados topicamente, uma dose finita do mesmo é aplicada numa célula de câmara única, onde camadas finas do material podem ser aplicadas. As técnicas de dose finita baseadas numa célula de difusão *estática* foram descritas por FRANZ (1975), usando uma célula de difusão de uma única câmara. Neste tipo de célula, a superfície da pele (lado epidérmico) é exposta ao meio ambiente, e a superfície dérmica voltada para o fluido receptor. A câmara abaixo da pele serve como um reservatório para o fluido receptor, o qual é continuamente agitado. Amostras são retiradas através de um braço lateral para posterior determinação das razões de absorção. O fluido receptor, no caso de substâncias solúveis em água, pode ser uma solução salina ou solução tampão isotônica. A temperatura é mantida a 37° C por meio de banho de água circulante para aproximação das condições fisiológicas. Nos

intervalos de tempo selecionados, alíquotas do fluido receptor são removidas e analisadas quanto ao conteúdo de fármaco permeado.

Os estudos de liberação *in vitro* aproximam-se mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas. Devido às amostras de pele humana serem de difícil obtenção e variarem quanto à sua permeabilidade, muitos pesquisadores empregam outros materiais para simulá-la. A membrana de acetato de celulose tem sido utilizada como uma membrana com características hidrófilas em células de difusão para estudos de liberação *in vitro*. Dentre as membranas de origem natural, a pele humana é insubstituível nos estudos de penetração e permeação cutânea. Entretanto, devido às dificuldades na aquisição desta membrana, as peles de animais como ratos (HADGRAFT & BEUTNER, 1993), camundongos com e sem pêlo (GHOSH et al., 1993) coelhos (DEVOS et al., 1991) cobaias e cricetos (SURBER et al., 1991), porcos (SATO et al., 1991), cães sem pêlo (REIFENRATH et al., 1984), macacos (SURBER et al., 1991), têm sido empregadas como membranas naturais. A pele humana pode ser obtida pela dissecação de cadáveres e em cirurgias (ROY et al., 1994).

A pele de camundongo sem pêlo é utilizada em alguns estudos e apresenta-se adequada para substituir a pele humana (DÜRRHEIM et al., 1980). No entanto, a utilização de pele de camundongo sem pêlo em estudos *in vitro* de absorção cutânea, deve ser feita de maneira cautelosa, uma vez que, este tecido parece ser susceptível a algumas alterações quando comparados com a pele de cadáver humano. O aumento da permeabilidade da camada córnea da pele desses animais pode ocorrer devido à excessiva hidratação, ao tratamento com acetona e com promotores de penetração. Quanto à hidratação, a permeabilidade é aumentada, em relação à pele humana, somente após dois dias de experimento. Até este período, a pele de camundongo sem pêlo pode ser empregada assegurando-se uma boa semelhança com a pele humana (BOND & BARRY, 1985).

1.6.Determinação quantitativa do 5-ALA

A Fluorimetria é um método fotométrico que se aplica à substâncias fluorescentes. Chamam-se assim as substâncias capazes de absorver radiação de curto

comprimento de onda (ultravioleta) e então emitir radiação de maior comprimento de onda (visível). Uma espécie fluorescente emite seu espectro de fluorescência após absorver radiação em alguma parte dentro do seu espectro de excitação. A distribuição espectral da radiação de fluorescência é uma característica da substância fluorescente, que pode ser utilizada com fins qualitativos. A Fluorimetria quantitativa baseia-se portanto na medida da intensidade da fluorescência, sendo a magnitude da fluorescência total depende da concentração da espécie fluorescente na solução. De acordo com a Lei de Beer, a absorvância é diretamente proporcional à concentração. Assim, para soluções muito diluídas (algumas partes por milhão ou menos), a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração. A intensidade de fluorescência pode ser representada graficamente em função da concentração. A relação linear é válida dentro de uma faixa considerável de concentrações (OHLEILER, 1974).

Durante o processo de excitação, a maior parte das moléculas afetadas adquire energia vibracional e também eletrônica. Sua principal tendência é passar para estados vibracionais inferiores através de colisões. Se essa perda de energia cessar em um nível eletrônico excitado, as moléculas estarão aptas a voltarem diretamente ao seu estado fundamental pela radiação de um quantum de energia (fluorescência). A molécula pode parar em qualquer estado vibracional do nível fundamental, e o espectro de fluorescência consiste geralmente em várias linhas, principalmente na região visível. Entre as moléculas orgânicas, apresentam fluorescência as que têm estruturas grandes, rígidas, multicíclicas (EWING, 1980). O fenômeno da fluorescência é uma emissão de vida curta que dura de 10^{-8} a 10^{-5} s.

Os instrumentos para a medida da fluorescência com detectores fotossensíveis são chamados fluorímetros, os quais dividem-se em fluorímetros de filtro e espectrofluorímetros (OHLEILER, 1974).

Os compostos não- fluorescentes podem ser convertidos em moléculas altamente fluorescentes através de reações de derivação (DAY & UNDERWOOD, 1991) e assim serem analisados e quantificados por Fluorimetria. Devido ao fato da molécula de 5-ALA não possuir fluorescência, para que este possa ser quantificado por esta técnica, é necessário convertê-lo em um composto fluorescente através de uma reação de derivação. A reação de derivação de 5-ALA foi primeiramente introduzida por OKAYAMA et al (1990). O derivado fluorescente de 5-ALA, formado pela mistura do

reagente de acetilacetona, formaldeído e 5-ALA, foi identificado por KAJIWARA et al (1993), como sendo **2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxietil)-3H-pirrolizina**. Os valores de λ de excitação e de emissão para o derivado fluorescente de 5-ALA são respectivamente 370 nm e 460 nm (TOMOKUNI et al., 1993; OISHI et al., 1996).

2. OBJETIVOS

Este trabalho propõe o desenvolvimento e avaliação de uma formulação para o pró- fármaco 5-ALA em lipossomos de composição lipídica semelhante a do EC, os quais, devido sua íntima semelhança e compatibilidade com as membranas celulares, podem proporcionar um aumento na penetração, e conseqüentemente, na retenção cutânea deste fármaco em peles de camundongo sem pêlo.

O projeto propõe ainda a caracterização físico-química dos sistemas obtidos, bem como a avaliação da disponibilidade *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Solventes, Reagentes e Matérias-primas.

- Ácido 5- aminolevulínico (Cloridrato, $C_5H_{10}ClNO_3$, mol 167,6)- SIGMA
- Acetato de sódio anidro, P.A (MERCK)
- TRIS (Tris[hidroximetil] aminometano), PA (SIGMA)
- EDTA dissódico, PA (SIGMA)
- NaCl, PA (SIGMA)
- Formaldeído 37% (MERCK)
- Acetilacetona, grau reagente (VETEC)
- Dietiléter, grau reagente (CARLO ERBA)
- Ceramidas - origem Holanda- (GALENA)
- Ácido palmítico, PA (SIGMA)
- Sulfato de colestera- sal sódico, PA (SIGMA)
- Colesterol, PA (EASTMAN ORGANIC CHEMICALS)
- Clorofórmio grau cromatográfico (MERCK)
- Etanol grau espectroscópico (MERCK)
- Metanol grau cromatográfico (MERCK)
- Resina Sephadex G-75 grau médio (PHARMACIA BIOTEC DO BRASIL LTDA)
- Blue dextrana, PA (SIGMA)
- Membranas de policarbonato de poros de diâmetro 5,0 μm ; 1,0 μm (COSTAR)
- Membrana de policarbonato 25 mm espessura (NUCLEOPORE[®])

3.1.2. Equipamentos e acessórios

- Extrusor capacidade de 10 mL- (LIPEX), ligado a um banho de água circulante com controle de temperatura digital POLYSCIENCE e a uma fonte de gás nitrogênio sob alta pressão (WHITE MARTINS)
- Espectrofotômetro HITACHI U 2000 equipado com cubetas de quartzo com 1cm³ de caminho óptico

- Espectrofluorímetro HITACHI F 4500
- Banho de aquecimento (0 a 120° C) QUIMIS
- Agitador magnético modelo PC-420 (CORNING)
- Agitador de tubos- PHOENIX- modelo AP56
- Balança analítica modelo A-200 DS (DENVER INSTRUMENTS COMPANY)
- Coletor de frações LKB BROMMA modelo 2112 Redirac
- Cronômetro digital
- Bomba à vácuo- MARCONI- modelo MA 058
- Coluna Cromatográfica de vidro (1,5 cm x 67 cm)
- Rotaevaporador modelo R-124 equipado com banho de água termostatizado (BUCHI)
- Equipamento para espalhamento dinâmico de luz: fonte de luz laser He-Ne, 633 nm SYSTEM 4700 (MALVERN INSTRUMENTS)
- Microscópio Óptico equipado com filtro de luz polarizada (ZEISS)
- Equipamento para dissolução com 7 cubas (SOTAX AT 7), acoplado a um banho termostatizado com circulação de água- WEB MLW- Pürfgerate- WERK, com cubas de plástico com capacidade de 1000mL.
- Homogeneizador de tecidos -Turrax- MARCONI- modelo MA102
- Calorímetro Exploratório Diferencial (SHIMADZU- DSC-50- Differential Scanning Calorimetry)
- Sistema de refrigeração controlada para Calorímetro Exploratório Diferencial (TCA-50- Thermal Analysis Autocooling Control).
- Cápsulas de alumínio utilizadas para análise no Calorímetro Diferencial de Varredura
- Banho sonicador modelo 1210 (BRANSON)
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 1,0 a 100,0 µL, 100 a 1000 µL e 1,0 a 10 mL- SIGMA
- Vidraria âmbar
- Tesoura e pinça para dissecação
- Luvas cirúrgicas

3.1.3. Animais de Laboratório

- Camundongos sem pêlo, machos, com quatro a seis semanas de idade, linhagem HRS/J. Laboratórios Jackson, BarHarbor, ME.

3.2. Métodos

3.2.1. Padronização da metodologia analítica para a quantificação do 5-ALA por Fluorimetria.

3.2.1.1. Reação de Derivação (OISHI et al., 1996)

A reação de derivação é uma modificação da reação de Hantzsch, na qual compostos amínicos reagem com acetilacetona e formaldeído. Em tubos de ensaio adicionaram-se 3,5 mL de reagente de acetilacetona, 0,45 mL de uma solução aquosa de formaldeído a 10% e 50,0 μL da amostra ou da solução padrão. A mistura foi agitada em agitador de tubos por aproximadamente 3 segundos seguida de aquecimento em banho de água fervente por 15 minutos. Após este período, os tubos foram resfriados em banho de gelo e mantidos ao abrigo da luz até a leitura em Espectrofluorímetro em um λ de excitação 370 nm e λ de emissão= 460 nm.

Preparação do reagente de acetilacetona: foram misturados 15,0 mL de acetilacetona, 10,0 mL de etanol e 75,0 mL de água destilada, mediante agitação e, em seguida, procedeu-se a estocagem ao abrigo da luz.

Preparação da solução de formaldeído 10% (v/v): esta solução foi preparada diluindo-se 3,7 vezes o reagente químico (37% v/v) em água destilada. A solução foi estocada ao abrigo da luz.

3.2.1.2. Obtenção da curva padrão do 5-ALA

Preparou-se uma solução estoque de 5-ALA na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Em balão volumétrico de 25 mL, foram dissolvidos 6,4 mg de 5-ALA e o volume foi completado com água destilada. A partir desta solução estoque, uma curva padrão foi obtida, na faixa de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Assim, foram feitas diluições da solução estoque com água destilada, de modo que resultasse nas seguintes concentrações de 5-ALA: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5 ($\mu\text{g/mL}$).

Alíquotas de 50,0 μL de cada diluição foram transferidas para tubos de ensaio âmbar com tampa esmerilada e procedeu-se a reação de derivação descrita no ítem 3.2.1.1.

A curva padrão foi obtida relacionando-se as concentrações de 5-ALA ($\mu\text{g/mL}$) nas abscissas (eixo x) e as intensidades de fluorescência nas ordenadas (eixo y).

3.2.2. Obtenção dos lipossomos de lipídeos do estrato córneo (EC).

3.2.2.1. Obtenção dos lipossomos por técnica de congelamento-descongelamento (LUVETs) seguido por extrusão.

Foram obtidos lipossomos pelo método da extrusão, baseando-se na composição lipídica representativa do EC, proposta por DOWNING et al (1993): ceramidas (50%), colesterol (28%), ácido palmítico (17%) e sulfato de colessterila (5%). A mistura lipídica foi preparada de modo que resultasse numa concentração final de 5 mg de lipídeos/ mL de lipossomos. O antioxidante α - tocoferol também foi incluído na preparação, utilizado a 1 mol % em relação à mistura de lipídeos.

Assim, quantidades apropriadas dos lipídeos individuais foram pesadas para produzir 10 ml da preparação e dissolvidas em um pequeno volume de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1). Em seguida, a solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 ml, e submetido à secagem sob corrente de nitrogênio. O resíduo

obtido foi colocado em dessecador sob vácuo por 15 minutos para a retirada de qualquer traço de solvente.

O volume do balão foi então completado para 10 mL com tampão TRIS-EDTA (100 mM NaCl, 5 mM de TRIS e 1mM de EDTA, pH 7,5) a temperatura ambiente. Em seguida, o balão foi aquecido em banho de água a 70° C por 3 minutos e congelado em solução refrigerante de gelo seco e acetona. Este ciclo de congelamento-descongelamento foi repetido por 5 vezes.

Após o último degelo da preparação, esta foi submetida à extrusão, primeiramente usando membrana de poros de 5 μ m (por 2 vezes) e em seguida por membrana de poro de 1 μ m (por 7 vezes).

Uma amostra da preparação foi usada para a obtenção do espectro de absorção em espectrofotômetro, na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 600 nm. O pico máximo de absorção da preparação foi observado no comprimento de onda de 246 nm. A preparação resultante apresentou-se levemente turva.

3.2.2.2. Obtenção dos lipossomos pela técnica de fase reversa (REVs).

A mesma composição lipídica descrita anteriormente foi empregada para a obtenção de lipossomos pela técnica de evaporação em fase reversa, seguindo a metodologia proposta por SZOCKA & PAPAHADJOPOULOS (1978). Os lipídeos foram pesados de modo que resultasse numa concentração total de lipídeos de 5mg/mL em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O tampão acetato de sódio em pH 5,0 foi empregado devido fornecer um meio mais adequado para a estabilidade de 5-ALA (DE ROSA, 1999).

O antioxidante α - tocoferol também foi incluído na preparação, utilizado a 1 mol % em relação à mistura de lipídeos. As quantidades apropriadas de cada lipídeo foram pesadas para obter 5,0 mL de preparação e dissolvidas em 30,0 mL de uma mistura de éter dietílico com clorofórmio (1:1) em um frasco apropriado com capacidade para 50 mL. Para auxiliar a dissolução da mistura, o frasco foi submetido por alguns minutos à sonicação, com temperatura entre 5-10° C.

A fase aquosa do sistema lipossomal consistiu de um "gel" de hidroxietilcelulose (HEC). A dispersão do polímero de hidroxietilcelulose a 0,15% ao tampão foi realizada à temperatura de 70°C e sob agitação, até que todo polímero fosse disperso. Após o resfriamento, foi obtido o "gel" de HEC que foi empregado como fase aquosa do sistema. O objetivo desta adição foi aumentar a viscosidade da fase aquosa, retardando assim a difusão do fármaco neste meio e, conseqüentemente o seu extravasamento das vesículas.

Assim, após a completa dissolução da mistura lipídica na fase orgânica, esta foi adicionada de 5 mL da fase aquosa do sistema. A relação de fase aquosa para fase orgânica foi 1:6. Para a obtenção de lipossomos contendo 5-ALA, este foi incorporado anteriormente na fase aquosa do sistema, de modo a obter uma relação fármaco: lipídeos de 1:3 (8000 µg de 5-ALA).

Em seguida, o sistema obtido foi submetido a banho sonificador com temperatura entre 5-10°C por pelo menos 30 minutos, ou até a completa emulsificação das duas fases, não sendo verificada separação de fases. A emulsão foi levada ao rotaevaporador a 200 rpm, com temperatura controlada entre 20-25° C, com pressão parcial (200 a 400 mmHg), até se notar a formação de um gel, ou pelo menos, até que a preparação tenha se tornado mais viscosa. Nesta fase, o frasco foi retirado do rotaevaporador e agitado rapidamente em vórtex afim de quebrar o gel formado. Em seguida, o frasco retornou ao rotaevaporador agora com pressão total (≈700 mmHg) por mais 5 minutos a 200 rpm e temperatura entre 20-25° C, quando foi observada a formação de uma dispersão homogênea.

Como ao final do procedimento o volume da preparação resultou em menos de 5 mL, este volume foi completado com o tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 contendo 0,15% de HEC. Esta preparação apresentou-se turva. Em seguida, a preparação foi aquecida em banho de água a 70° C por 15 minutos. Seguindo a metodologia de SZOKA & PAPAHAJDOPOULOS (1980), esta preparação foi então submetida à extrusão a 70°C (banho termostatizado ligado ao extrusor) com membranas de 5 µm (por 2 vezes) e de 1 µm por (por 7 vezes). A preparação extrusada apresentou-se menos turva que antes da extrusão.

3.2.3. Avaliação dos Lipossomos obtidos.

3.2.3.1. Caracterização dos lipossomos vazios (LUVETs e REVs) por cromatografia de exclusão em gel.

Primeiramente foi feita a hidratação de 20 g da resina Sephadex G-75 (grau médio) em cerca de 1,8 L de água destilada, previamente fervida, ainda quente, adicionando-se a resina aos poucos e misturando-se lentamente. A resina já hidratada permaneceu em repouso por um período de 24 horas. Em seguida, toda água foi retirada com o auxílio de uma bomba de vácuo, e então foram adicionados 500 mL do tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0.

Misturou-se vagarosamente, e passou-se a mistura para um kitassato ligado a uma bomba de vácuo a fim de desgaseificar a mistura por pelo menos 30 minutos. Esta preparação foi acondicionada em uma coluna de vidro de dimensões 1,5 cm x 67 cm, ligada a um coletor de frações e a um funil de separação contendo o tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0. O fluxo do tampão foi fixado em 0,3 mL/minuto. Em seguida, determinou-se o volume morto (V_M) da coluna. O V_M representa o volume da fase móvel nos interstícios de uma coluna recheada, ou nos espaços vazios em colunas contendo a fase estacionária somente recobrimdo as paredes. Ou seja, representa o volume de fase móvel necessária para eluir um componente não retido.

