



ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA ISOTRETINOÍNA EM LIPOSSOMAS

Study of isotretinoin encapsulation into liposomes

Carina Pimentel Itapema Alves¹; Danielle Guimarães Almeida Diniz¹; Eliana Martins Lima^{1*}

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia – UFG
Praça Universitária, 74605-220. Goiânia – GO

Autor para correspondência: emlima@farmacia.ufg.br

Recebido em 27/05/2007 - Aceito em 21/06/2007

RESUMO: Os lipossomas, vesículas compostas por uma ou várias bicamadas de fosfolípidos, são capazes de encapsular substâncias com diversas características de hidro e lipofilia, seja na bicamada lipídica ou no compartimento aquoso interior. Dentre as classes de fármacos com potencial aplicação para a encapsulação em lipossomas, os retinóides, compostos envolvidos em uma ampla variedade de processos biológicos, ocupam lugar de destaque. Neste trabalho foi estudada a encapsulação da isotretinoína em lipossomas unilamelares com o propósito de desenvolver um sistema adequado para futuras investigações farmacológicas e farmacocinéticas que possam comprovar a otimização do efeito terapêutico deste fármaco quando em lipossomas. Lipossomas contendo isotretinoína foram preparados pela técnica de injeção de clorofórmio, sendo posteriormente caracterizados pela técnica de espalhamento de luz. A eficiência de encapsulação e demais avaliações quantitativas foram determinadas por espectrofotometria. Utilizando-se 40mM de fosfatidilcolina e 10 mM de colesterol na preparação de lipossomas, foi possível observar que a presença do colesterol reduz a eficiência da encapsulação do fármaco devido à sua localização preferencial na bicamada lipídica.

PALAVRAS-CHAVE: lipossomas, isotretinoína, encapsulação.

ABSTRACT: Liposome vesicles are able to encapsulate hydrophilic and lipophilic substances, either in their lipid bilayer or in the inner aqueous compartment. Retinoids are among the several drug classes whose encapsulation into liposomes might result in potential positive results. In this work, isotretinoin encapsulation into liposomes was studied. Liposomes were prepared by the chloroform injection method, with further characterization by dynamic light scattering. Encapsulation efficiency was determined by UV spectrophotometry. It was observed that when liposomes were made with 40mM of phosphatidylcholine and 10 mM of cholesterol, the encapsulation efficiency was reduced when compared to PC liposomes, since both molecules are included in the lipid bilayer.

KEYWORDS: Liposomes, isotretinoin, encapsulation.

1. INTRODUÇÃO

A isotretinoína é um composto retinóide derivado da vitamina A, quimicamente conhecida como ácido 13-cis-retinóico, contendo não menos que 98% e não mais que 120% de C₂₀H₂₈O₂, devendo ser preservada em compartimentos hermeticamente fechados, protegidos da luz e a baixas temperaturas (USP 30). A isotretinoína é empregada particularmente no tratamento da acne cística e nodular e como inibidor da proliferação de células neoplásicas, por exercer efeito regulador sobre a diferenciação celular (GABIZON, 1989; DINIZ, et al., 2002; WHITE, 1999).

Apesar de apresentar importantes efeitos farmacológicos, o uso terapêutico dos retinóides encontra limitações, devido a relatos de problemas relacionados a seus efeitos adversos, principalmente quando empregados topicamente em doses elevadas ou administrados sistematicamente (CORTESE, 1994).

Os efeitos adversos envolvendo o uso de isotretinoína estão relacionados à pele e membranas mucosas, sistema nervoso, músculo-esquelético, hematopoiético e linfático, gastrintestinal, cardiorespiratório e genitourinário. Por se tratar de um fármaco altamente teratogênico, quando administrado no primeiro trimestre de gestação, a isotretinoína pode ocasionar abortos espontâneos ou má formação do feto, sendo esta também observada quando a gestação ocorre dentro de quatro meses após o término do tratamento (BIGBY, et al.,1988; LEBOWITZ, et al.,1988; ELLIS, et al., 2001).

A utilização dos retinóides na clínica também é limitada devido à sua elevada toxicidade, a baixa estabilidade química e ao amplo espectro de ação. Além disto, a natureza hidrofóbica dos retinóides dificulta sua administração por via intravenosa, requerendo a utilização de formulações oleosas ou soluções aquosas contendo tensoativos (CORTESE,1994; SINGH,1998).

