



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS DE CARBOPLATINA
REVESTIDOS COM O-PALMITOILPULULANO**

João Nuno Sereno de Almeida Moreira

COIMBRA
1994

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS DE CARBOPLATINA
REVESTIDOS COM O-PALMITOILPULULANO**

João Nuno Sereno de Almeida Moreira

COIMBRA

1994

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
23	17	..."dispersão mecânica"...	..."dispersão física"...
23	23	..."dispersão do solvente"...	..."dispersão de duas fases"...
31	9	..."formado unidades"...	..."formado por unidades"...
67	18	..."absorção por alongação"...	..."vibração por alongação"...
67	20	..."absorção por alongação"...	..."vibração por alongação"...
67	24	..."à absorção"...	..."à vibração"...
69	4	..."absorção por alongação"...	..."vibração por alongação"...
69	5	..."à absorção por"...	..."à vibração por"...
69	18	..."grupo metilo β "...	..."grupo metilénico β "...
69	18	..."grupo metilo α "...	..."grupo metilénico α "...
71	15	..."grupo metilo β "...	..."grupo metilénico β "...
71	16	..."grupo metilo α "...	..."grupo metilénico α "...
87	10	..."amostra"...	..."amostras"...

Dissertação de Mestrado submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Baptista da Costa, no âmbito do Curso de Mestrado em Biologia Celular.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica da
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Aos meus pais
e à Isabel

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria de Lourdes Baptista da Costa, o meu profundo reconhecimento pela sua orientação científica, permanente disponibilidade e palavras amigas de incentivo, indispensáveis para a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Leonor Martins de Almeida, o meu sincero agradecimento pelas decisivas sugestões científicas, pela disponibilidade e apoio sempre demonstrados, pelas facilidades laboratoriais que disponibilizou e ainda pela revisão crítica deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Pinho de Brojo, pelo interesse com que tem seguido a minha vida académica e pelo apoio sempre demonstrado.

Ao Professor Doutor Adriano Teixeira Barbosa de Sousa, pelo privilégio da sua amizade, pelo apoio e pelas facilidades sempre concedidas.

Ao Professor Doutor Arsélio Pato de Carvalho, Coordenador do Mestrado em Biologia Celular, pela oportunidade concedida para a realização deste Mestrado.

Ao Professor Doutor André Campos Neves, pelos preciosos esclarecimentos acerca do mecanismo de síntese do O-palmitoilpululano bem como pelas facilidades experimentais concedidas para a execução da reacção de síntese.

Ao Professor Doutor Vítor Madeira, pelas valiosas sugestões e pelo auxílio experimental prestado, designadamente, nas determinações de absorção atómica realizadas.

Ao Professor Doutor Carlos Geraldês, pelo indispensável apoio prestado na caracterização do O-palmitoilpululano por Ressonância Magnética Nuclear.

À Professora Doutora Conceição Pedroso de Lima, pelos esclarecimentos prestados sobre o método de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa e extrusão.

Às Professoras Doutoradas Margarida Figueiredo e Graça Rasteiro, pelas facilidades concedidas na utilização da técnica para medição do diâmetro médio dos lipossomas.

Ao Professor Doutor João Alface, pelos esclarecimentos prestados sobre cromatografia de exclusão molecular.

Aos Licenciados João Laranjinha, Teresa Dinis e José Custódio pela pronta colaboração e pelos esclarecimentos prestados, sempre que solicitados.

Ao Mestre Jorge Salvador, pela colaboração desinteressada e pela permanente disponibilidade demonstrada.

Aos colegas e amigos Mestre Sérgio Simões e Licenciado Luís Almeida, pelo interesse demonstrado por este trabalho, pelas discussões altamente proveitosas e pelas contínuas palavras de incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, pelo apoio sempre demonstrado e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bioquímica e de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia.