Para a determinação do V_M da coluna, 1,0 mL de uma solução de Blue dextrana, na concentração de 2,0 mg/mL em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 foi aplicado na coluna. Após a coleta das frações da coluna (14 frações), estas foram submetidas à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de máxima absorção da Blue dextrana, ou seja, a 650 nm. Com estas leituras de absorbâncias foi construído um gráfico, relacionando as frações coletadas da coluna com as respectivas absorbâncias, bem como a determinação do volume morto da coluna que se deseja obter. Após isto, a coluna foi lavada com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0 por uma noite.

Mediu-se 1,0 mL de cada preparação de lipossomos vazios obtida pelos métodos descritos nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2 e estas foram aplicadas na coluna de

Sephadex G-75 e eluídas com tampão TRIS-EDTA pH 7,5 e acetato de sódio 100 mM pH 5,0 respectivamente. Após a coleta das frações, traçou-se espectros de absorção de cada fração, na região de 190 nm a 600 nm, para determinar o λ de maior absorção das frações. Deste modo, pode-se saber em quais frações os lipossomos preparados pelas técnicas de congelamento-descongelamento e pela técnica de fase reversa são eluídos da coluna.

Com estes dados, foram construídos gráficos que relacionam as frações de lipossomos vazios eluídos da coluna (nº de tubos) e suas respectivas absorbâncias.

3.2.3.2. Caracterização dos lipossomos contendo 5-ALA (REVs) por cromatografia de exclusão em gel.

a) Cromatografia de exclusão do 5-ALA em tampão.

Uma alíquota de 1,0 mL da solução de 5-ALA (1600 $\mu\text{g/mL}$) foi aplicada na coluna e após a coleta das frações, alíquotas de 50,0 μL foram analisadas quanto à presença de 5-ALA por reação de derivação seguida por Espectrofluorimetria (item 3.2.1.1). Os dados obtidos foram relacionados em frações de 5-ALA eluídas da coluna (nº de tubos) em função das intensidades de fluorescência a 460 nm. O experimento foi realizado em duplicata.

b) Cromatografia de exclusão de lipossomos (REVs) contendo 5-ALA.

Uma alíquota de 1,0 mL da preparação de lipossomos contendo 5-ALA (1600 $\mu\text{g/mL}$), obtida conforme descrito no ítem 3.2.2.2, foi aplicado em coluna de Sephadex G-75 e eluído com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0.

Após a coleta das frações, as frações lipossômicas (**frações de 7 a 13**) e as correspondentes ao 5-ALA livre (**frações de 17 a 30**) foram diluídas apropriadamente para a quantificação utilizando a curva padrão descrita no item 3.2.1.2; em seguida foram submetidas a quantificação do 5-ALA por Espectrofluorimetria (item 3.2.1.1), utilizando-se 50 μL das diluições. No caso das frações lipossômicas, um volume

apropriado de etanol foi adicionado para a solubilização das vesículas antes da referida quantificação.

c) Determinação do volume de etanol para a solubilização das vesículas lipossômicas.

Após a coleta das frações de lipossomos vazios da coluna (REVs), obtidas no item 3.2.3.1, determinou-se a fração de maior leitura de absorbância no comprimento de onda de 246 nm. Assim, no caso de REVs, a fração de maior absorbância (fração 8) foi utilizada na determinação do volume de etanol necessário para solubilizar as vesículas formadas.

Uma alíquota de 1,0 mL desta fração foi utilizada, e a cada adição de 200 μ L de etanol absoluto, foi medida a absorbância em Espectrofotômetro HITACHI U 2000. A partir desses dados foi obtido um gráfico que relaciona volume de etanol adicionado e a leitura da absorbância a 246 nm.

3.2.3.3. Microscopia de Luz Polarizada.

Gotas da preparação de lipossomos vazios (5 mg de lipídeos/mL) obtidas conforme descrito no item 3.2.2.2 foram colocadas diretamente sobre uma lâmina de microscópico e cobertas com uma lamínula. Em seguida, procedeu-se a observação direta em microscópio óptico equipado com um filtro polarizador. A formação das vesículas foi verificada pela visualização de cruces Malteses entre as porções polares. As imagens visualizadas foram fotografadas através de sistema fotográfico acoplado ao microscópio.

3.2.3.4. Determinação do tamanho das vesículas por Espalhamento Dinâmico da Luz.

A análise do tamanho das vesículas foi realizada usando a técnica de espalhamento de luz laser: espectroscopia de correlação de fótons (PCS- Photocorrelation Spectroscopy) com um aparelho System 4700 (Malvern), utilizando

um correlator com 64 canais. O equipamento utiliza uma fonte de luz laser de He-Ne (λ de 633 nm).

As condições experimentais foram:

- Ângulo de espalhamento: 90°
- Temperatura: 25°C
- Comprimento de onda do laser: 633 nm
- Viscosidade: 0,89 cps
- Intervalo de tempo (T): 5 a 980 μ s
- Índice de refração: 1,33

Utilizou-se para a análise uma célula de quartzo, previamente lavada com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0. A célula contendo o mesmo tampão recebeu alíquotas das amostras. A temperatura de análise do material foi de 25°C. Os dados obtidos da análise foram processados por um computador, obtendo-se um gráfico que relaciona o diâmetro (nm ou μ m) com a porcentagem das espécies relacionadas a este tamanho.

3.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

3.2.4.1. Obtenção dos filmes lipídicos para análise de DSC.

Foram obtidos dois filmes lipídicos, ou seja, filmes compostos pela mistura dos lipídeos contendo ou não o fármaco 5-ALA. Quantidades apropriadas de uma mistura lipídica composta por ceramidas (50%), colesterol (28%), ácido palmítico (17%) e sulfato de coleslerila (5%) foram pesadas, dissolvidas em uma mistura de solventes orgânicos composta por clorofórmio: metanol (2:1), colocadas em tubo de ensaio e levada a um banho sonificador com temperatura entre 5 e 10 °C por 15 minutos a fim de dissolver toda a mistura. Quando o fármaco 5-ALA foi adicionado à mistura lipídica, a proporção de fármaco: lipídeos foi de 1:3. Os filmes de lipídeos individuais também foram obtidos.

Após completa dissolução da mistura lipídica, o solvente orgânico foi retirado por evaporação sob corrente de nitrogênio, até completa secagem e obtenção de um filme lipídico nas paredes do recipiente. Em seguida, o filme obtido foi removido das paredes dos recipientes, colocados em placas de Petri e, em seguida, em dessecador à vácuo para garantir que as amostras permanecessem secas até o momento da análise.

Os lipídeos individuais componentes da mistura também foram submetidos à análise de DSC, para posterior comparação dos perfis térmicos.

Antes da análise por DSC, todas as amostras (lipídeos individuais e mistura lipídica com e sem 5-ALA) foram pesadas e seladas separadamente em cápsulas de alumínio apropriadas. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise de DSC utilizando-se um equipamento de DSC-50 de fluxo de calor (SHIMADZU), equipado com uma jaqueta de resfriamento por gás nitrogênio líquido à uma razão de 50,0 mL/min, de modo a produzir um ambiente inerte dentro do forno. A calibração do equipamento foi realizada com índio (99,99%).

Assim, as amostras foram aquecidas, na faixa de temperatura de 5 a 110°C, a uma razão de 5°C/min. A cápsula de referência estava vazia para comparação com a amostra. Após o primeiro aquecimento, cada amostra foi resfriada até 5°C e em seguida aquecida novamente até 110°C para a obtenção da segunda curva de aquecimento. As curvas de aquecimento e resfriamento das amostras foram registradas em um microcomputador acoplado ao equipamento de DSC, obtendo-se os respectivos perfis térmicos de aquecimento e resfriamento. Por tratamento dos dados; o cálculo da integral sob a curva forneceu a mudança de entalpia envolvida nas transições de fase de cada amostra.

3.2.5. Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutâneas.

Para o experimento de permeação e retenção *in vitro*, foi utilizada a preparação de lipossomos obtidos pela técnica de fase reversa descrita no item 3.2.2.2., onde a concentração lipídica utilizada foi de 5 mg de lipídeos/mL de lipossomos e a concentração de 5-ALA incorporado foi de 1600 µg/mL de lipossomos.

Foram empregadas a metodologia e as células de difusão padronizadas por BENTLEY (1994). O equipamento possui um banho termostaticado onde estão submersas 7 cubas, no interior das quais foi montado um suporte para fixação das membranas. No interior de cada cuba foram colocados 300 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 como meio de dissolução, mantido a temperatura de 37°C, por um banho de água.

Como suporte foram utilizados tubos cilíndricos de vidro, fixando em sua extremidade inferior a pele animal (camundongo sem pêlo), recentemente dissecadas, sendo que o lado inferior da pele ficou em contato com a solução receptora (Figura 8).

Uma alíquota de 2,0 mL da preparação de lipossomos contendo 5-ALA e 2,0 mL da solução de 5-ALA em tampão acetato de sódio pH 5,0 contendo 0,15% de HEC foram aplicadas sobre a membrana animal fixada ao suporte. A agitação do meio de dissolução foi feita por meio de pás de aço-inox, com velocidade de rotação 100 rpm.

Em intervalos de tempo pré- estabelecidos, foram retiradas alíquotas de 3,0 mL do meio de dissolução, repostas por igual volume de tampão. As alíquotas foram quantificadas pela técnica de Espectrofluorimetria, após a obtenção do derivado fluorescente do 5-ALA pela reação de derivação, descrita no item 3.2.1.1. O experimento foi realizado em quaduplicata.

Os resultados obtidos foram relacionados em um gráfico ($\mu\text{g}/\text{área de exposição} \times \text{tempo}$). A área de exposição foi de $5,7 \text{ cm}^2$.

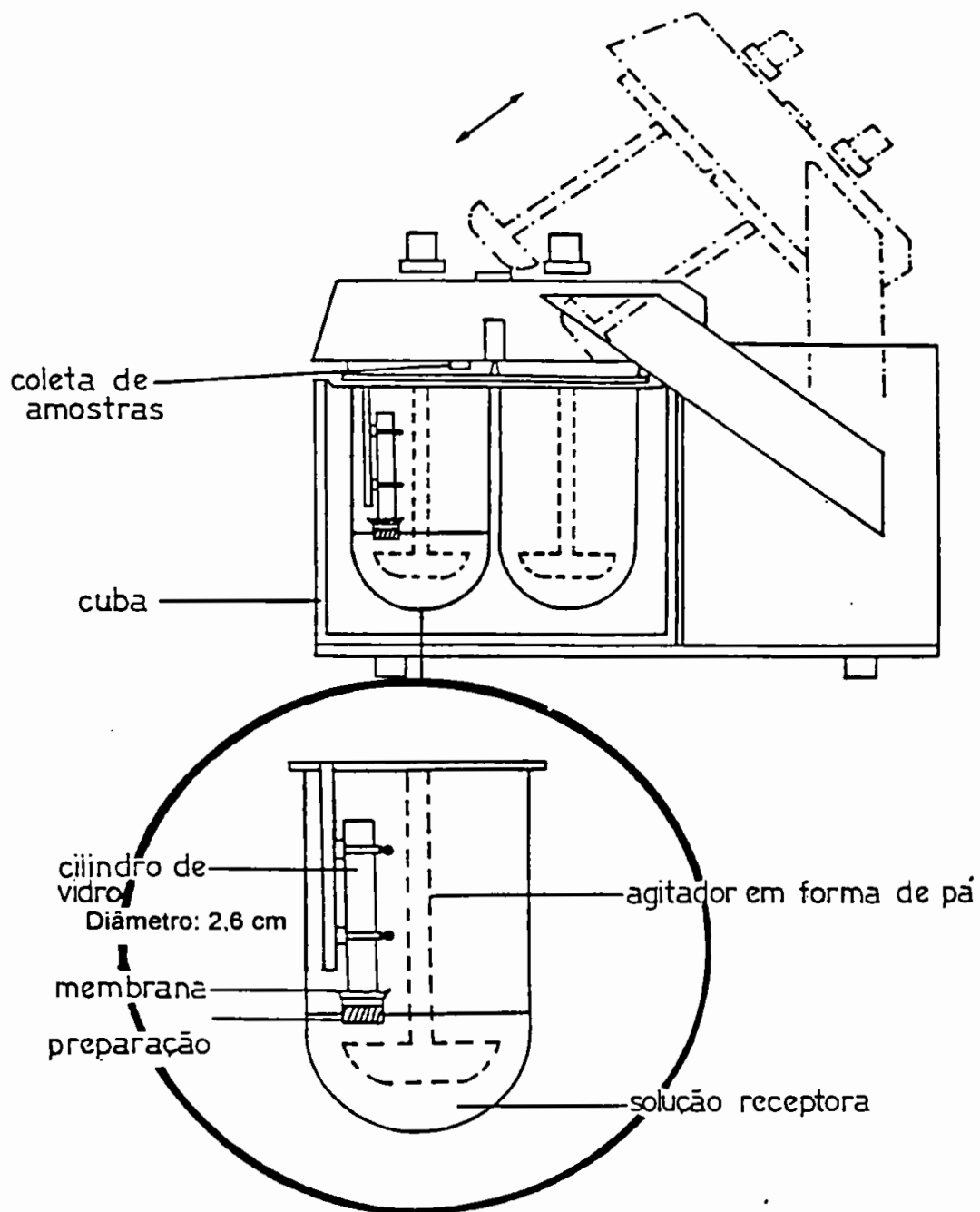


Figura 8 :Representação esquemática do equipamento utilizado para os estudos de permeação *in vitro* de 5-ALA em solução e 5-ALA em lipossomos (BENTLEY, 1994).

Ao final dos experimentos de permeação, as áreas das peles expostas ao meio de dissolução foram retiradas e limpas com algodão embebido em água destilada, a fim de retirar todo o excesso das formulações aplicadas. Em seguida foram pesadas, cuidadosamente recortadas e colocadas em tubos de plástico, onde foram adicionados 20,0 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0) e homogeneizada em homogeneizador de tecidos. A suspensão obtida foi filtrada em papel de filtro qualitativo. Uma alíquota de 50,0 μ L do filtrado foram submetidos a quantificação do 5-ALA. Os resultados obtidos expressam a quantidade de 5-ALA retido (μ g 5-ALA/g de pele).

3.2.6. Análise Estatística

Aplicou-se teste estatístico não paramétrico (Mann Whitney) para análise das amostras, através do programa GraphPad InStat tm, V2.02, NIMH 9309545.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da metodologia analítica para a quantificação do 5-ALA por Fluorimetria.

4.1.2. Obtenção da curva padrão para o 5-ALA.

A Figura 9 representa a curva padrão para o 5-ALA obtida pelas leituras das intensidades de fluorescência dos derivados do 5-ALA em função de suas respectivas concentrações, variando de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

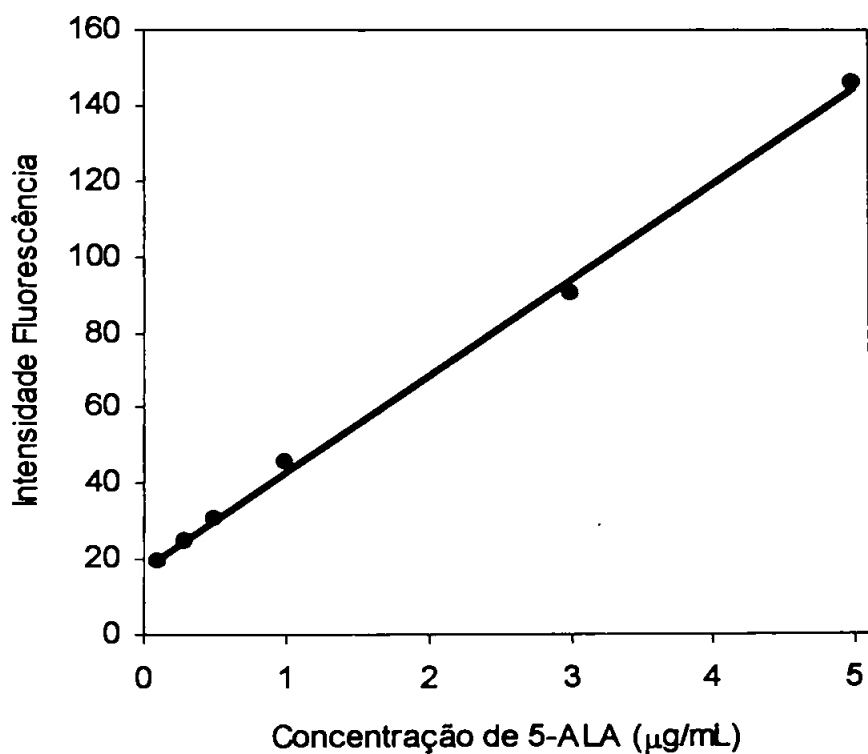


Figura 9. Curva padrão para o 5-ALA (0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$): concentração de 5-ALA ($\mu\text{g/mL}$) em função das intensidades de fluorescência dos derivados (λ de emissão: 460 nm; λ excitação: 370 nm; fenda: 5,0/2,5).

A Equação 1 foi obtida pela análise de regressão linear da curva padrão de 5-ALA, com concentrações variando de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Equação 1: $y = 25,431 x + 17,228$ ($r = 0,9990$)

Onde x representa a concentração de 5-ALA ($\mu\text{g/mL}$) e y representa a leitura de intensidade de fluorescência do derivado de 5-ALA para cada concentração.

4.2. Avaliação dos lipossomos obtidos

4.2.2. Cromatografia de exclusão em gel.

4.2.2.1. Determinação do volume morto (V_M) da coluna.

A **Figura 10** representa as frações eluídas da coluna em função das respectivas absorbâncias a 650 nm, para a determinação do volume morto da coluna pela eluição de Blue Dextrana.