Neste sentido, com o objetivo de otimizar a administração dos retinóides, o emprego de lipossomas, vesículas fosfolipídicas empregadas desde 1970 como estruturas úteis para o transporte de fármacos, aparece como alternativa viável possibilitando redução nos níveis de toxicidade, aumento da solubilidade, especificidade e estabilidade associados ao uso destes fármacos (GREGORIADIS,1995; SINGH,1998).

Lipossomas são estruturas esféricas, com dimensões variando entre alguns nanômetros a alguns micrômetros de diâmetro, nos quais uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos em forma de vesículas. Os sistemas lipossomais são constituídos basicamente por fosfolípidos, esteróis e um antioxidante, resultando em sistemas uni e multilamelares formados espontaneamente quando os fosfolípidos são dispersos na fase aquosa. Substâncias com variadas características de hidro e lipofilia podem ser encapsuladas em lipossomas, seja na bicamada lipídica ou no compartimento aquoso interior (GREGORIADIS 1995; LASIC 1989; VEMURI et al.,1995).

Preparações lipossomais de retinóides podem ser obtidas encapsulando o fármaco nas bicamadas fosfolipídicas devido ao caráter apolar destas moléculas. Estas preparações permitem o uso de doses elevadas com redução da toxicidade e são capazes de manter concentrações plasmáticas do fármaco estáveis por maior período (MEHTA, et al.,1994; ESTEY, et al.,1996).

Neste trabalho foi estudada a encapsulação da isotretinoína (Fig. 1) em lipossomas unilamelares constituídos de fosfatidilcolina de soja, avaliando as características de inclusão deste fármaco variando-se os constituintes estruturais dos lipossomas.

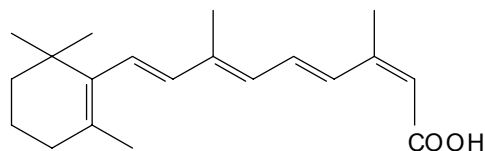


Figura.1. Fórmula estrutural da Isotretinoína (Ácido 13-*cis*-retinóico).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Isotretinoína foi adquirida da MAG Química (Itália). Na preparação dos lipossomas foram utilizados Epikuron 200 (Degussa BioActives), colesterol (Avanti Polar Lipids) e α -tocoferol (Sigma). Demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos lipossomas

Lipossomas foram preparados pelo método de injeção de clorofórmio utilizando fosfatidilcolina de soja (PC - Epikuron 200), colesterol e α -tocoferol na razão molar de 4:1:0,004.

Na preparação dos lipossomas, a fase orgânica foi gotejada sobre a fase aquosa, composta pelo tampão IPB sob agitação através de uma pequena barra magnética à temperatura de 60-65°C. A evaporação da fase orgânica foi promovida por agitação adicional, mantendo-se a temperatura de 60°C, originando vesículas unilamelares grandes (LUVs), que após sonicação foram reduzidas a vesículas unilamelares pequenas (SUVs).

Lipossomas contendo isotretinoína foram obtidos adicionando-se a isotretinoína na fase orgânica juntamente com os componentes estruturais das vesículas.

2.2.2. Medida do Tamanho dos Lipossomas

A determinação do tamanho das vesículas foi realizada empregando a técnica de espalhamento de luz em equipamento ZetaSizer Nano (Malvern Instruments, UK). Uma alíquota de amostra (1,5 mL) foi introduzida no porta-amostras do equipamento e analisada a 25°C. Na análise, foi obtido o Z-average, que corresponde ao diâmetro médio dos lipossomas. A distribuição do tamanho das vesículas foi caracterizada, utilizando o índice de polidispersibilidade, o qual é medido pela extensão da distribuição do tamanho das vesículas (Muller, M.; et al., 2004).

2.2.3. Separação do fármaco livre

Lipossomas contendo o fármaco encapsulado foram separados da fração de isotretinoína livre por cromatografia de exclusão, utilizando uma coluna de vidro de 25 cm de comprimento x 1 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex G-50 Fine (Amersham Biosciences).