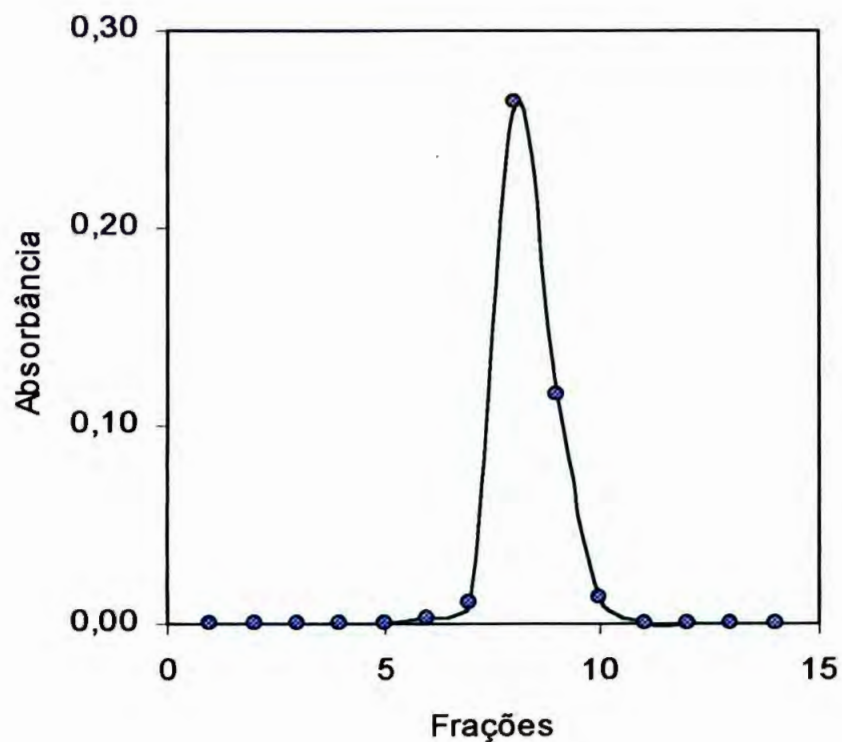


Figura 10. Frações eluídas da coluna em função das respectivas absorbâncias a 650 nm. As frações de 8 a 10 representam a eluição de Blue Dextrana.

4.2.1.2. Perfil de eluição dos lipossomos vazios (LUVETs e REVs).

A **Figura 11** mostra o perfil de eluição dos lipossomos vazios obtidos pela técnica de congelamento-descongelamento seguida por extrusão.

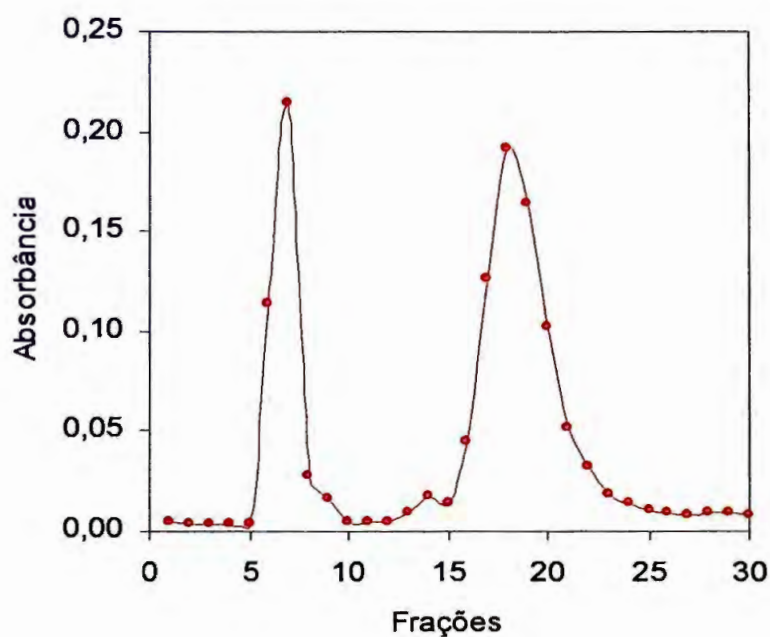


Figura 11. Frações de lipossomos vazios (LUVETs) eluídos da coluna em função das absorbâncias a 246 nm.

O gráfico mostra que os lipossomas vazios (LUVETs) eluem da coluna em duas etapas, ou seja, primeiramente junto com o V_M (fração 7) e em frações mais distantes do V_M (fração 18).

A Figura 12 mostra a eluição dos lipossomos vazios (REVs) obtidos pela técnica de evaporação em fase reversa, em função das suas respectivas absorbâncias máximas.

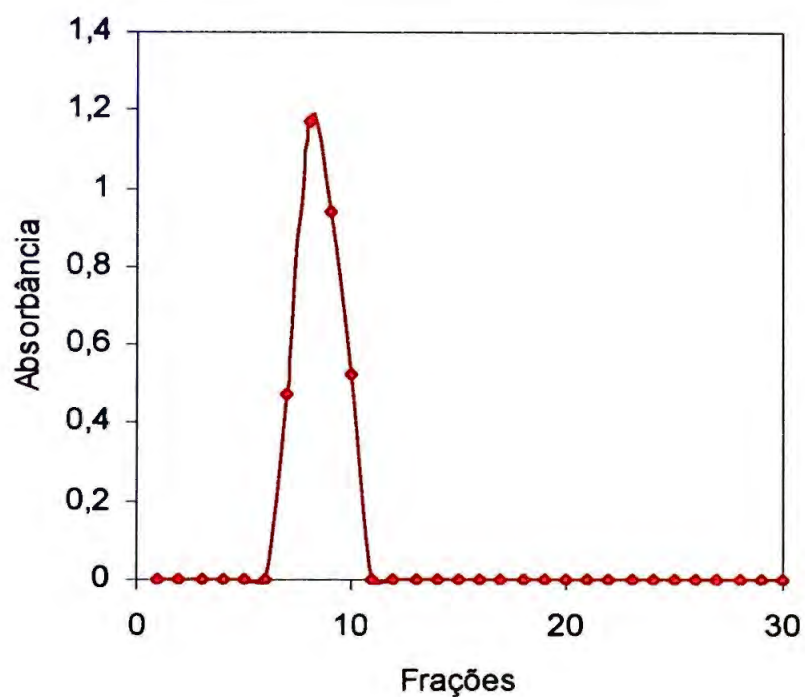


Figura 12: Frações de lipossomos vazios (REVs) eluídos da coluna em função das respectivas absorbâncias máximas.

4.2.1.3. Determinação do perfil de eluição do 5-ALA em solução.

A **Figura 13** mostra o perfil de eluição de 5-ALA em solução tampão. As frações foram submetidas à reação de derivação e leituras de intensidades de fluorescência (λ excitação: 370 nm; λ emissão: 460 nm), para a determinação do 5-ALA.

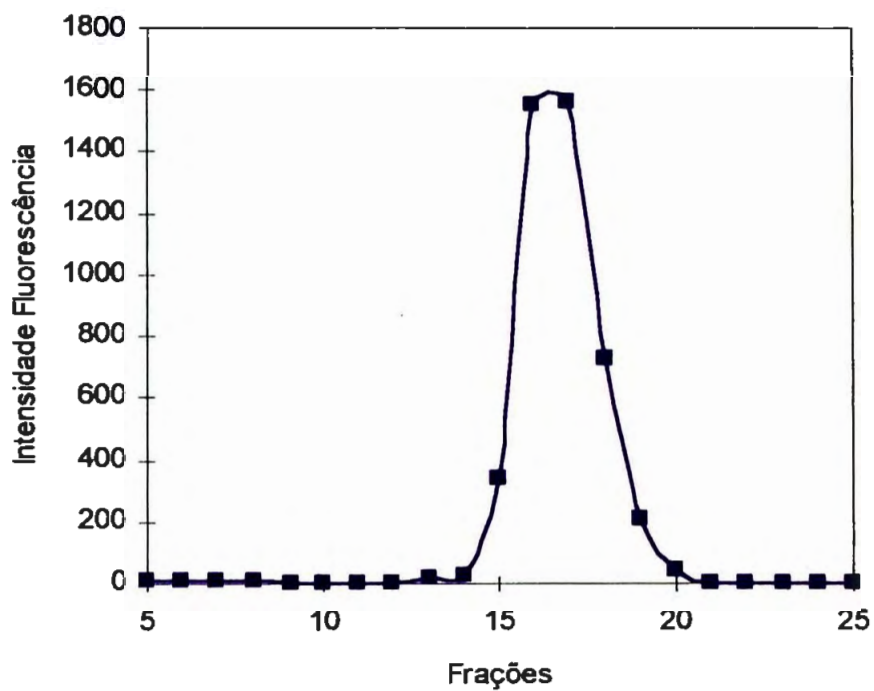


Figura 13: Frações de 5-ALA (1600 μ g/mL) eluídas da coluna em função das intensidades de fluorescências dos respectivos derivados a 460 nm.

Pelo gráfico acima, nota-se que a **fração 17** apresentou maior intensidade de fluorescência a 460 nm após reação de derivação, indicando que o 5-ALA em tampão elui em frações bem distantes do V_M .

4.2.1.4. Determinação do perfil de eluição de lipossomos (REVs) contendo 5-ALA

A **Figura 14** mostra o perfil de eluição de 5-ALA em lipossomos (REVs) em função das respectivas intensidades de fluorescência dos derivados a 460 nm.

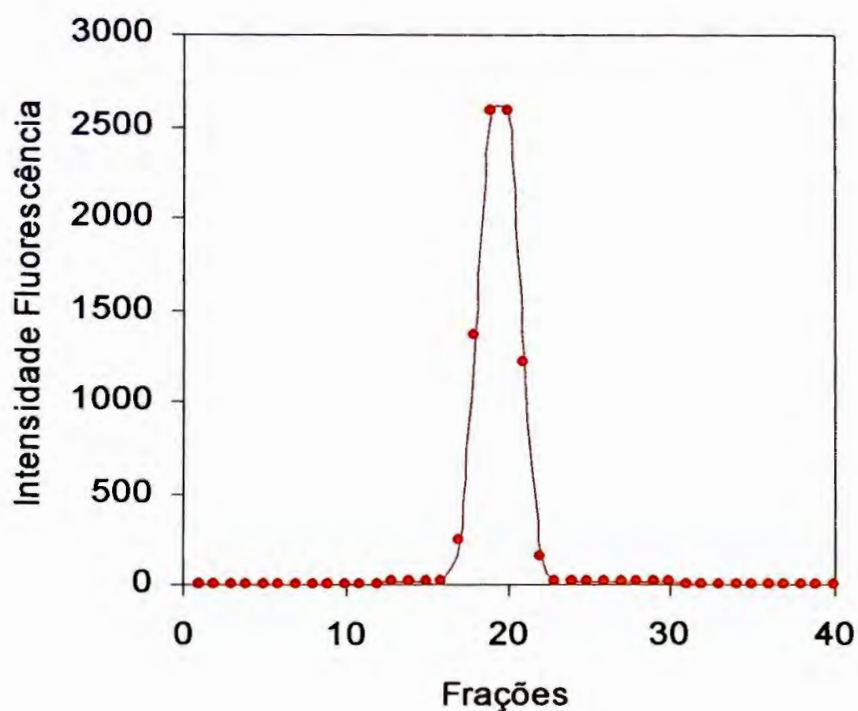


Figura 14: Perfil de eluição de 5-ALA em lipossomos (REVs) eluído da coluna em função das intensidades de fluorescência do derivado de 5-ALA (λ de excitação: 370 nm e λ de emissão: 460 nm).

4.2.1.4.1. Cálculo da porcentagem do 5-ALA encapsulado em lipossomos após eluição em coluna de exclusão.

Primeiramente, empregou-se a equação da reta obtida para a curva padrão do 5-ALA na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$, para os cálculos de intensidade de

fluorescência da preparação original (lipossomo contendo 5-ALA) antes da eluição na coluna de exclusão, por diluição apropriada das amostras.

Foram determinadas as quantidades de 5-ALA na soma das frações correspondentes à eluição dos lipossomos e ao 5-ALA livre (Tabela 1).

TABELA 1: Quantidade de 5-ALA determinado na preparação lipossômica inicial e nas frações eluídas na coluna de exclusão.

<i>Amostras</i>	<i>Quantidade de 5-ALA (μg)</i>
Preparação lipossômica inicial	1017,50
Frações Lipossômicas (frações de 7 a 12)*	5,75
Frações de 5-ALA livre (frações de 13 a 30)*	962,40

* Quantidades encontradas na soma dos volumes das frações.

4.2.1.5. Determinação do volume de etanol para solubilização das vesículas.

A Figura 15 representa as absorvâncias da fração de lipossomos vazios coletada da coluna em função das sucessivas adições de etanol (mL).

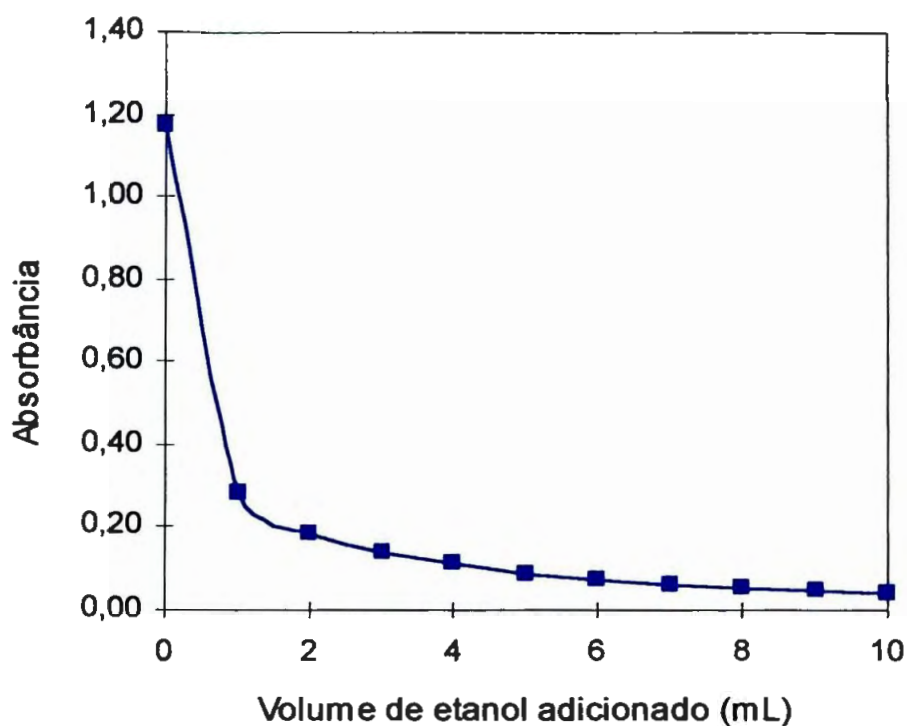
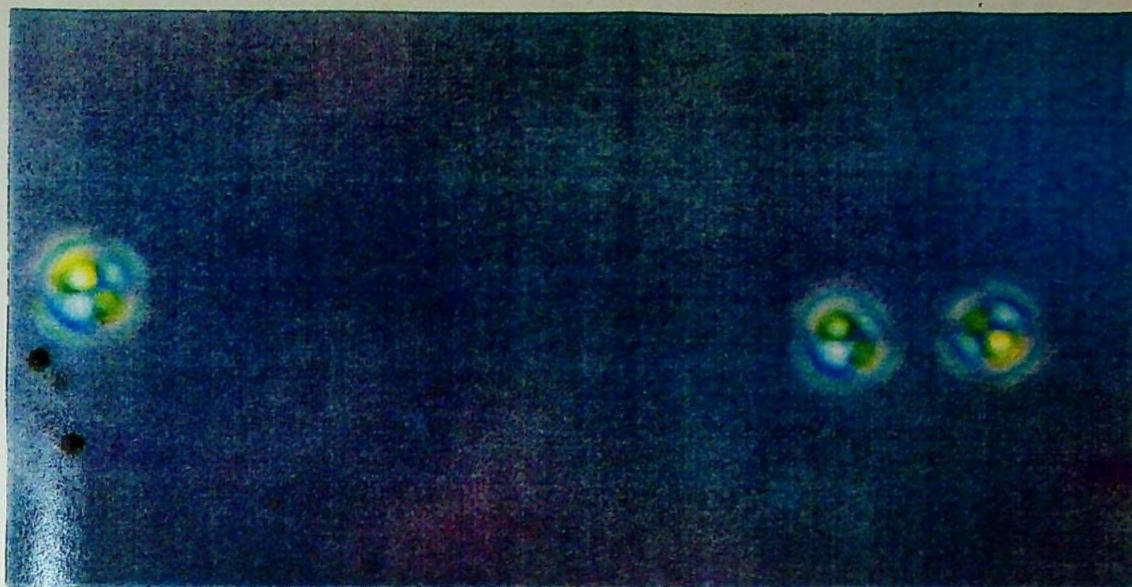


Figura 15: Volume de etanol adicionado (mL) em função das absorbâncias a 246 nm de 1,0 mL da fração 8 coletada da coluna.

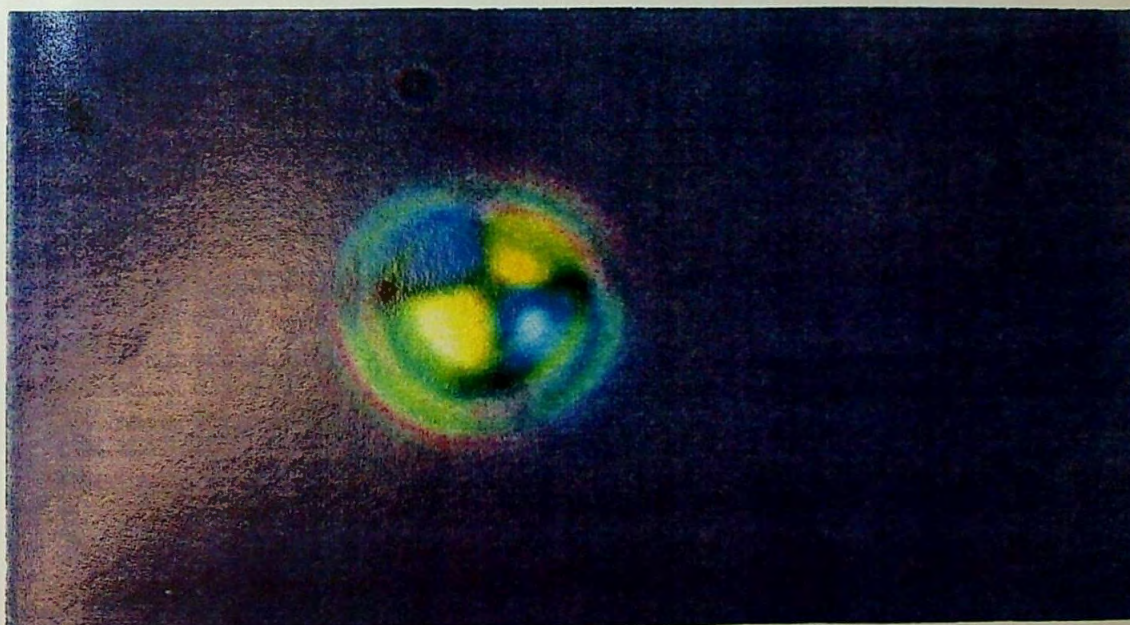
O volume de 5,0 mL de etanol é, portanto, o volume mínimo necessário para a solubilização de 1,0 mL da fração de lipossomas vazios (REV's). Foi padronizado, portanto, que para cada 1,0 mL de fração de lipossomos, são necessários 5,0 mL de etanol absoluto para o rompimento das vesículas.