Dois mililitros das preparações lipossomais foram aplicados sobre a coluna de sephadex e, eluídos com tampão IPB. Após a aplicação, frações de 3,5mL foram coletadas e cada fração foi submetida à leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50, Varian) para acompanhamento da eluição dos lipossomas e do fármaco.

2.2.4. Determinação da Eficiência de Encapsulação

A quantidade de isotretinoína encapsulada foi calculada com base na curva de calibração obtida por espectrofotometria. Para estas determinações, os lipossomas presentes nas frações contendo o fármaco encapsulado foram rompidos através da adição de etanol, em uma razão 1:3 (v/v).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil de formação dos lipossomas

Foram realizados estudos quanto ao perfil de formação dos lipossomas, levando-se em consideração o diâmetro das vesículas em relação ao tempo de sonicação (Fig.2). Nos testes realizados foi possível observar as possíveis interferências dos diferentes constituintes dos lipossomas no seu perfil de formação.

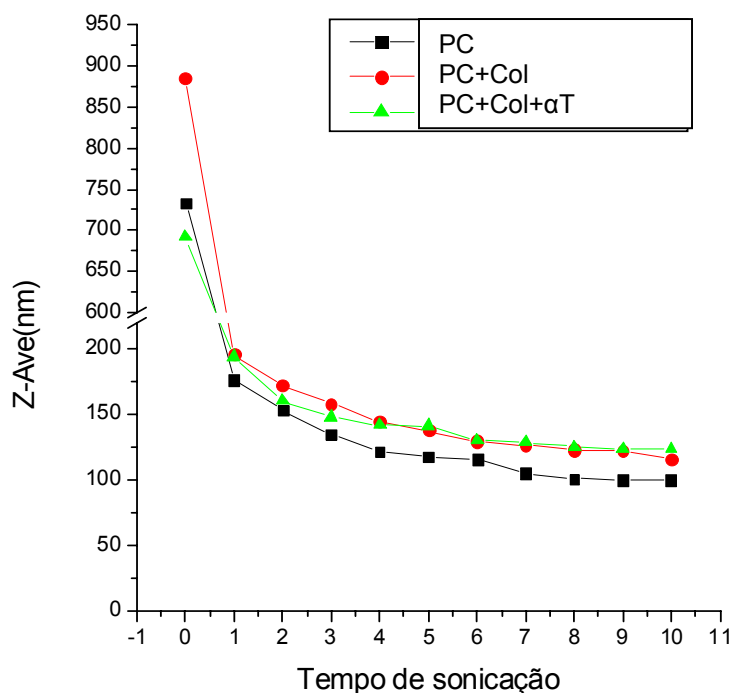


Figura 2. Perfil de formação de lipossomas: Redução do diâmetro (Z-ave) em relação ao tempo de sonicação. PC: fosfatidilcolina, Col: colesterol, α -T: α -tocoferol.

Lipossomas preparados exclusivamente por PC apresentaram o perfil esperado para o diâmetro das vesículas, uma vez que no tempo zero, ou seja, após a preparação dos lipossomas, estes se encontraram na forma de vesículas unilamelares grandes (LUV), o que é característica do método de preparação. Já com o decorrer do tempo de sonicação, o diâmetro das vesículas foi reduzido, observando o surgimento de vesículas unilamelares pequenas (SUV).

A amostra constituída por PC e colesterol, este último utilizado para melhorar a estabilidade das preparações lipossômicas, levou à obtenção de lipossomas maiores. Assim como demonstrado por GHANNAM, et al. (1999) e CÓCERA, et al. (2003), o ensaio revelou um pequeno aumento do diâmetro das vesículas, devido a melhores características de empacotamento da bicamada.

A inclusão do α -tocoferol na membrana dos lipossomas tem o intuito de garantir maior estabilidade química do sistema sem interferir no perfil de formação dos lipossomas uma vez que o α -tocoferol possui baixo peso molecular e está presente em pequena proporção molar em comparação com os demais componentes do sistema.

A figura 3 representa a distribuição das populações lipossomais expressa pela medida de intensidade do espalhamento de luz em relação ao diâmetro das vesículas em diferentes tempos de sonicação. Estes dados permitem observar que no tempo zero, as amostras apresentaram-se distribuídas em diferentes populações, com predomínio de lipossomas de elevado diâmetro. Entretanto, no decorrer do tempo de sonicação, as amostras se apresentaram mais homogêneas e com vesículas de menor diâmetro.