4.2.2. Microscopia de luz polarizada

As **Figuras 16 e 17** mostram as fotomicrografias das vesículas lipossomais visualizadas sob microscópio de luz polarizada.

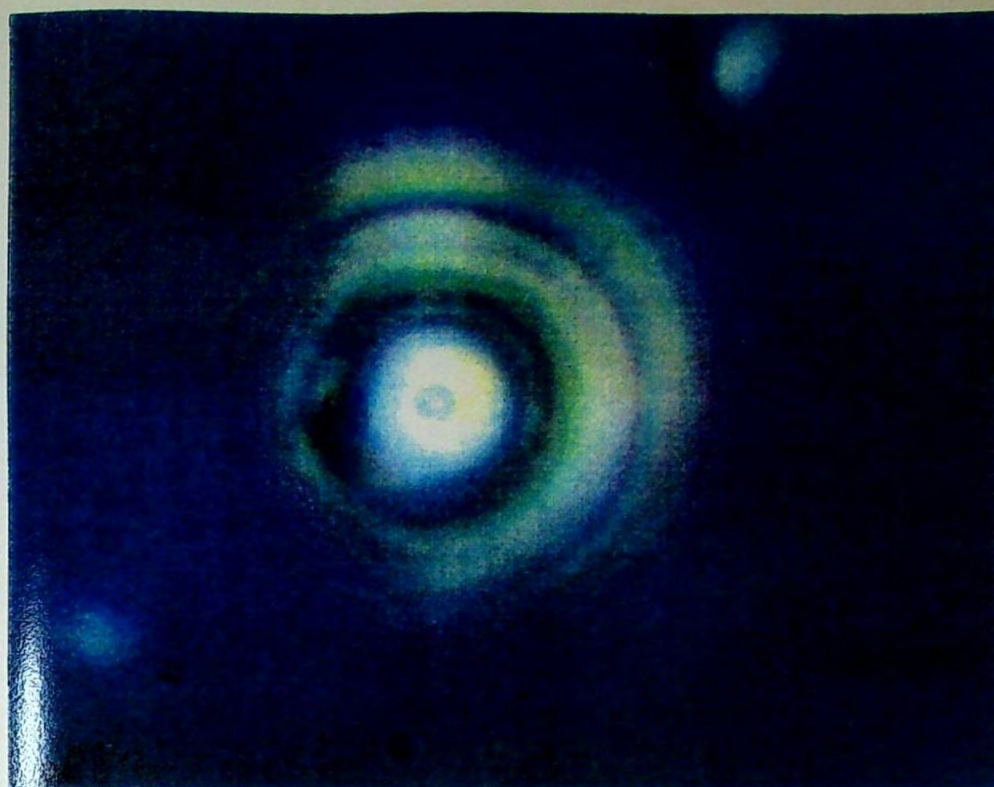


A



B

Figura 16: Fotomicrografias das vesículas lipossomais ($\approx 1 \mu\text{m}$) produzidas com lípidos do EC pela técnica de evaporação em fase reversa, visualizadas sob luz polarizada: cruz Maltese em A e B (aumento de 40x).



A



B

Figura 17: Fotomicrografias das vesículas lipossomais ($\approx 1\mu\text{m}$) produzidas com lipídeos do EC pela técnica de evaporação em fase reversa, visualizadas em campo de luz alta: aparência de “cebola” em A e B. (aumento de 40x).

4.2.3. Determinação do tamanho das vesículas por Espalhamento Dinâmico da Luz.

A **Figura 18** representa a distribuição de tamanho de partículas da preparação de lipossomos vazios determinadas pelo equipamento System 4700.

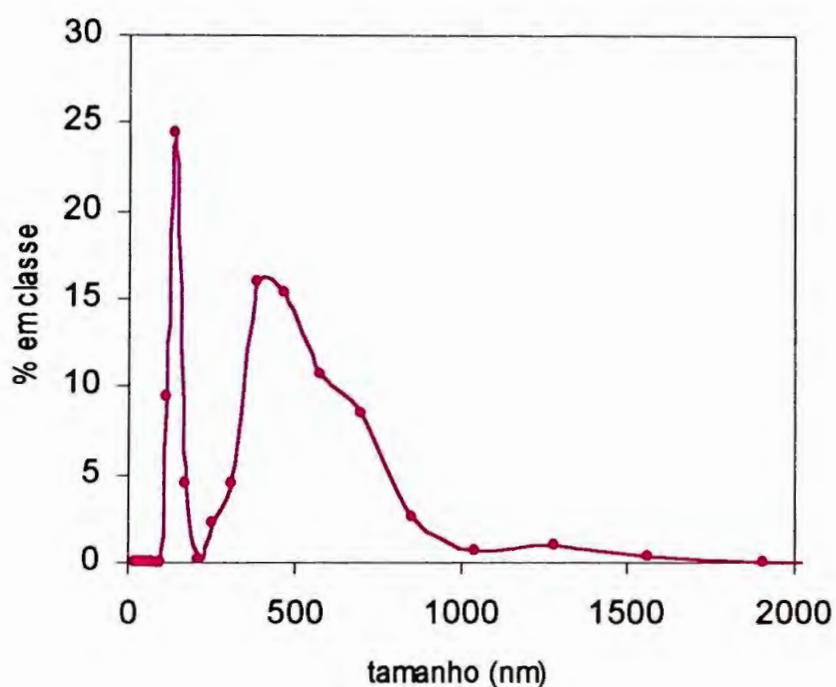


Figura 18. Distribuição de tamanho das vesículas lipossomais (REV's, após extrusão final em membrana de 1 μm), usando espectroscopia de correlação de fótons. Os valores referentes ao eixo y correspondem à intensidade de luz espalhada em porcentagem, de acordo com o tamanho médio das vesículas.(ângulo de espalhamento: 90°; temperatura: 25°C; viscosidade: 0,890; polidispersividade: 0,570; índice de refração do meio: 1,33). Principais picos: 139,4 nm e 500,3 nm.

A **Figura 19** mostra a distribuição de tamanho das vesículas da preparação de lipossomos contendo 5-ALA, determinadas pelo equipamento System 4700.

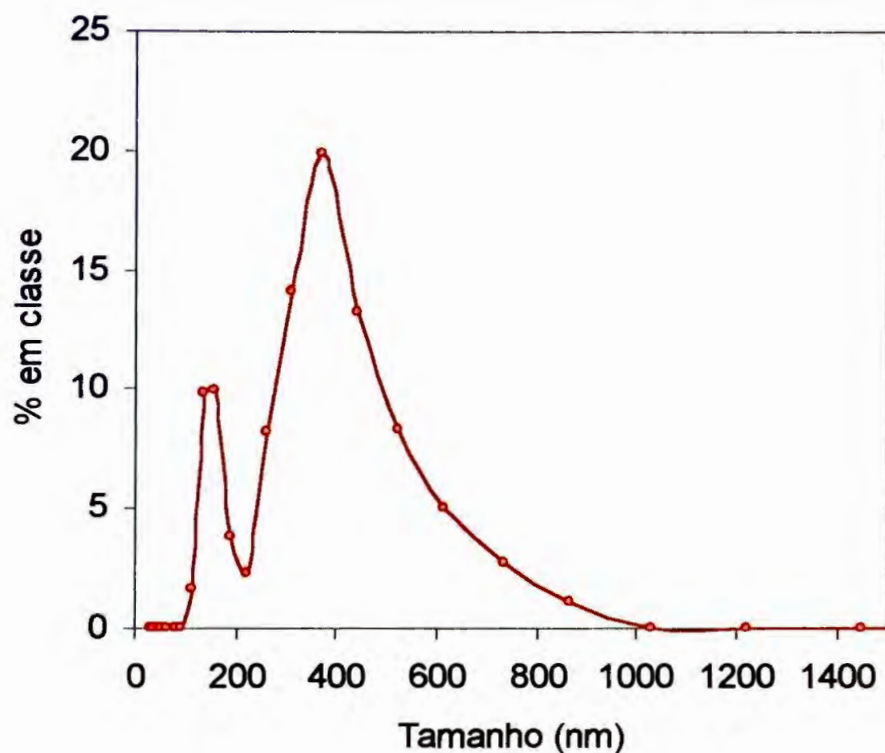


Figura 19: Distribuição de tamanho das vesículas lipossomais (REVs, após extrusão final em membrana de 1 μm), contendo 5-ALA (razão fármaco:lipídeos=1:3), usando espectroscopia de correlação de fóton. Os valores referentes ao eixo y correspondem à intensidade de luz espalhada em porcentagem, de acordo com o tamanho médio das vesículas (ângulo de espalhamento: 90°; temperatura: 25°C; viscosidade: 0,890; polidispersividade: 0,570; índice de refração do meio: 1,33). Principais picos: 156,8 nm e 400,1 nm.

4.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A **Figura 20** e **21** representam as curvas de DSC (primeiro e segundo aquecimento) dos lipídeos isolados e mistura representativa da composição lipídica do EC, contendo ou não o fármaco 5-ALA.

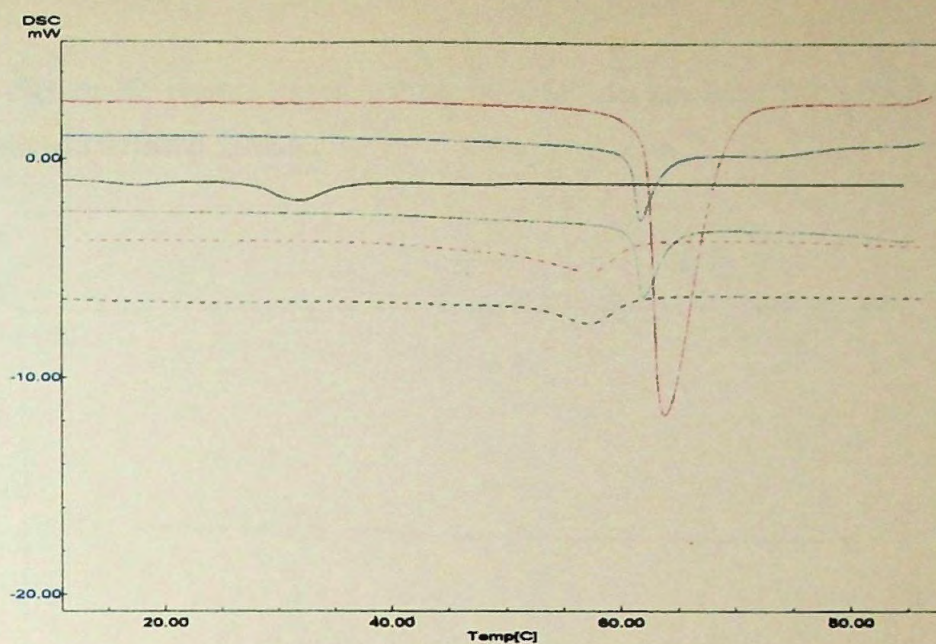


Figura 20: Curva de DSC do primeiro aquecimento: (—) ácido palmítico; (—) colesterol; (—) ceramida; (—) sulfato de colessterila; (----) mistura lipídica e (---) mistura lipídica contendo 5-ALA respectivamente. Razão de aquecimento: 5° C/min.

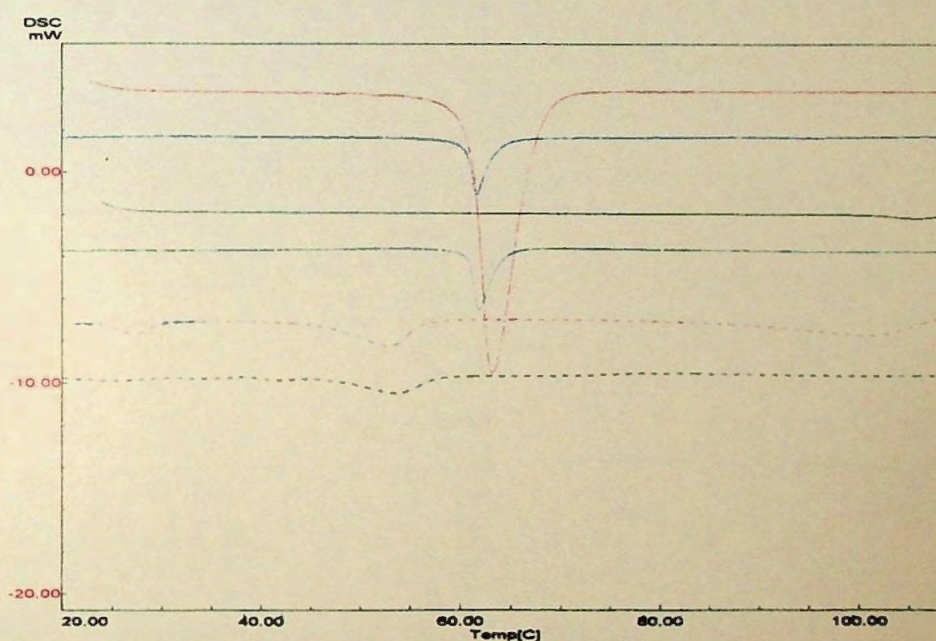


Figura 21: Curva de DSC do segundo aquecimento: (—) ácido palmítico; (—) colesterol; (—) ceramida; (—) sulfato de colessterila; (----) mistura lipídica e (---) mistura lipídica contendo 5-ALA respectivamente. Razão de aquecimento: 5° C/min.

A Figura 22 representa as curvas de DSC do primeiro (a) e segundo (b) aquecimentos do fármaco 5-ALA.

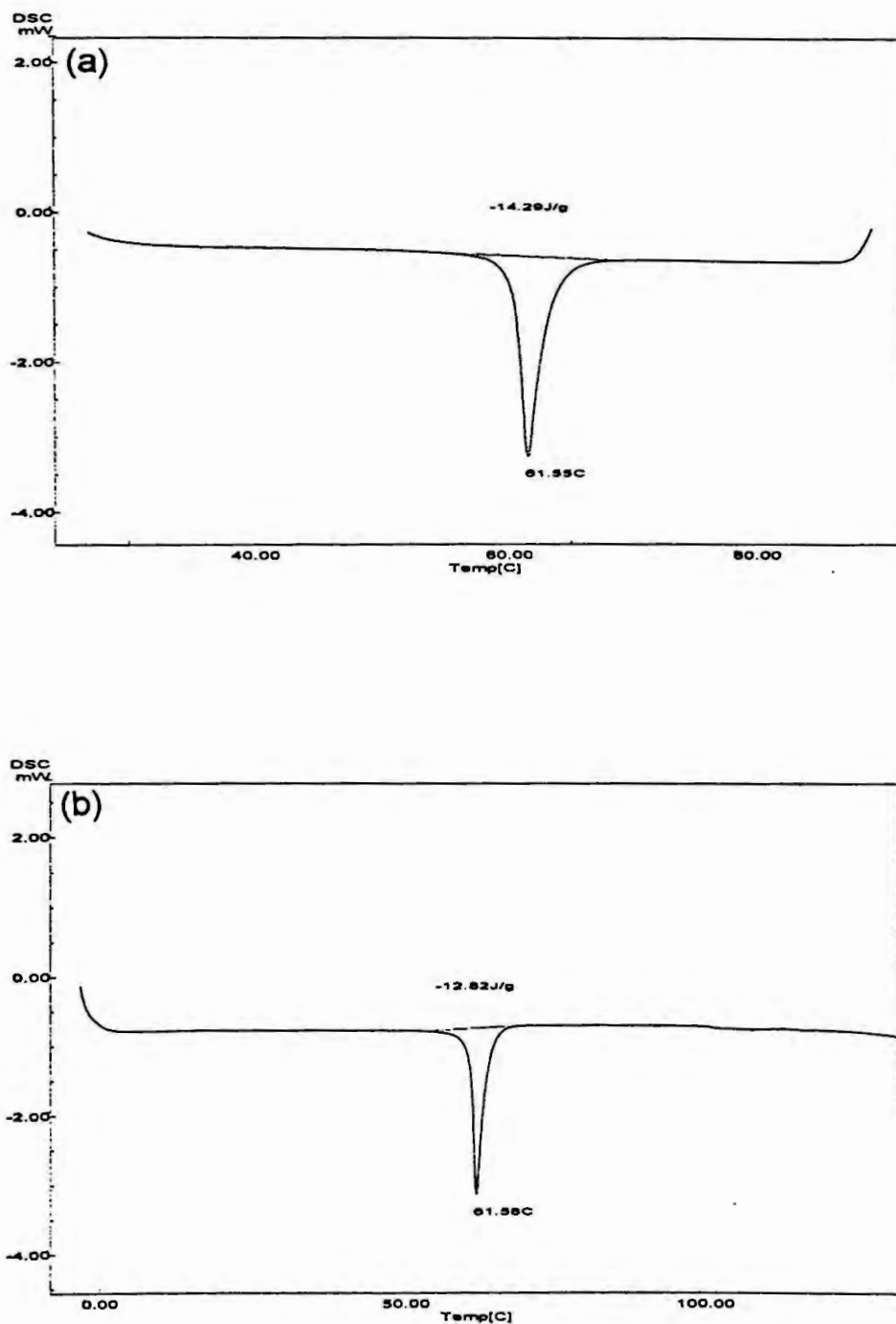


Figura 22: Curvas de DSC do primeiro (a) e segundo (b) aquecimentos do fármaco 5-ALA. Razão de aquecimento: 5° C/min.

Pela análise das curvas obtidas foi possível verificar as temperaturas de transição e respectivas entalpias envolvidas nos eventos. A **Tabela 2** indica estes valores.

Tabela 2: Temperaturas de transição e entalpias obtidas pela análise de DSC das amostras lipídicas.*

Amostra	<i>Temperatura (s) de transição (°C)</i>		<i>Entalpia (J/g)</i>	
	1º aquecimento	2º aquecimento	1º aquecimento	2º aquecimento
Ácido palmítico	63,31	63,83	-132,41	-133,11
Colesterol	61,78	61,7	-22,15	-17,91
Ceramida	32,4	105	-13,04	-----
Sulfato de colessterila	61,89	62,02	-22,92	-26,51
5-ALA puro	61,55	61,52	-14,29	-12,82
Mistura lipídica	57,17	52,93	-46,64	-25,64
Mistura lipídica com 5-ALA	57,23	53,68	-25,62	-16,18

* Primeiro aquecimento: de 5° C a 110° C; segundo aquecimento: de 0 a 110°C; razão de aquecimento: 5° C/min.