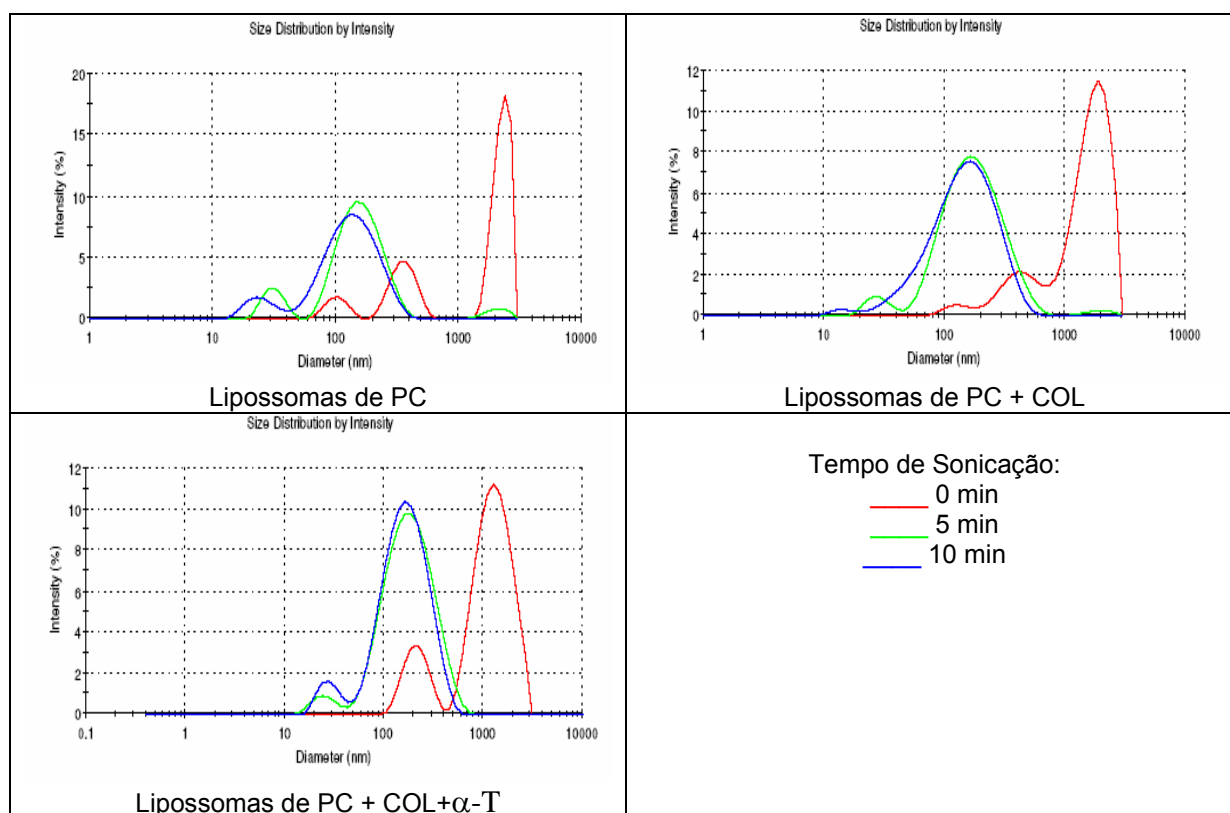


Figura 3. Tamanho e distribuição de tamanho dos lipossomas em relação ao tempo de sonicação.