4.4. Estudos *in vitro* de Permeação e Retenção cutâneas.

4.4.1. Estudos *in vitro* de permeação cutânea.

A **Figura 23** mostra o perfil de permeação de 5-ALA através da pele de camundongo sem pêlo em função do tempo.

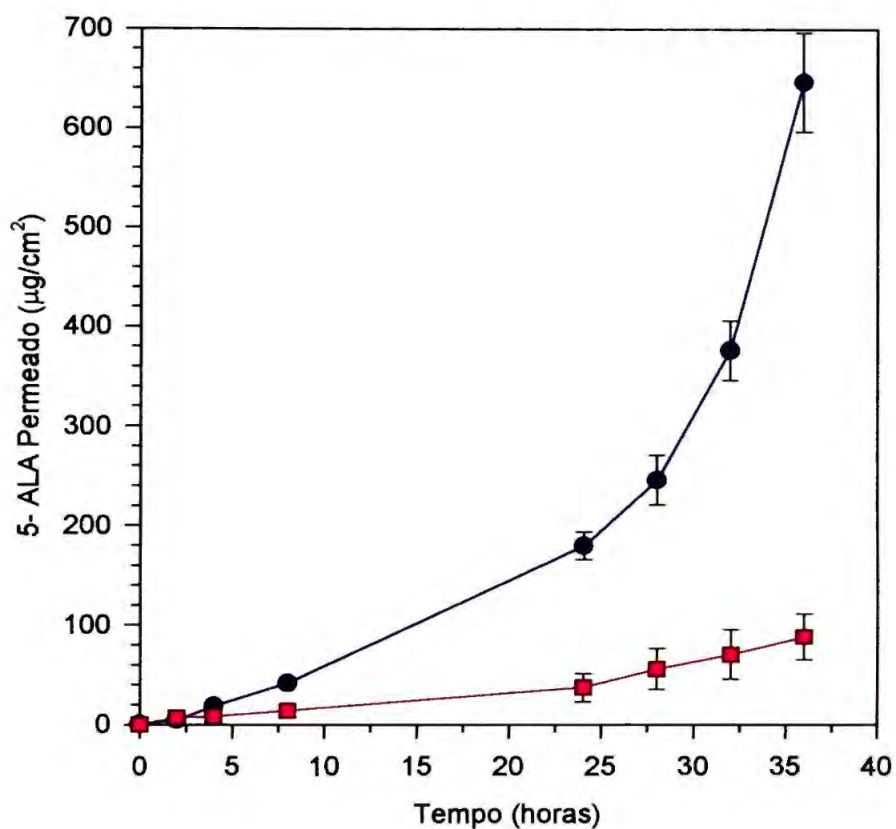


Figura 23: Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através da pele de camundongo sem pêlo, a partir de uma solução aquosa (●) e dos lipossomos (■) em função do tempo.

4.4.2. Estudos de Retenção *in vitro*.

A **Tabela 3** representa os valores de concentração de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e 5-ALA retido ($\mu\text{g}/\text{g}$) na pele do animal para o 5-ALA aplicado em solução aquosa e para o 5-ALA em lipossomos.

Tabela 3. Valores de retenção e permeação *in vitro* para o 5-ALA ao final dos estudos de permeação (36 horas).

Formulação	Concentração de 5-ALA retido na pele ($\mu\text{g/g}$) *	Concentração de 5-ALA permeado ($\mu\text{g/cm}^2$)*
Solução aquosa	86,14 (\pm 21,28)	3681 (\pm 104,65)
Lipossomos	390,34 (\pm 56,86)	500,9 (\pm 32,47)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão da média (n=5).

*Teste estatístico não paramétrico- Mann Whitney; $p < 0,05$, diferença significativa.

A **Figura 24** representa os valores de permeação e retenção *in vitro* para o 5-ALA ao final dos estudos de permeação (36 horas).

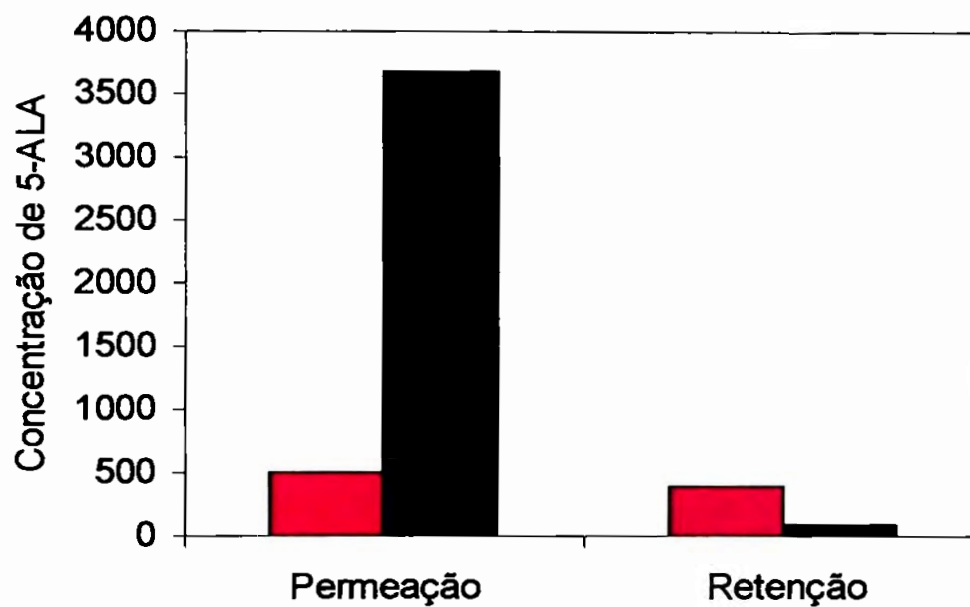


FIGURA 24: Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g/mL}$) e retido ($\mu\text{g/g}$) na pele de camundongo sem pêlo, a partir da formulação de lipossomos (■) e de uma solução aquosa (■) contendo 5-ALA.

5. DISCUSSÃO

A TFD- ALA tópica representa uma nova modalidade terapêutica não invasiva para o tratamento de várias anomalias cutâneas como queratose solar, psoríase e tumores superficiais, incluindo carcinoma de células escamosas, doença de Bowen e carcinoma basocelular superficial (WOLF et al., 1993; KARRER et al., 1995; MALIK et al., 1995; STABLES et al., 1997). Trata-se da utilização do pró-fármaco 5-ALA que, aplicado topicamente, é bioconvertido na pele através do ciclo do heme em uma substância fotossensibilizante, a Protoporfirina IX (PpIX), a qual, sob a incidência de luz na região do visível torna-se fototóxica, destruindo assim, as células cancerosas (PENG et al., 1997). Esta terapia viabiliza o tratamento de grandes áreas tumorais e lesões localizadas em regiões onde outras modalidades de tratamento (excisão, crioterapia, eletrodissecação, quimioterapia tópica e radioterapia) podem ser problemáticas (WOLF & KERL, 1995).

Mais recentemente, RICK et al. (1997) verificaram que a aplicação tópica seria mais adequada do que outras vias. Observaram que, quando da administração de 5-ALA por outras vias (sendo a oral mais rotineira), a fotossensibilização induzida pela formação e acúmulo de PpIX foi bastante significativa, sendo observado alto risco de reações fototóxicas após aplicação de 5-ALA quando o indivíduo era exposto à luz artificial. Do mesmo modo, os valores de PpIX encontrados no plasma destes pacientes após administração sistêmica foram elevados, contribuindo para o aparecimento dos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, sintomas neurológicos, e outros.

Entretanto, quando 5-ALA foi aplicado topicamente (pomada), os níveis de PpIX no plasma ficaram abaixo do limite de detecção e os efeitos colaterais foram eliminados. Isto significa que a PpIX, quando da aplicação tópica, é acumulada nas células epiteliais pela síntese seletiva de 5-ALA, ou seja, a maior parte da PpIX encontrada nos tecidos é sintetizada *in situ*. Entretanto, apesar da PDT-ALA tópica apresentar-se como uma terapia seletiva aos locais das lesões, bem como o EC anormal do tecido canceroso apresentar maior permeabilidade, o 5-ALA é uma substância altamente hidrofílica, o que dificulta sua penetração (PENG et al., 1997). Assim, sistemas de liberação que aumentem sua penetração e retenção nas camadas da pele constituem uma otimização da terapia.

Um sistema de liberação não deve atuar somente como uma formulação auxiliar, mas também alterar a biodistribuição de fármacos de tal modo que uma fração maior do mesmo alcance o sítio alvo. No caso de medicamentos a serem aplicados na pele, a otimização da penetração apresenta-se vantajosa, uma vez que o EC constitui um passo limitante para este processo. Este fato apresenta-se importante, tendo em vista que o 5-ALA tem a propriedade de penetrar apenas a poucos milímetros na queratina anormal, constituindo assim, uma limitação da TFD- ALA tópica para o tratamento de câncer de pele (CODERCH et al., 1996; MARTIN et al., 1995).

Existem opiniões divergentes acerca da penetração dos lipossomas na pele. Entretanto, alguns estudos demonstraram a interação de vesículas lipossomais com as camadas da pele (KORTING et al., 1995). Há fortes indícios que o grau de interação entre as dispersões vesiculares e a pele dependem principalmente das propriedades físico-químicas dos compostos que formam os lipossomos, além do método de preparação, da morfologia das vesículas, como tamanho e lamelaridade e do estado líquido ou gel destas vesículas (HOFLAND et al., 1995; UCHIYAMA et al., 1995).

Assim sendo, novos sistemas de liberação de fármacos na forma de lipossomos estão sendo desenvolvidos quando uma formulação existente não é satisfatória e a reformulação oferece segurança e eficácia terapêutica superiores. As formulações lipossomais de alguns fármacos têm mostrado um aumento significativo na eficácia terapêutica e/ou índices terapêuticos em modelos pré-clínicos e em humanos, comparados as suas formulações não-lipossomais (SHARMA & SHARMA, 1997).

Com o intuito de se obter sistemas lipossômicos que possuam uma maior interação com o tecido cutâneo foram empregados lipídeos que estão presentes na pele, obtendo-se lipossomas formados por composições lipídicas do EC. Assim, a penetração e a liberação do 5-ALA nas diversas camadas da pele poderia ser otimizada.

O EC de mamíferos contém múltiplas bicamadas lipídicas intercelulares que constituem a barreira epidermal à perda de água ou barreira hidrofóbica. A matriz lipídica é responsável pela hidratação do EC, bem como pela regulação da penetração de produtos topicamente aplicados (POTTS & FRANCOEUR, 1991; ROUGIER et al., 1985). Tais lipídeos constituem 10% em peso seco do EC. As lamelas do EC são formadas por ceramidas (50%), ácidos graxos livres (10-20%), colesterol (25%), sulfato de colesterila (5%) e, ao contrário de todas as outras membranas biológicas, não contém fosfolipídeos,

fato este que provoca surpresa devido ao fato da capacidade destes em formar bicamadas (LONG et al.; 1985). Outros autores estudaram a possibilidade de formação de bicamadas usando lipídeos do EC e glucosil- ceramidas, obtendo bicamadas estáveis pela primeira vez sem fosfolipídeos. Entretanto, o EC não contém glucosil- ceramidas e, sendo o componente mais polar da mistura, esta deve ter sido a maior contribuição para a formação da bicamada (WERTZ et al., 1986).

Estudos posteriores reinvestigaram a capacidade de formação de bicamadas de lipídeos do EC usando somente aqueles lipídeos que estão presentes na epiderme cornificada, ou seja, usando somente ceramidas, colesterol, ácido palmítico e sulfato de colesterila nas concentrações de 40%, 25%, 25% e 10% respectivamente (WERTZ et al 1986). Aproximando ao máximo a composição lipídica do EC pode-se constatar a formação de lipossomas estáveis. Assim sendo, misturas lipídicas semelhantes àquelas encontradas no EC são capazes de formar bicamadas a pH fisiológico.

A maior eficiência de formulações lipossomais compostas de "lipídeos da pele" comparada aos sistemas lipossômicos baseados em fosfolipídeos (ambos estudados *in vitro* e *in vivo*) são interpretadas em termos de uma maior facilidade de ocorrer uma "mistura molecular" dos lipossomos formados de lipídeos da pele com os lipídeos do EC. Esta é uma hipótese considerável, já que tais lipossomas possuem componentes lipídicos similares àqueles encontrados no EC (EGBARIA & WEINER, 1993).

A **Figura 25** mostra a representação esquemática de uma vesícula lipossômica formada por lipídeos do EC (SCHMIDTGEN et al., 1998).

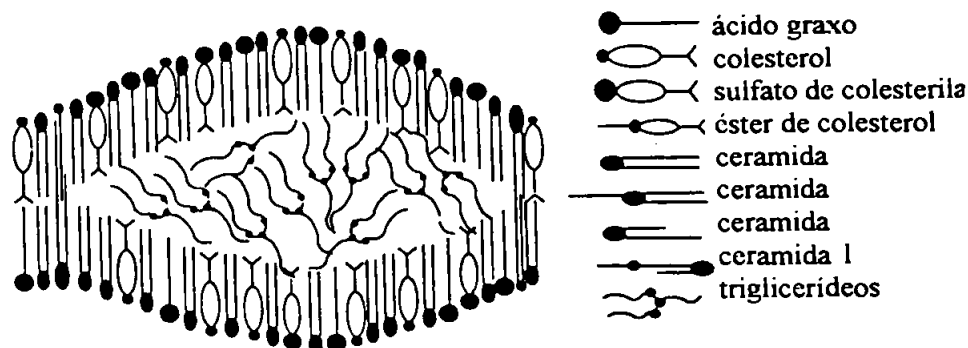


Figura 25. Representação esquemática de uma vesícula lipossômica de lipídeos do EC, segundo SCHMIDTGEN et al (1998).

Alguns trabalhos recentes relatam a obtenção de lipossomos de lipídeos do EC, onde a porcentagem dos componentes é bastante semelhante nos diversos experimentos. Também diferentes métodos de preparação deste tipo de lipossomo são descritos: Método de *congelamento-descongelamento* seguido por extrusão em membranas de policarbonato de tamanho definido (DOWNING et al., 1993; MANDAL & DOWNING, 1993; HATFIELD & FUNG, 1995) bem como método de *sonicação* com ponta de titânio (DE LA MAZA et al., 1998; LIN et al., 1998; SCHMIDTGEN et al., 1998) ou com banho sonicador (ABRAHAM et al., 1988). Nestes trabalhos, vários tampões a diferentes pHs são utilizados para a obtenção dos lipossomos.

SCHMIDTGEN et al. (1998) prepararam lipossomos de lipídeos do EC em dois valores de pH (5,0 e 7,4), utilizando-se de diferentes métodos de obtenção (extrusão, sonicação e solubilização por detergente), bem como lipossomos formados de fosfolipídeos, a fim de observar a morfologia das vesículas lipossômicas. Neste estudo, concluíram que a morfologia dos lipossomos de lipídeos de EC foi bastante diferente daqueles formados por fosfolipídeos, e que no pH 5,0, as estruturas formadas foram semelhantes àsquelas preparações a pH 7,4, sendo este o pH de maior estabilidade para as vesículas lipossômicas compostas por lipídeos do EC.

No presente trabalho, empregou-se o valor de pH de maior estabilidade também para o fármaco 5-ALA a ser encapsulado, ou seja, pH 5,0 (DE ROSA, 1999).

A literatura indica variadas concentrações lipídicas, na faixa entre 1,8 a 5,0 mg/mL, sendo esta última a mais frequente (ABRAHAM & DOWNING, 1990; SUHONEN et al., 1997; LIN et al., 1998). No presente estudo, foram obtidos lipossomos na concentração de 5 mg/mL, afim de obter maior concentração de vesículas lipossômicas e, provavelmente, uma maior eficiência de encapsulação. As preparações lipossômicas continham na fase aquosa 0,15% de hidroxietilcelulose (HEC). Esta concentração foi padronizada anteriormente e escolhida devido apresentar viscosidade adequada para obtenção de lipossomos de lipídeos do EC durante o procedimento de extrusão.

Um outro aspecto muito importante no desenvolvimento deste projeto foi a escolha de vesículas lipossômicas de tamanho e lamelaridade adequadas aos nossos propósitos. Os fatores levados em consideração foram a hidrossolubilidade alta do 5-ALA e o volume de captura na vesícula. Assim, as LUVS apresentaram-se mais adequadas aos nossos objetivos, uma vez que o aprisionamento de um maior volume aquoso inferiria em uma maior quantidade de 5-ALA encapsulado.

As MLVs, devido ao seu maior tamanho, podem dificultar a penetração de fármacos na pele, pois o grau de penetração na pele é reduzido à medida que aumenta o tamanho das vesículas. Estas vesículas possuem uma ampla distribuição de tamanho e um número variável de bicamadas numa mesma preparação, o que torna difícil uma quantificação adequada do soluto encapsulado. Em contrapartida, são estruturas mais estáveis (NATSUKI et al., 1996). As LUVs são comparativamente mais estáveis do que as SUVs e podem ser caracterizadas mais quantitativamente em termos de concentração lipídica, área de superfície, e volume do que os sistemas de vesículas multilamelares (MLVs) (HATFIELD & FUNG, 1995).

Desse modo, as principais vantagens da obtenção de LUVs se tornam claras: (i) obtenção bastante reprodutível; (ii) alta capacidade de encapsulação para substâncias hidrofílicas devido à maior capacidade de captura de fase aquosa e; (iii) quantidade de substância encapsulada no interior aquoso pode ser facilmente calculada, uma vez que possuem uma única lamela.

Definido o tipo de vesícula a ser obtida, testaram-se dois métodos de preparação de LUVs: congelamento- descongelamento (LUVETs) e evaporação por

fase reversa (REVs), ambos seguido por extrusão. A técnica de congelamento-descongelamento é proposta por vários autores para a obtenção de vesículas grandes e estáveis (PICK, 1981; MAYER et al., 1985). A composição lipídica do EC utilizada no presente estudo forneceu por esta técnica *duas populações* de lipossomas com faixas diferentes de tamanho, observadas pelos dois picos de eluição na coluna de exclusão em gel (Figura 11). Este comportamento não é interessante para um método de obtenção de lipossomos. Entretanto, a técnica de evaporação por fase reversa deu origem à REVs com somente *uma faixa* de tamanho, uma vez que eluíram em uma fração principal única na cromatografia de exclusão em gel (Figura 12). Assim sendo, as REVs mostraram-se mais apropriadas aos nossos propósitos e foram utilizadas nos estudos seguintes.