3.3. Eficiência de Encapsulação

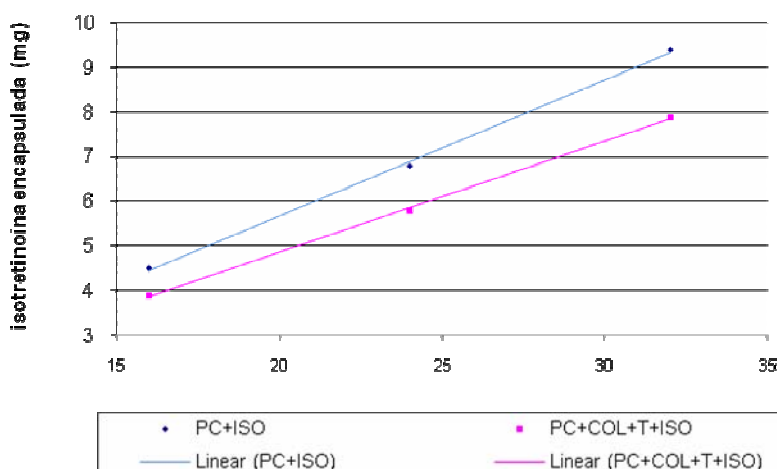
A eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas foi avaliada em relação às diferentes quantidades de fármaco adicionado na preparação e aos diferentes constituintes das vesículas lipossomais (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro dos lipossomas e eficiência de encapsulação da isotretinoína.

Composição dos Lipossomas	mg de fármaco adicionado	Eficiência de Encapsulação			Diâmetro da Vesícula (nm)	PDI
		(%)	mg encaps.	mg encaps./mg PC		
PC	32	29,4	9,4	0,039	153,4	0,241
PC+CHOL+TOC	32	24,7	7,9	0,033	186,8	0,261
PC	24	28,3	6,8	0,028	154,9	0,210
PC+CHOL+TOC	24	24,2	5,8	0,024	167,6	0,198
PC	16	28,1	4,5	0,019	149,6	0,246
PC+CHOL+TOC	16	24,4	3,9	0,016	162	0,229

As preparações contendo colesterol e alfa-tocoferol apresentaram menor eficiência de encapsulação para a isotretinoína, provavelmente devido à competição destas moléculas pela bicamada lipídica no momento de formação dos lipossomas, implicando em uma redução aproximada de 15% na eficiência de encapsulação em comparação com os lipossomas constituídos apenas de fosfatidilcolina (Fig. 4).

Também foi avaliada a eficiência de encapsulação frente a diferentes quantidades de fármaco adicionado, observando-se que preparações contendo maiores concentrações do fármaco apresentaram maior eficiência de encapsulação devido à maior disponibilidade do fármaco na preparação. Entretanto, a eficiência de encapsulação apresenta-se diretamente proporcional à quantidade de fármaco adicionado até certo ponto, quando ocorre saturação da bicamada lipídica e não mais se observa a influência do fármaco adicionado, uma vez que a concentração de fosfolípideos permaneceu a mesma.

**Figura 4.** Eficiência de Encapsulação da Isotretinoína (mg), em relação à quantidade de fármaco adicionado (eixo x) e em relação aos diferentes constituintes das vesículas.

3.4. Estabilidade das vesículas

Os ensaios de estabilidade das preparações lipossomais em relação ao diâmetro das vesículas foram executados com o intuito de observar possíveis ocorrências de agregação.

Amostras de lipossomas analisadas imediatamente após o preparo e após repouso por 20 dias a 4°C não demonstraram alteração de diâmetro. Os resultados obtidos indicam a estabilidade destas preparações nestas condições de armazenamento, uma vez que não houve alteração do diâmetro das vesículas, ou ocorrência de agregação. (Fig.5).