O método empregado para a obtenção das REVs foi o proposto por SZOKA & PAPAHAADJOPOULOUS (1978). Segundo estes autores, a sonicação inicial da fase aquosa tamponada no solvente orgânico contendo lipídeos, produziu gotículas de água menores estabilizadas por uma monocamada lipídica. Estas gotículas ou “micelas inversas” foram então colapsadas em um estado viscoso como gel, quando a fase orgânica foi removida por evaporação. O ponto crítico neste procedimento é, provavelmente, quando o estado gel colapsa. Neste ponto, algumas das micelas inversas desintegram, liberando seu material encapsulado; o excesso de lipídeos contribui para formar uma bicamada completa em torno das micelas remanescentes, resultando na formação das vesículas (LUVs).

Este método pode encapsular macromoléculas grandes tão eficientemente quanto compostos de baixo peso molecular. A maioria dos lipossomos produzidos são unilamelares e produz alta eficiência de encapsulação de fase aquosa (20- 68%). A principal desvantagem deste método seria a exposição do material a ser encapsulado aos solventes orgânicos. Na preparação lipossômica estudada empregou-se tampão acetato com concentração iônica baixa (100mM) para garantir uma encapsulação mais eficiente.

As distribuições de tamanho obtidas para a maioria das misturas fosfolipídicas são quase uniformes e a heterogeneidade de tamanho pode ser reduzida por extrusão através de membranas de policarbonato. Combinando o método da extrusão com a técnica de fase reversa para obter LUVs, SZOKA & PAPAHAADJOPOULOUS, (1980)

obtiveram lipossomos mais homogêneos, mas com diminuição da eficiência de encapsulação para 12-25% de fase aquosa para a composição lipídica por eles utilizada.

Assim, lipossomos do tipo LUVs obtidos por evaporação por fase reversa foram escolhidos para encapsular o 5- ALA, devido possuírem alta razão de compartimento aquoso:lipídico, podendo- se obter maior quantidade de fármaco hidrossolúvel encapsulado em uma quantidade menor de lipídeos.

Uma das vantagens do processo de extrusão é a possibilidade de ampliação para escala industrial, simplesmente por aumento da área da membrana (NEW, 1989 a). Além disso, o método da extrusão é um procedimento para a obtenção rápida das LUVs, não emprega solventes orgânicos ou tensoativos e produz uma população relativamente homogênea de vesículas unilamelares, onde a distribuição de tamanho é centrada no tamanho do poro do filtro utilizado (HOPE et al., 1985).

Os filtros de membrana empregados nos experimentos foram do tipo “nucleation track”, os quais consistem de uma lâmina fina de polímero (usualmente policarbonato) na qual os poros não traçam um caminho tortuoso, mas são coincidentes de um e do outro lado da membrana. Devido a isto, oferecem muito menos resistência ao material que passa. A flexibilidade inerente das lamelas lipídicas permitem aos lipossomos mudarem suas conformações, tanto que podem se espremerem através destes poros. Entretanto, lipossomos que são muito maiores que o tamanho dos poros serão quebrados no processo e sairão dos poros da membrana menores que antes. Após várias passagens através da membrana, uma população de lipossomos será reduzida em tamanho para um diâmetro médio um tanto menor que o diâmetro do poro da membrana, mas ainda com uma pequena proporção fracamente maior que os poros, tendo se espremido através da membrana sem se quebrar.

Para o estudo da determinação do grau de encapsulamento do 5-ALA nos lipossomos de lipídeos de EC, foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão em gel. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso para separar a porção do fármaco não encapsulado (fármaco livre) da porção do fármaco encapsulado em lipossomos. (JEDERSTROM & RUSSEL, 1981; VEMURI & RHODES, 1994).

As preparações de lipossomos são uma mistura de frações do fármaco encapsulado e não encapsulado. A fração do fármaco não encapsulado é também chamada de fármaco “livre”. Na maioria dos procedimentos, as frações de fármaco livre

e encapsulado são separadas para avaliar a concentração de fármaco livre como um primeiro passo experimental. Então, a fração encapsulada do fármaco é tratada com um tensoativo ou com um solvente adequado (no caso, etanol), para quebrar os lipossomos e, assim, liberar completamente o fármaco aprisionado, o qual será quantificado por metodologia adequada (VEMURI & RHODES, 1995). No presente trabalho, o 5-ALA foi identificado por espectrofluorimetria após a obtenção de um derivado fluorescente, baseando-se no método de OISHI et al. (1996). Esta metodologia apresentou-se sensível e seletiva em todas as etapas experimentais que exigiram a identificação e quantificação do 5-ALA. O método apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0,9990$).

Após a passagem da amostra de lipossomos ou solução aquosa contendo 5-ALA pela coluna, as frações obtidas foram submetidas à reação de derivação do 5-ALA para que o derivado fluorescente formado possa indicar a presença de 5-ALA e também quantificá-lo. Deve-se lembrar que o 5-ALA não encapsulado eluirão em frações bem distantes do volume morto (V_M) da coluna.

Antes de se efetuar a reação de derivação, as frações lipossômicas foram solubilizadas a fim de causar a liberação do 5-ALA encapsulado e, assim, tornar possível sua identificação e quantificação. Para tanto, foi realizado o ensaio para a determinação do volume mínimo de etanol capaz de “quebrar” estas vesículas, empregando-se lipossomos sem 5-ALA. Primeiramente, verificou-se qual fração coletada da coluna correspondeu aos lipossomos, através das leituras de absorvância no comprimento de onda específico da preparação ($\lambda=246\text{ nm}$). Assim, uma alíquota desta fração foi utilizada para o ensaio. A medida que a concentração de etanol aumenta, as moléculas de água associadas aos grupos hidrofílicos da preparação lipossômica são deslocadas e substituídas pelas moléculas de etanol, as quais se distribuem dentro da região hidrofóbica da bicamada, rompendo a bicamada (KOMATSU & OKADA, 1995). O acompanhamento da solubilização das vesículas pelo etanol (Figura 15) foi realizado medindo-se a absorvância da fração de lipossomos vazios antes e após cada adição de etanol. Quando a leitura de absorvância desta foi constante definiu-se o volume de etanol mínimo para a solubilização. No presente estudo, o volume mínimo foi 5,0 mL de etanol absoluto para cada mL da fração de lipossomos.

Na verificação do grau de encapsulamento verificou-se a presença de 5-ALA somente nas frações distantes do V_M da coluna, as quais representam as frações de 5-ALA livre (Figura 14). Assim, constatou-se que a encapsulação do 5-ALA nos lipossomos de lipídeos de EC obtidos neste estudo não foi eficiente.

As vesículas tipo LUVs são bem adequadas para encapsular materiais aquosos, como já dito, embora a presença de somente uma única membrana lipídica signifique que a estabilidade mecânica, bem como retenção de solutos podem ser comprometidas, particularmente para substâncias de baixo peso molecular (NEW, 1989 a). Devido ao baixo peso molecular de 5-ALA, este pode apresentar um efluxo muito grande das vesículas para o meio externo, o que justifica o baixo grau de encapsulamento obtido.

Medidas farmacotécnicas foram tomadas para evitar o efluxo do 5-ALA das preparações lipossômicas através da obtenção de uma fase aquosa mais viscosa pela adição de HEC a 0,15%. Entretanto, pelos resultados obtidos, este procedimento não foi suficiente para manter o fármaco aprisionado. Nossos estudos anteriores de supressão de fluorescência mostraram que o 5-ALA é encapsulado no interior das vesículas, porém sua permanência é prejudicada devido às propriedades físico-químicas do referido fármaco não permitir sua permanência no volume aquoso aprisionado (PIERRE et al., 1999).

FUKUDA et al. (1989) verificaram que o 5-ALA é uma molécula passível de encapsulamento em lipossomos numa eficiência de 20% para a formulação estudada. Entretanto, no presente trabalho, a formulação e o método de obtenção dos lipossomos são complexos, e necessitarão de outros artifícios para aumentar a taxa de encapsulação.

A fim de caracterizar as vesículas (REVs) obtidas seguiu-se com as metodologias de avaliação de lipossomos. A microscopia de luz polarizada constitui uma técnica auxiliar para a caracterização de lipossomos e vesículas tensoativas, podendo-se visualizar o formato e o tamanho. A observação das vesículas é geralmente limitada pela resolução do microscópio de luz, uma vez que são visualizadas somente vesículas de tamanho maior ou igual a 1 μm . As vesículas lipossômicas grandes podem ser detectadas facilmente devido possuírem uma aparência de cebola (lamelas concêntricas) em campo de luz alta, e aparecerem como cruces Malteses entre as porções polares (RADES et al., 1997).

Os lipossomos são considerados cristais líquidos liotrópicos esméticos, ou seja, liotrópicos porque eles são formados na presença de um solvente e esméticos devido à sua característica formação de lamelas, as quais são lâminas bimoleculares de moléculas lipídicas. Este arranjo é possível devido à característica anfifílica das moléculas lipídicas e tem o objetivo de minimizar o contato da porção hidrofóbica da molécula com o solvente polar (CHAPMAN, 1984).

Na análise da preparação lipossômica pela técnica da microscopia de luz (Figuras 16 A e 16 B), visualizaram-se estruturas vesiculares reveladas pelas texturas anisotrópicas como cruces Malteses, somente para aquelas na faixa de tamanho de 1 μm . Foram identificadas poucas vesículas com tais características. O mesmo pode ser dito em relação às estruturas com aparência de “cebola” visualizadas em campo de luz alta (Figuras 17 A e 17 B). Considerando que a resolução do microscópio de luz é para partículas com tamanho igual ou maior que 1 μm , foi suposto que o tamanho dos lipossomos obtidos estivessem abaixo do limite de detecção do microscópio de luz, o que está em concordância com os resultados obtidos no experimento de determinação do tamanho usando espalhamento de luz, onde a maioria das vesículas apresentaram diâmetro médio de 500 nm. Assim sendo, a microscopia de luz polarizada foi empregada como um método auxiliar na caracterização do sistema.

Vários são os métodos para a determinação do tamanho de partículas de uma preparação, embora somente alguns determinem o tamanho médio e a distribuição. Devido ao fato dos lipossomos serem uma população de partículas, há uma distribuição de tamanho, em vez de um valor único. A distribuição do tamanho é um parâmetro importante pois esta pode influenciar na penetração dos lipossomos quando administrados topicamente. Com exceção para microscopia eletrônica, nenhum outro método é capaz de resolver a distribuição sobre a faixa total de tamanhos dos lipossomos que podem ser obtidos, de 10 nm a 50 μm . A forma da partícula também é importante, especialmente para partículas grandes, maiores que 1 μm . No geral, lipossomos grandes, maiores que 1 μm , podem ser adequadamente medidos por microscopia de luz e contador Coulter. Para lipossomos pequenos, menores que 0,2 μm , vários métodos são úteis: cromatografia de exclusão em gel, espalhamento dinâmico da luz e microscopia de emissão (WOODLE & PAPAHADJIPOULOS, 1989; RADES et al., 1997).

Na técnica por espalhamento dinâmico da luz (*light scattering*) é possível medir partículas na faixa de 3 nm até 3 μm , dependendo do tipo do laser. Os dados podem ser apresentados como tamanho médio de partículas (assumindo uma equivalência esférica) como também uma análise mais rigorosa pode fornecer detalhes de duas ou mais populações de partículas em solução/suspensão. Esta técnica possui algumas limitações quando são empregadas amostras polidispersas (mistura de partículas grandes e pequenas) mas, a função de auto-correlação utilizada no cálculo de distribuição de tamanho das vesículas leva a uma avaliação correta do tamanho médio das vesículas lipossomais (NEW, 1989 b).

A **Figura 18**, representa os dados de tamanho das amostras de lipossomos usando Espectroscopia de Correlação de Fóton, após tratamento estatístico (Curva "Gaussiana"). Esta curva relaciona o diâmetro da vesícula (nm) com a intensidade relativa medida pelo aparelho, em porcentagem. O índice de polidispersividade é uma medida da homogeneidade de uma dispersão e varia de 0.0 (monodispersa) a 1.0 (muito heterogênea). Na análise da amostra de lipossomos vazios, esta curva informou que a maior quantidade de partículas possui diâmetro médio na faixa entre 470 e 570 nm, mais precisamente, a maior população de vesículas se encontram em torno de 500,3 nm (média de três experimentos), e somente uma pequena porcentagem de vesículas em torno de 1000 nm, representando um tamanho médio bem menor do que o tamanho do poro da membrana utilizada nas extrusões. O tamanho das vesículas com 5-ALA incorporado (**Figura 19**) apresentou diâmetro médio de 410,1 nm, significativamente diferente das vesículas sem o fármaco ($p < 0,05$). Isto significa que o fármaco 5-ALA interferiu no tamanho dos lipossomos obtidos.

A literatura mostra que em relação à existência de vários métodos disponíveis para as medidas de tamanho dos lipossomos, não existe um único método capaz de uma análise de distribuição de tamanho confiável e segura de amostra de lipossomos. Para uma avaliação mais adequada em relação ao tamanho médio da principal população de partículas, outros métodos são necessários, como por exemplo, difração de raio laser, microscopia de transmissão de elétrons ou outras técnicas sofisticadas (WOODLE & PAPAHDJOPOULOS, 1989; RADES et al., 1997). Desse modo, comparações e compilações de resultados de muitos métodos são necessários para caracterizar completamente o tamanho dos lipossomos dentro de uma determinada preparação.

Também deve ser considerado o que pode ocorrer no processo de extrusão da preparação lipossomal: a filtração de vesículas pelo sistema de extrusão remove vesículas grandes, mas também resulta em uma adsorção substancial de vesículas pequenas. A extrusão através de membranas de policarbonato de tamanho definido faz com que a vesícula mude sua conformação, e assim, possam atravessar os poros. Entretanto, as vesículas que são muito maiores que o diâmetro dos poros podem ser quebradas no processo, formando, assim, estruturas menores. Após várias passagens através da membrana, haverá a formação de uma população de vesículas de diâmetro médio menor que o diâmetro do poro da membrana; porém, com uma pequena proporção sendo de tamanho igual ou ainda maior que o diâmetro do poro, devido ter "se espremido" através da membrana sem se romper (NEW, 1990 a).

No presente estudo, as preparações lipossômicas de lipídeos do EC, sem o pró-fármaco 5-ALA, apresentaram tamanho médio em torno de 500,3 nm, o que está em concordância com outros autores, os quais obtiveram vesículas lipossômicas do tipo REVs com tamanho médio semelhante (YATVIN & LELKES, 1982).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode, portanto, ser usada para estudar o comportamento térmico de lipídeos puros e o comportamento de fase de misturas lipídicas. Os sistemas como lipossomos, contendo uma mistura de fosfolipídeos ou lipídeos podem apresentar propriedades térmicas semelhantes ou diferentes dos componentes individuais. Ou seja, as misturas de fosfolipídeos ou lipídeos, de cadeias de comprimentos próximo, originam uma transição principal intermediária. Quando os comprimentos das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídeos são muito diferentes, duas transições em separado podem ser observadas (TAYLOR & MORRIS., 1995).

Na análise térmica de fosfolipídeos, lipídeos ou membranas, pode-se observar transições endotérmicas, cuja temperatura de transição (T_c), varia com o comprimento e o grau de insaturação das cadeias de hidrocarbonetos e, ainda com a natureza dos grupos cabeça presentes nas moléculas lipídicas. Geralmente, um aumento no comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, aumenta a T_c , ao passo que aumentando as ligações duplas, a T_c é diminuída (TAYLOR & MORRIS, 1995).

Desse modo, pode-se dizer que o entendimento das transições de fase e fluidez das membranas lipídicas são importantes para a obtenção e a avaliação de lipossomos,

uma vez que o comportamento de fase de uma membrana lipossômica determina propriedades tais como: permeabilidade, fusão, agregação e ligação à proteínas; os quais podem afetar significativamente a estabilidade e o comportamento dos lipossomos nos sistemas biológicos.

No presente estudo, a análise de DSC foi realizada com os filmes lipídicos obtidos dos lipídeos isolados bem como da mistura lipídica. A importância desta análise é a avaliação das interações entre os lipídeos do sistema e a semelhança destes com os lipídeos do EC. Além disso, avaliar também o efeito da presença do fármaco 5-ALA sobre a T_c da mistura lipídica.

A **Tabela 2** apresenta as T_c encontradas para os lipídeos individuais, mistura lipídica contendo ou não 5-ALA e o referido fármaco isolado. As misturas de lipídeos do EC (contendo ou não 5-ALA) mostraram uma única transição endotérmica ($\approx 50-60^\circ\text{C}$), diferente dos componentes individuais (**Figuras 20 e 21**). Isto indica que ocorreu uma interação entre os lipídeos formando uma mistura com perfil térmico diferente dos componentes isolados. Esta mistura apresenta uma temperatura de transição de fase próxima à principal transição do EC, ou seja, 65°C (HATFIELD & FUNG, 1995).

As transições de fase para EC de mamíferos são complexas e têm sido estudadas por técnicas de difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho e DSC (HATFIELD & FUNG, 1995). A principal transição ocorre a 65°C , a qual representa a fusão das cadeias acila dos lipídeos (GOLDEN et al., 1986). Assim sendo, as preparações obtidas assemelham-se com o EC em relação a principal transição endotérmica, o que pode indicar uma interação mais efetiva entre a formulação e o sítio de aplicação. Em segunda instância, os estudos de DSC auxiliaram na verificação da T_c da mistura lipídica, temperatura esta empregada na extrusão dos lipossomos ($\approx 70^\circ\text{C}$).

Pode-se considerar que a presença do fármaco 5-ALA não alterou a T_c da mistura lipídica no primeiro e segundo aquecimentos, apesar da interação entre os lipídeos ser evidente. Isto pode ser um dado interessante visto que, muito provavelmente, o 5-ALA não irá influenciar na formação das vesículas. Uma vez que, lipossomas com composição lipídica semelhante a da matriz lipídica do EC humano levariam a uma maior interação das vesículas com esta membrana e, conseqüentemente a uma liberação adequada do 5-ALA na pele, os estudos de DSC foram interessantes

para verificar as semelhanças nos perfis térmicos dos constituintes do sistema lipossômico e do EC.

A **Figura 23** mostra o perfil de liberação do 5-ALA em função do tempo (horas), tanto para o 5-ALA encapsulado em lipossomos como para o 5-ALA em solução. Observa-se que a permeação do 5-ALA em lipossomos foi menor do que para o 5-ALA em solução.

A retenção cutânea de fármacos é uma avaliação importante para veículos que formam depósitos na pele, e deve ser determinada com o uso de membrana animal (camundongos sem pêlo). Nos estudos de retenção do fármaco na pele, foram separadas as áreas que estiveram em contato com as preparações, trituradas e filtradas para posterior quantificação do fármaco em questão. Os resultados obtidos mostraram que a formulação lipossômica proporcionou uma maior retenção para o fármaco (390,43 $\mu\text{g/g}$) comparada com a solução do mesmo (86,14 $\mu\text{g/g}$) (**Tabela 3 e Figura 24**). Este comportamento está em concordância com os resultados obtidos no experimento de liberação; ou seja, já que o 5-ALA em lipossomos apresentou uma menor permeação através da pele de camundongo sem pêlo, a retenção do 5-ALA na pele pode ser maior, indicando que o sistema lipossômico provavelmente proporcionou um efeito de depósito para o 5-ALA na pele do animal. BENTLEY et al. (1997) obtiveram resultado semelhante quando empregaram géis de poloxamer acrescidos de fosfatidilcolina para a veiculação de corticosteróides, utilizando-se peles de camundongos sem pêlo como membrana.

A característica mais importante dos lipossomos de lipídeos do EC para aplicação tópica baseia-se na semelhança com as membranas biológicas, ou seja, são muito semelhantes à epiderme em relação à composição lipídica, o que os torna capazes de interagir com a barreira epidermal em uma maior extensão, comparado com formas farmacêuticas convencionais. Entre as muitas vantagens da formulação lipossômica para aplicação tópica (biodegradabilidade, não toxicidade, etc), um aspecto inovador é que os lipossomos atuam como "localizadores de fármacos" e não somente como "transportadores de fármacos" (SCHMID & KORTING, 1996). Assim, um sistema de liberação, tal como lipossomos, que retenha o fármaco na pele, por um certo período de tempo, é de extrema importância no tratamento de patologias cutâneas.

Na TFD, a patologia em questão é o cancer de pele. Sendo o 5- ALA um pró-fármaco que é bioconvertido, via ciclo do heme, na substância fotossensibilizante (PpIX), quanto maior a quantidade do pró- fármaco retido na pele, maior será a quantidade de PpIX formada e, conseqüentemente, o efeito terapêutico será otimizado. Assim, apesar da baixíssima taxa de encapsulamento do 5- ALA nos lipossomas de lipídeos de EC, este sistema apresentou uma performance adequada para a aplicação tópica, considerando que o ideal para um produto tópico é diminuição da permeação transcutânea e o aumento da retenção cutânea do fármaco (BENTLEY, 1994).

A semelhança de composição e estrutura de bicamada entre os lipossomas preparados e a matriz lipídica do EC estaria propiciando uma efetiva interação do sistema com as camadas mais superficiais do EC, o que levaria a uma distribuição dos lipídeos das vesículas na matriz lipídica. Assim, o conteúdo lipídico estaria aumentado e estas regiões atuariam como verdadeiros depósitos onde os fármacos poderiam interagir em uma magnitude dependente das características físico- químicas dos mesmos.

A Tabela 3 e a Figura 24 mostram as quantidades de 5- ALA permeada e retida na pele de camundongos sem pêlo após 36 hs de experimento *in vitro*. Somente 1,5 % do 5- ALA aplicado na forma de lipossomas de lipídeos de EC permearam a pele do animal, ao passo que para a solução, 11,5 % foram permeados. Com os dados de quantidade permeada e retida foi possível calcular a razão entre a quantidade retida e a permeada para as formulações estudadas. As relações encontradas foram 0,023 e 0,770 para o 5- ALA em solução e em lipossomos, respectivamente. Como pode ser observado, a preparação lipossômica apresentou- se 33,48 vezes mais adequada que a solução, com relação ao fator calculado.

Pelos resultados obtidos, pode- se constatar uma maior eficiência da preparação lipossômica, apesar do baixo grau de encapsulamento encontrado. Estudos futuros objetivarão melhorar a encapsulação do 5- ALA nestes sistemas através do emprego de derivados mais lipossolúveis, os quais poderiam acomodar- se na bicamada lipídica dos lipossomos e, assim, garantir uma taxa de encapsulamento maior.

Finalmente, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o sistema de liberação baseado em lipossomas de lipídeos do EC apresentam potencial para a veiculação do fármaco 5- ALA na TFD do câncer de pele.

6. CONCLUSÕES

- ➡ O método fluorimétrico utilizado para a quantificação do 5-ALA mostrou-se adequado para todas as etapas experimentais.
- ➡ O método da evaporação em fase reversa empregado para a obtenção de lipossomos de lipídeos do EC mostrou-se mais adequado que o método de congelamento-descongelamento, fornecendo vesículas com distribuição de tamanho mais homogênea, caracterizadas por um único pico de eluição na coluna de exclusão em gel.
- ➡ A obtenção dos lipídeos do EC pôde ser confirmada pela microscopia de luz polarizada, apesar da limitação da técnica para tamanho de partículas abaixo de 1 μm , representando uma ferramenta auxiliar na caracterização do sistema obtido, visto que estruturas lamelares típicas de vesículas lipossômicas puderam ser reveladas pelas estruturas anisotrópicas observadas.
- ➡ A técnica de espalhamento dinâmico da luz confirmou que as estruturas vesiculares obtidas possuíam tamanho menor que o tamanho de poro usado nas sucessivas extrusões, tanto para os lipossomos vazios como para aqueles onde o 5-ALA estava presente. Isto pode ser uma vantagem adicional em relação à penetração das vesículas na pele, já que o grau de penetração destas na pele aumenta à medida que o seu tamanho é reduzido.
- ➡ Devido às propriedades físico-químicas do fármaco 5-ALA, como alta hidrossolubilidade e baixo peso molecular, não foi obtida uma taxa de encapsulamento adequada.
- ➡ O perfil térmico da mistura dos lipídeos do EC obtidos pela análise de DSC, revelou-se diferente daqueles obtidos com os lipídeos individuais, indicando que ocorreu uma interação efetiva entre os lipídeos da mistura. Na presença de 5-ALA, a mistura lipídica não teve seu perfil térmico substancialmente modificado, indicando que o fármaco em questão não tem efeito desestabilizador sobre a mistura. Além disso, a T_c observada para a mistura lipídica na ausência ou na presença do 5-ALA apresentou-se

semelhante a Tc principal do EC humano. Esta semelhança pode favorecer uma maior interação entre as vesículas lipossômicas e os lipídeos do EC.

➡ Os experimentos de permeação e retenção mostraram claramente que a formulação lipossômica apresentou uma maior retenção para o fármaco na pele do animal, comparado com a solução, e que esta, permeou a pele do animal em extensão significativa, indicando que provavelmente, o sistema lipossômico proporcionou um efeito depósito para o 5-ALA aplicado topicamente.

➡ Desse modo, o sistema obtido pode ser utilizado como um sistema de liberação adequado para a TFD-ALA tópica, porém, novas estratégias devem ser empregadas para alcançar uma maior eficiência de encapsulamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELS, C.; FRITISH, C.; BOLSEN, K.; SZEIMIES, R-M.; RUZICKA, T.; GOERZ, G. Photodynamic Therapy with 5 aminolevulinic acid induced porphyrins of an amelanotic melanoma in vivo. **J.Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 40, p. 76-83, 1997.
- ABRAHAM, W.; WERTZ, P. W.; DOWNING, D. T. Fusion patterns of liposomes formed from stratum corneum lipids. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 90, p. 259-262, 1988.
- ABRAHAM, W. and DOWNING, D. T. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1021, p. 119-125, 1990.
- ALLEN, T. M. and MOASE, E. H. Therapeutic opportunities for target liposomal drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 21, p. 117-133, 1996.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, London, v. 13, p. 238-252, 1965.
- BATLLE, A. M. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy- a model for carcinogenesis. **J.Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 20, n. 1, p. 5-22, 1993.
- BATZRI, S. and KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 298, p. 1015-1019. 1973.
- BECHELLI, L. M. and CURBAN, G. V. Tumores Cutâneos. **Compêndio de Dermatologia**, 6ª edição- Ed. São Paulo, Atheneu. 1988, p. 543-549.
- BENTLEY, M. V. L. B. **Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por**

- metodologia in vitro.** São Paulo, 1994. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, 150 p.
- BENTLEY, M. V. L. B.; KEDOR, E. R. M.; VIANNA, R. F.; COLLET, J. H. The influence of lecithin and urea on the *in vitro* permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 255-262, 1997.
- BILTONEN, R. L and LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chem. Phys. Lipids**, Limerick, v. 64, p.129-142, 1993.
- BOND, J. R. and BARRY, B. W. Long term hydration effects on permeability of hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, Suppl., v. 37, p. 77-80, 1985.
- BONINA, F. P.; MONTTENEGRO, L.; SCROFANI, N.; ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; MENEGATTI, E. and NASTRUZZI, C. Effects of phospholipid based formulation on in vitro and in vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate. **J. Control. Rel.**, Amstersdam, v. 34, p. 53-63, 1995.
- BONNET, R. and CHARALAMBIDES, A. A. Triplet states of porphyrin esters. **J.C.S. Faraday I.**, Cambridge, v. 76, p. 852-859, 1980.
- BOYLE, R. W. and DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem. Photobiol**, Oxford, v. 64, n. 3, p.469-485, 1996.
- BRONAUGH, R. L. and COLLIER, S. W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J. L. **Skin Permeation: Fundamentals and Applications**. Wheaton, Allured Publishing, 1993, p. 93-111.
-

BURCHEL, W. O microscópio de polarização. **Introdução às Técnicas Microscópicas**. 4ª edição. Editora Polígono S. A. São Paulo, 1972, p. 24-26.

CAIRNDUFF, F.; STRINGER, M. R.; HUDSON, E. J.; ASH, D. V. and BROWN, S. B. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. **Br. J. Cancer**, London, v. 69, p. 605-608, 1994.

CHAPMAN, D. **Liposome Technology**. Edited by Gregoriadis, G. (CRC Press, Boca Raton, Florida), v. 1, 1984, p. 1-17: Physicochemical properties of phospholipids and lipid-water systems.

CLAS, S-D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Sciences Technology Today**., London, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

CODERCH, L.; OLIVA, M.; PONS, M.; DE LA MAZA, A.; MANICH, A. M. and PARRA, J. L. Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 139, p.197-203, 1996.

COLLINS, P.; ROBINSON, D. J.; STRINGER, M. R.; STABLES, G. I. and SHEEHAN-DARE, R. A. The variable response of plaque psoriasis after a single treatment with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 137, n. 5, p. 743-749, 1997.

CURNOW, A.; Mc. ILROY, B. W.; POSTLE-HACON, M. J.; MAC ROBERT, A. J. and BOWN, S. G. Light dose fractionation to enhance photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in the normal rat colon. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 69, n.1, p. 71-76, 1999.

De LA MAZA, A.; LOPEZ, O.; CODERCH, L. and PARRA, J. L. Permeability changes in liposomes modeling the stratum corneum lipid composition due to C12-

- alkyl betaine/ sodium dodecyl sulfate mixtures. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 171, p. 63-74, 1998.
- DE ROSA, F. S.; MARCHETTI, J. M.; THOMAZINI, J. A.; TEDESCO, A.C. and BENTLEY, M. V. L. B. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, (in press).
- DAY ,R.A & UNDERWOOD, A R. **Quantitative Analysis**. 6^a ed., New Jersey, Prentice Hall, 1991, p. 442-452: Emission and Luminescence Spectroscopy.
- DE ROSA, F. S. **Desenvolvimento de um veículo para o ácido 5-aminolevulônico na Terapia Fotodinâmica: influência do dimetilsulfóxido como promotor de absorção cutânea**. *Dissertação de Mestrado*- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP, 1999.
- DE VOS, F.; DE MUYNCK, C.; GEERTS, M. and REMON, J. P. Percutaneous absorption of indomethacin from transparent oil/water gels in rabbits. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 237-241, 1991.
- DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence-KS, v. 58, p. 895-900, 1993.
- DOUGHERTY, T. J. and POTTER, W. R. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT ? **J. Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 8, p. 223-225, 1991.
- DOWNING, D. T.; ABRAHAM, W.; WEGNER, B. K.; WILLMAN, K. W. and MARSHALL, J. L. Partition of dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 285, p. 151-157, 1993.

- DÜRRHEIM, H.; FLYNN, G. L.; HIGUCHI, W. I. and BEHL, C. R. Permeation of hairless mouse skin I: Experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 69, n. 7, p.781-6, 1980.
- EGBARIA, K. and WEINER, N. **Skin Permeation- Fundamentals and Application.** In: Zatz, J. L. Wheaton, Allured Publishing, 1993, p.193-206: Topical application of liposomal preparations.
- ELIAS, P. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. **J. Control Rel.**, Amsterdam, v. 15, p. 199-208, 1991.
- EWING, GW.1980. **Métodos Instrumentais de Análise Química-** Trad. De Aurora G.Albanese e Joaquim T.S. Campos, São Paulo, Edgar Blucher, v.1, 1972, p.89-98: Fluorimetria e Fosforimetria.
- FARTASH, M. The nature of the epidermal barrier: structural aspects. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 273-282, 1996.
- FINK-PUCHES, R.; HOFER, A.; SMOLLE, J.; KERL, H. and WOLF, P. Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 41, p. 145-151, 1997.
- FINK-PUCHES, R.; SOYER, H. P.; HOFER, A.; KERL, H. and WOLF, P. Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 134, p. 821-826, 1998.
- FOLDVARI, M. In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. **Pharm. Res.**, New York, v. 11, p.1593-1598, 1991.

- FORD, J. and TIMMINIS, P. **Pharmaceutical thermal analysis.- techniques and applications.** (Ellis Horwood Limited, Chichester, UK). The use of thermal analysis in the study of liposomes. 1989.
- FRANZ, J. T. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 64, p. 190-195, 1975.
- FRITISH, C.; BATZ, J.; BOLSEN, K.; SCHULTE, K-W.; ZUMDICK, M.; RUZICKA, T. and GOERZ, G. Ex vivo application of δ -aminolevulinic acid induces high and specific porphyrin levels in human skin tumors: possible basis for selective photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 66, n. 1, p. 114-118, 1997.
- FRITISH, C.; GOERZ, G. and RUZICKA, T. Photodynamic Therapy in Dermatology. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 34, p. 207-214, 1998.
- FUKUDA, F.; PAREDES, S.; BATLLE, A. M. Tumor-localizing properties of porphyrins. In vitro studies using the porphyrin precursor, aminolevulinic acid, in free and liposome encapsulated forms. **Drug. Des. Deliv.**, Reading, G.B: Harwood Academic Publishers, v. 5, n. 2, p. 133-139, 1989.
- GESZTES, A. and MEZEI, M. Topical anesthesia of the liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.**, Baltimore MD, v. 67, p. 1079, 1988.
- GIBSON, S. L.; HAVENS, J. J.; FOSTER, T. H. and HILF, R. Time-dependent intracellular accumulation of δ -aminolevulinic acid, induction of porphyrins synthesis and subsequent phototoxicity. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 65, n. 3, p. 416-421, 1997.

- GOFF, B. A.; BACHOR, R.; KOLLIAS, N. and HASAN, T. Effects of photodynamic therapy with topical application of 5- aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. **J. Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 15, p. 239-251, 1992.
- GHOSH, T. K.; CHIAO, C. S.; GOKHALE, R. D. In vitro permeation of some β -blockers across the hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 45, p. 218-9, 1993.
- GOLDEN, G. M.; GUZEK, D. B.; HARRIS, R. R.; McKIE, J. E. and POTTS, R. O. Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 86, p. 255-259, 1986.
- GRAY, G. M. and YARDLEY, H. J. Different population of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. **J. Lipids Res.**, Bethesda, MD, v. 16, p. 441-447, 1975.
- GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 295, n. 13, p. 704-709, 1976.
- GROB, M. and SCHMID-GRENDELMEIER, P. Topical photodynamic therapy in dermatology. **Ther Umsch.**, Bern, v. 55, n. 8, p. 529-32, 1998.
- HADGRAFT, J. and BEUTNER, P. In vivo-in vitro comparisons in the transdermal delivery of nitroglycerin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 89, R1-R4, 1993.
- HARASHIMA, H. and KIWADA, H. Liposomal targeting and drug delivery: kinetic consideration. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 19, p. 425-444, 1996.
- HATFIELD, R. M. and FUNG, L. W. M. Molecular properties of stratum corneum model lipid system: large unilamellar vesicles. **Biophys. J.**, Bethesda, MD, v. 68, p. 196-207, 1995.