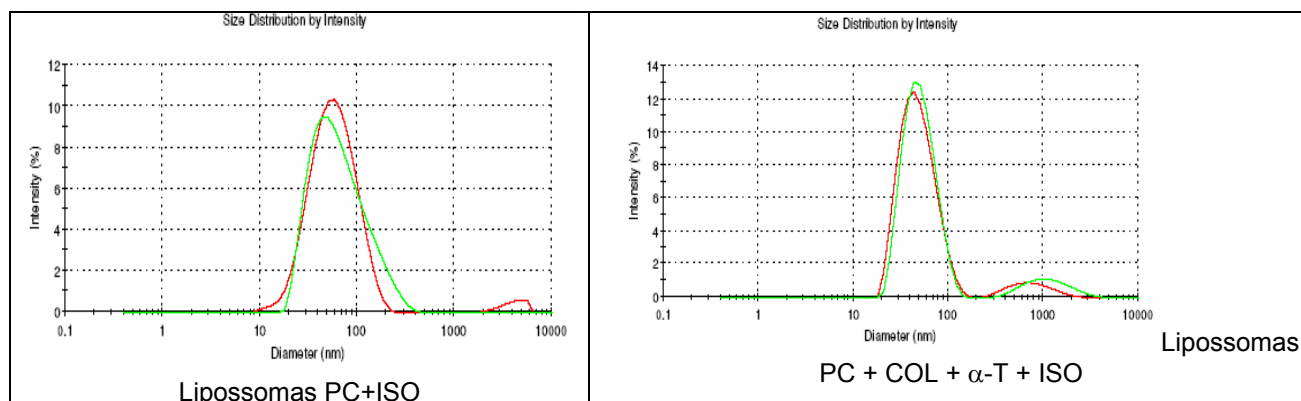


Figura 4. Teste de estabilidade dos lipossomas:
 — Análise após preparação; — Análise após repouso (20 dias).

4. CONCLUSÕES

Lipossomas contendo isotretinoína apresentaram-se como vesículas de pequeno diâmetro e baixa polidispersibilidade (PDI), resultando em uma preparação contendo grande número de vesículas com homogeneidade na distribuição do tamanho e contendo o fármaco em concentrações com potencial para futuras aplicações em estudos de atividade farmacológica.

A eficiência de encapsulação da isotretinoína em lipossomas mostrou-se satisfatória, uma vez que numerosas vesículas lipídicas permitiram a encapsulação do fármaco na bicamada lipídica, devido ao caráter apolar da molécula. A presença de colesterol na bicamada lipídica parece exercer competição com a isotretinoína pela sua localização, reduzindo a eficiência de encapsulação deste fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGBY, M. D.; STERN, R. S. Adverse reactions to isotretinoin. A report from the Adverse Drug Reaction Reporting System. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis. v. 18, p. 543-552, 1988.
- COCERA, M.; LOPES, O.; CODERCH, L.; PARRA, J. L.; MAZA, A. Permeability investigations of phospholipid liposomes by adding cholesterol. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* v. 221, p. 9-17, 2003.
- CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; GAMBARI, R.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C. Liposome-associated retinoids: production, characterization and antiproliferative activity on neoplastic cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* v. 2, p. 281-291, 1994.
- DINIZ, D.G.A.; LIMA, E.M.; FILHO, N.R.A. Isotretinoína: perfil farmacológico, farmacocinético e analítico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* v. 38, p. 415-430, 2002.
- ELLIS, C.N.; KRACH, K.J. Uses and complications of isotretinoin therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* v. 45, p. 150-157, 2001.
- ESTEY, E.; THALL, P. F., MEHTA, K.; ROSENBLUM, M.; BREWER, T.; SIMMONS, V.; CABANILLAS, F.; KURZROCK, R.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Alterations in tretinoin pharmacokinetics following administration of liposomal all-trans retinoic acid. *Blood.* v. 87, p. 3650-3654, 1996.
- GABISON, A. Liposomes as a drug delivery system in cancer chemotherapy. *J. Wiley & Sons.* p. 185-21, 1989.
- GHANNAM, M. M.; MADY, M.M.; KHALIL, W. A. Interaction of tipo-I collagen with phospholipi monolayer. *Biophys Chem.*, v.80, p.31-40, 1999.
- GREGORIADIS, G. Engineering lipossomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech December.* v.13, p.527-537,1995.

LASIC, D. D. Liposome. *Farm Vestn.* v.40, p.197-208, 1989.

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

MEHTA, K.; SADEGHI, T.; MCQUEEN, T.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Liposome encapsulation circumvents the hepatic clearance mechanisms of all-trans-retinoic acid. *Leuk. Res.* v.18, p. 587-596, 1994.

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C..Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. *Int. J. Pharm.* v. 274, p.139-148, 2004.

SINGH, A. K.; DAS, J. Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophysical Chemistry.* v.73, p. 155-162, 1998.

USP 30 – United States Pharmacopeia 30ed. Pharmacopeial convention, Rockville, 2007.

VEMURI, SRIRAM.; RHODES, C. T. Preparatation and characterization of lipossomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* v. 70, p.95-111, 1995.

WHITE, G. M. Acne therapy. *Disease-a-month.* v. 45, p. 301-332, 1999.