- HOEBEKE, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 28, p. 189-196, 1995.
- HOFLAND, H. E. J.; BOUWSTRA, J. A.; BODDÉ, H. E.; SPIES, F. and JUNGINGER, H. E. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopic visualization and small angle X-ray scattering studies. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 132, p. 853-856, 1995.
- HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G. and CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 812, p. 55-65, 1985.
- IMOKAWA, G.; KUNO, H. and KAWAI, M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 96, p. 845-851, 1991.
- JENDERSTROM, G. and RUSSEL, G. Size exclusion chromatography of liposomes on different gel media. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 70, n. 8, p. 874-878, 1981.
- JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol B.**, Lausanne, v. 36, p. 87-93, 1996.
- JUNGINGER, H. E.; HOFLAND, H. E. J. and BOUWSTRA, J. Lipossomas e Niossomas: interações com a pele humana. **Cosmetics & Toiletries.**, edição em português, São Paulo, SP : Tecnopress, v. 4, p. 19-24, 1992.
- JULIANO, R. L. A. and DAOUD, S. S. **Advances in Drug Delivery Systems**. In: Anderson, J. M., v. 4, 1989, p. 225- 232: Liposomes as a delivery system for membrane- active antitumor drugs.
-

- KAJIWARA, M.; HARA, K.; TAKATORI, K and MATSUMOTO. Revised structure of a δ -aminolevulinic acid derivative. **Clin. Chem.**, v.39, n.9, p.1867-1871, 1993.
- KARRER, S.; SZEIMIES, R-M.; HOHENLEUTNER, U.; HEINE, A. and LANDTHALER, M. Unilateral localized basaliomatosis: treatment with photodynamic therapy after application of 5-aminolevulinic acid. **Dermatology**., Basel, v. 190, p. 218-222, 1995.
- KATSAMBAS, A. and NICOLAIDOU, E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 132, p. 444-450, 1996.
- KENNEDY, J. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 6, p. 143-148, 1990.
- KENNEDY, J. C. and POTTIER, R. H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 14, p. 275-292, 1992.
- KNUTSON, K. Macro and molecular physical consideration in understanding drug transport in the stratum corneum. **J. Control Rel.**, Amsterdam, v. 2, p. 67-87, 1985.
- KODERHOLD, G.; JINDRA, R.; KOREN,H.; ALTH, G. and SCHENK, G. Experiences of photodynamic therapy in dermatology. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 36, p. 221-223, 1996.
- KOMATSU, H. and OKADA, S. Ethanol-induced aggregation and fusion of small phosphatidilcholine liposome: participation of interdigitated membrane formation in their processes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1235, p. 270-280, 1995.
- KORTING, H.C.; ZIENICKE, H.; SCHAFFER-KORTING, M.; and BRAUN-FALCO, O. Liposome encapsulation improves efficacy of betamethasone dipropionate in

- atopic eczema but not in psoriasis vulgaris. **Eur.J. Clin.Pharmacol.**, Berlin, v. 29, p. 349- 351, 1991.
- KORTING, H. C.; STOLZ, W.; SCHMID, M. H. and MAIERHOFER, G. Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 132, p. 571-579, 1995.
- KRAMMER, B. and UBERRIEGLER, K. In vitro investigation of ALA- induced protoporphyrin IX. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 36, p. 121-126, 1996.
- LASCH, J.; SCHONFELDER, U.; WALKE, M.; ZELLMER, S. and BECKERT, D. Photooxydative damage of skin lipids in liposomes (hSCLLs)- interference of sterols with the lipid peroxidation chain. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, p. 129-136, 1998.
- LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. **Biochem. J.**, London, v. 256, p. 1-11, 1988.
- LIN, R-Y.; CHEN, W-Y.; LIAO, C-W. Entropy-driven binding/partition of amino acids/dipeptides to stratum corneum lipid vesicles. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 50, p. 51-59, 1998.
- LONG, S. A.; WERTZ, W.; STRAUSS, J. S. and DOWNING, D. T. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 277, p. 284-287, 1985.
- MALIK, Z. and LUGACI, H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. **Br. J. Cancer.**, Edinburgh, v. 56, p. 589-595, 1987.
- MALIK, Z.; KOSTENICH, G.; ROITMAN, L.; EHRENBERG, B. and ORESTEIN, A. Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX

accumulation in skin and tumors of mice. **J. Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 28, p. 213-218, 1995.

MANDAL, T. K. and DOWNING, D. T. Freeze-fracture electron microscopic and osmotic water permeability studies of epidermal lipid liposomes derived from stratum corneum lipids of porcine epidermis. **Acta Derm. Venereol.**, Oslo, v. 73, p. 12-17, 1993.

MARTIN, A.; TOPE, W. D.; GREVELINK, J. M.; STARR, J. C.; FEWKES, J. L.; FLOTTE, T. J.; DEUTSCH, T. F. and ANDERSON, R. R. Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implications for photodynamic treatment. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 287, p. 665-674, 1995.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. and JANOFF, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 817, p. 193-196, 1985.

MEZEI, M. and GULASEKHARAM, V. Liposomes- a selective drug delivery system for the topical route of administration. **Life Sci.**, Oxford, v. 26, p. 1473, 1980.

MEZEI, M. and GULASEKHARAM, V. Liposomes- a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 34, p. 473-474, 1982.

NATSUKI, R.; MORITA, Y.; OSAWA, S. and TAKEDA, Y. Effects of liposome size on penetration of dl-tocopherol acetate into skin. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 19, n. 5, p. 758-61, 1996.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach.** In: New, R. C. C. Oxford: IRL Press, 1989, p. 1-31: Introduction.

- NEW, R. R. C. Preparation of Liposomes. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989 a, p. 33-103.
- NEW, R. C. C. In: **Liposomes: a practical approach**. In: New, R. C. C. IRL Press, N.Y., 1989 b, p. 155-160: Characterization of Liposomes.
- OCHSNER, M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases. **ArzneimForsch Drug Res.**, Aulendorf, DE, v. 47, n.II, p.1185-1194, 1997 a.
- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 39, p.1-18, 1997 b.
- OHLWEILER, O.A. **Química Analítica Quantitativa**. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos- S.A, v.3, 1974, p. 713-719: Métodos Fluorimétricos.
- OISHI, H.; NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K. and TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5- aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, IL, v. 20, p. 106-110, 1996.
- OKAYAMA, A; FUJI, S. and MIURA, R. Optimized fluorimetric determination of urinary δ -aminolevulinic acid by using pre-column derivatization and identification of the derivate. **Clin. Chem.**, v.36, n.8, p.1494-1497, 1990.
- ORENSTEIN, A.; KOSTENICH, G. and MALIK, Z. The kinetics of protoporphyrin fluorescence during ALA-PDT in human malignant skin tumors. **Cancer Lett.**, Limerick, v. 120, n. 2, p.229-34, 1997.
- PASS, H. I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **J. Nat. Cancer Inst.**, Cary, NC, v. 85, n. 6, p.443-56, 1993.

- PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J. and HEYERDAHAL, H. Distribution of 5-aminolevulinic acid induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 62, p. 906-913, 1995.
- PENG, Q.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M. and NESLAND, J. M. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 65, p. 235-251, 1997.
- PICK, U. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 212, p. 186-194, 1981.
- PIERRE, M. B. R.; MARCHETTI, J. M. M.; TEDESCO, A. C. and BENTLEY, M. V. L. B. Evaluation of incorporation of the 5-aminolevulinic acid through studies of pyrene fluorescence quenching in the micellar and liposomal systems. **Boll. Chim. Farm.**, Milano, v. 138, p. V, 1999.
- POTTS, R. O. and FRANCOEUR, L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 96, p. 495-499, 1991.
- RADAKOVIC-FIJAN, S.; RAPPEERSBERGER, K.; TANEW, A.; HONIGSMANN, H. and ORTEL, B. Ultrastructural changes in PAM cells after photodynamic treatment with delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins or photosan. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 112, n. 3, p. 264-70, 1999.
- RADES, T.; GERKE, A.; SCHÜTZE, W. and MÜLLER-GOYMANN, C. C. Characterization of a commercial liposome spray. **Pharmazie.**, Berlin, v. 52, p. 44-50, 1997.
- REDDI, E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumors. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 37, p. 189-195, 1997.

- REIFENRATH, W. G.; CHELLQUIST, E. M.; SHIPWASH, E. A.; JEDERBERG, W. W.; KRUEGER, G. G. Percutaneous penetration in the hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 111, n. 27, p. 123-35, 1984.
- RICK, K.; SROKA, R.; STEPP, H.; KRIEGMAIR, M.; HUBER, R. M.; JACOB, K. and BAUMGARTNER, R. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. **J. Photochem. Photobiol B.**, Lausanne, v. 40, p. 313-319, 1997.
- ROBINSON, D. J.; BRUIJN, H. S.; VAN DER VEEN, N.; STRINGER, M. R.; BROWN, S. B. and STAR, W. M. Fluorescence Photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 67, p. 140-149, 1998.
- ROSS, E. V.; ROMERO, R.; KOLLIAS, N.; CRUM, C. and ANDERSON, R. R. Selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for condylomata after topical application of 5-aminolaevulinic acid: implications for photodynamic treatment. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 137, p. 736-742, 1997.
- ROTHSCHILD, Z. **Introdução à Métodos Cromatográficos**. Coord. Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. 6ª ed., Campinas, SP, Editora da Unicamp, 1995, p. 95-115: Cromatografia por Exclusão.
- ROUGIER, A.; DUPUIS, D.; LOTTE, C. and ROGUET, R. The measurement of the stratum corneum reservoir. A predictive method for in vivo percutaneous absorption studies, influence of application time. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 84, p. 66-68, 1985.
- ROY, S. D.; ROOS, E. and SHARMA, K. Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 83, n.2, p.126-30, 1994.

- SATO, K.; SUGIBAYASHI, K. and MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n.2, p. 104-7, 1991.
- SCHMID, M.-H. and KORTING, H. C. Therapeutic Progress with topical liposome drugs for skin disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 335-342, 1996.
- SCHMIDTGEN, M. C.; DRECHSLER, M.; LASCH, J. and SCHUBERT, R. Energy-filtered cryotransmission electron microscopy of liposomes prepared from human stratum corneum lipids. **J. Microsc.**, Oxford, v. 191 (pt2), p. 177-186, 1998.
- SCHMITZ, K. S. **An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules**, Boston: Academic Press Inc, 1990, p.1-10.
- SCHUITMAKER, J. J.; BAAS, P.; VAN LEENGOED, H. L. L. M.; VAN DER MEULEN, F. W.; STAR, W. M. and VAN ZANDWIJK, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 34, p. 3-12, 1996.
- SHARMA, A. and SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 154, p. 123-140, 1997.
- SMITH, R. F. **Microscopy and Photomicrography. A working manual**. Second edition: Boca Raton, Fla: CRC Press. 1994, p. 135-149: Polarized light.
- STABLES, G. I.; STRINGER, M. R.; ROBINSON, D.J; and ASH, D.V. Large patches of Bowens disease treated by topical aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 136, p. 957-960, 1997.

- STENDER, I. M. and WULF, H. C. Photodynamic therapy with 5- aminolevulinic acid in the tratment of actinic cheilitis. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 135, p. 454-456, 1996.
- STENDER, I. M.; THOMSEN, N. B; POULSEN, T. and WULF, H. C. Photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid delays UV photocarcinogenesis in hairless mice. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 66, p. 493-496, 1997.
- STRINGER, M. R.; COLLINS, P.; ROBINSON, D. J.; STABLES, G. I. and SHEEHAN-DARE, R. A. The accumulation of protoporphyrin IX in plaque psoriasis after topical application of 5-aminolevulinic acid indicates a potential for superficial photodynamic therapy. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 107, p.76-81, 1996.
- SURBER, C.; WILHELM, K. P. and MAIBACH, H. I. *In vitro* skin pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 836-40, 1991.
- SUHONEN, T. M.; PIRSKANEN, L.; RAISANEN, M.; KOSONEN, K.; RYTTING, J. H.; PARONEN, P. and URTTI, A. Transepidermal delivery of β -blocking agents: evaluation of enhancer effects using stratum corneum lipid liposomes. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 43, p. 251-259, 1997.
- SZEIMIES, R. M.; CALZVARA-PINTON, P.; KARRER, S.; ORTEL, B. and LANDTHALER, M. Topical photodynamic therapy in dermatology. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 36, p. 213-219,1996.
- SZOCKA, F. and PAPAHADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 75, n. 9, p. 4194-4198, 1978.
-

- SZOCKA, F. and PAPAHAADJOPOULOS, D. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 601, p. 559-571, 1980.
- SZOCKA, F. and PAPAHAADJOPOULOS, D. In: Knight, C. G. **Liposomes: from physical structure to therapeutic applications**. Elsevier/North- Holland Biomedical Press, 1981, v. 7, p. 51-82: Liposomes: Preparation and characterization.
- SWARTZENDRUBER, D. C.; WERTZ, P. W.; KITKO, D. J.; MADISON, K. C. and DOWNING, D. T. Molecular models of intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 92, p. 251-257, 1989.
- TAYLOR, K. M. G. and MORRIS, R. M. Thermal analysis of phase transition behavior in liposomes. **Thermochim. Acta.**, Amsterdam, v. 248, p. 289-301, 1995.
- TOMOKUNI, K.; ICHIBA, M and HIRAI, Y. HPLC micro-method for determining δ -aminolevulinic acid in plasma. **Clin. Chem.**, v.39, n1, p. 169-170, 1993.
- UCHIYAMA, K.; NAGAYASU, A.; YAMAGIWA, Y.; NISHIDA, T.; HARASHIMA, H. and KIWADA, H. Effects of the size and fluidity of liposomes on their accumulation in tumours: A presumption of their interaction with tumors. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 121, p. 195- 203, 1995.
- URBACH, F. Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 40, p. 3-7, 1997.
- VAN DER LEUN, J. C. UV radiation from sunlight: summary, conclusions and recommendations. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 35, p. 227-244, 1996.

- VAN DER VEEN, N.; DE BRUIJN, H. S. and STAR, W. M. Photobleaching during and re-appearance after photodynamic therapy of topical ALA-induced fluorescence in UVB-treated mouse skin. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 72, n.1, p. 110-8, 1997.
- VEMURI, S. and RODES, C. T. Separation of liposomes by a gel filtration chromatographic technique: a preliminary evaluation. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 69, p. 107-113, 1994.
- VEMURI, S. and RODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a Review. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 70, p. 95-111, 1995.
- WANG, I.; BAUER, B.; ANDERSON-ENGELS, S.; SVANBERG, S. and SVANBERG, K. Photodynamic therapy utilising topical δ -aminolevulinic acid in non-melanoma skin malignancies of the eyelid and the periocular skin. **Acta Ophthalmol Scand.**, Hvidovre, v. 77, p. 182-188, 1999.
- WERTZ, P. W.; ABRAHAM, W.; LANDMANN, L. and DOWNING, D. T. Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 87, p. 582-584, 1986.
- WERTZ, P. W. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 283-294, 1996.
- WOLF, P.; RIEGER, E. and KERL, H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid : An alternative treatment modality for solar keratoses , superficial squamous cells carcinomas and basal cells carcinoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, Mo, v. 28, p. 17-21, 1993.
- WOLF, P. and KERL, H. Photodynamic Therapy with 5- aminolevulinic acid: a promising concept for the tratment of cutaneous tumors. **Dermatology.**, Basel, v. 190, p. 183-185, 1995.

WOODLE, M. C. and PAPAHAADJOPOULOS, D. Liposome preparation and size characterization. **Methods. Enzymol.**, New York, v. 171, p.193-217, 1989.

YAROSH, D.B.; BUCANA, C.; COX, P.; ALAS, L.; KIBITEL, J. and KRIPLE, M. Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 103, p. 461-8, 1994.

YAROSH, D. B.; O'CONNOR, A.; ALAS, L.; POTTEN, C.; WOLF, P. Photoprotection by topical DNA repair enzymes: molecular correlates of clinical studies. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, KS, v. 69, n. 2, p. 136-40, 1999.

YATVIN, M. B. and LELKES, P. I. Clinical prospects for liposomes. **Med. Phys.**, Lancaster, PA, v. 9, n. 2, p. 149-175, 1982.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma nova modalidade de tratamento do câncer de pele, que usa fotossensibilizantes, os quais localizados no tecido tumoral podem produzir a destruição do tecido por absorção de luz e dose de comprimento de onda apropriados. Após a aplicação tópica de porfirinas ou seus derivados e outros fotossensibilizantes, a incidência de luz induz a produção de oxigênio singlete, o qual causa a necrose do tumor. O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) é um pró-fármaco, o qual é um precursor de porfirinas endógenas, principalmente protoporfirina IX (PpIX), a qual é sintetizada *in situ* em uma substância altamente fluorescente pela via biossintética do grupo heme. Entretanto, a maioria das substâncias fotossensibilizantes atravessam pobremente as barreiras biológicas tais como o estrato córneo (EC). Lipossomos têm sido propostos como localizadores de fármacos, melhorando a biodistribuição e, conseqüentemente a concentração local do fármaco, otimizando a TFD tópica de tumores cutâneos. Este trabalho propôs a obtenção de lipossomos de composição lipídica semelhante ao EC de mamíferos bem como a sua avaliação. Os lipossomos foram obtidos pela técnica de evaporação em fase reversa seguida por extrusão e as vesículas formadas foram caracterizadas por cromatografia de exclusão em gel. O tamanho médio destas vesículas foi obtido por Espalhamento dinâmico da luz, o que revelou uma distribuição de tamanho médio em torno de 500 nm, sendo que este tamanho foi significativamente alterado pela presença de 5-ALA (400,1 nm). A observação das vesículas sob microscópio de luz polarizada confirmou a formação de lipossomos pela presença de cruces Maltese, indicativas das propriedades de birrefringência das bicamadas lipídicas. A análise de DSC mostrou que houve uma interação efetiva entre os lipídeos constituintes do sistema, sendo a T_c bem próxima à principal T_c dos lipídeos do EC. A permeação *in vitro* de 5-ALA em lipossomos foi bem menor comparada à solução aquosa do fármaco, enquanto a retenção cutânea do 5-ALA *in vitro* foi aumentada quando utilizou-se o sistema lipossômico. Os estudos do grau de encapsulamento mostraram uma baixa porcentagem de encapsulamento de 5-ALA neste sistema. Apesar disto, o perfil de permeação mostrou-se adequado para a aplicação tópica e desse modo, o sistema obtido com composição lipídica semelhantes ao EC, podem ser explorados como sistemas de liberação de fármacos para TFD-5-ALA tópica de câncer do pele.

9. ABSTRACT

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a new treatment modality for skin cancer, which uses photosensitizers, located in the tumoral tissue and can produce the tissue destruction by absorbing light of an appropriate wavelength and dose. After topical application of the porphyrins or its derivatives and other photosensitizers, the incidence of light lead to the production of singlet oxygen that cause the tumour necrosis. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a pro-drug, that is an endogenous porphyrins precursor, mainly protoporphyrin IX (PpIX), that is synthesized *in situ* in a highly fluorescent substance in the heme biosynthetic pathway. However, most of these substances cross biological barriers poorly such as stratum corneum (SC) of the skin. Liposomes has been proposed as a skin drug localizers, improving in this way the biodistribution and consequently the local concentration of the drug, optimizing the cutaneous tumours topical therapy. This work has proposed the achievement of liposomes of lipidic composition similar to the mammalian SC as well as its evaluation. The liposomes were obtained by reverse phase evaporation technique following by extrusions and the formed vesicles were characterized by size exclusion chromatography on gel filtration. The average size vesicles was obtained by Dynamic Light Scattering and revealed an average size distribution around 500 nm, and it was significantly altered by 5-ALA (400,1 nm). The vesicle observation on polarized light microscope has confirmed the liposome formation by Maltese crosses presence, indicative of the birefringence properties of lipidic bilayers. DSC analysis has shown that there were an effective interaction among the lipids of the system, and the T_c was very close to the main T_c of SC lipids. *In vitro* 5-ALA permeation in liposomes was much smaller compared to the drug aqueous solution, while the *in vitro* retention of 5-ALA in the liposomal system was much higher. The encapsulation grade studies have shown a low 5-ALA encapsulation percentage in this system. Nevertheless, the application profile has shown appropriate to the topical application and thus, these obtained system with similar lipids, to those in the SC, can be explored as drug delivery systems for PDT-5-ALA topical of skin cancer.