A todos aqueles, que directa ou indirectamente, tornaram possível a concretização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	5
1.1. VECTORIZAÇÃO DE FÁRMACOS.....	6
1.1.1. Introdução ao Conceito de Vectorização de Fármacos.....	6
1.1.2. Objectivos da Vectorização de Fármacos.....	8
1.1.3. Classificação dos Vectores de Fármacos.....	10
1.1.3.1. Vectores de 1ª Geração.....	11
1.1.3.2. Vectores de 2ª Geração.....	11
1.1.3.2.1. Vectorização Passiva.....	12
1.1.3.2.2. Vectorização Activa.....	12
1.1.3.3. Vectores de 3ª Geração.....	13
1.2. OS LIPOSSOMAS COMO VECTORES DE FÁRMACOS.....	16
1.2.1. Vantagens e Potenciais Aplicações.....	16
1.2.2. Constituintes Químicos Principais.....	17
1.2.3. Estrutura Física dos Lipossomas.....	19
1.2.4. Metodologia de Preparação de Lipossomas.....	23
1.2.4.1. Preparação de Lipossomas.....	23
1.2.4.2. Purificação de Lipossomas.....	24
1.2.4.3. Caracterização de Lipossomas.....	25
1.3. OS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM POLISSACARÍDEOS	
NA VECTORIZAÇÃO DE FÁRMACOS.....	26
1.3.1. Objectivos do Revestimento.....	26

1.3.2. Tipos de Polissacarídeos	27
1.3.3. Modificação Química do Pululano	30
1.4. VECTORIZAÇÃO DE CARBOPLATINA EM LIPOSSOMAS	33
1.5. OBJECTIVOS E BREVE DESCRIÇÃO DO TRABALHO.....	37
CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS	41
2.1.1. Preparação de Lipossomas.....	41
2.1.1.1. Preparação de Lipossomas Unilamelares Grandes	41
2.1.1.2. Preparação de Lipossomas Unilamelares Pequenos.....	44
2.1.2. Purificação de Lipossomas.....	45
2.1.3. Determinação Quantitativa de Fosfolípido.....	46
2.1.4. Caracterização de Lipossomas.....	47
2.1.4.1. Capacidade de Ligação.....	48
2.1.4.2. Eficiência de Encapsulação.....	48
2.1.4.3. Tamanho.....	49
2.1.4.4. Volume de Encapsulação	50
2.1.4.5. Recuperação.....	51
2.2. REVESTIMENTO DE LIPOSSOMAS COM	
O-PALMITOILPULULANO	51
2.2.1. Síntese e Caracterização do O-palmitoilpululano	51
2.2.2. Preparação de Lipossomas Revestidos	53
2.3. ESTUDO DO EFEITO DO REVESTIMENTO NA MEMBRANA	
LIPOSSOMAL.....	53
2.3.1. Estudo de Permeabilidade.....	53
2.3.2. Estudo de Fluidez.....	56

2.4. ESTUDOS REALIZADOS EM LIPOSSOMAS CONTENDO	
CARBOPLATINA	61
2.4.1. Análise do Efeito da Carboplatina na Fluidez da Membrana Lipossomal.....	61
2.4.2. Doseamento da Carboplatina.....	62
2.4.3. Análise do Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação na Encapsulação de Carboplatina.....	63
2.4.4. Estudo Acelerado de Estabilidade de Lipossomas de Carboplatina	63
 CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
 3.1. CARACTERIZAÇÃO DO O-PALMITOILPULULANO	67
3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho.....	67
3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear Protónica.....	69
 3.2. EFEITO DO O-PALMITOILPULULANO NA MEMBRANA	
LIPOSSOMAL	74
3.2.1. Efeito na Permeabilidade	74
3.2.1.1. Análise Comparativa entre Lipossomas Unilamelares Pequenos e Grandes Não Revestidos e Lipossomas Unilamelares Grandes Revestidos	74
3.2.1.2. Análise de Diferentes Razões Ponderais OPP/PC	82
3.2.2. Efeito na Fluidez	86
 3.3. ESTUDOS REALIZADOS EM LIPOSSOMAS CONTENDO	
CARBOPLATINA	89
3.3.1. Efeito da Carboplatina na Fluidez da Membrana Lipossomal.....	90
3.3.2. Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação na Encapsulação de Carboplatina	92

3.3.3. Estudo Acelerado de Estabilidade de Lipossomas de Carboplatina	96
3.3.3.1. Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação e do Revestimento com O-palmitoilpululano.....	96
3.3.3.2. Efeito de Diferentes Razões Ponderais OPP/PC.....	102
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

ABREVIATURAS

CF: 5 (6)-carboxifluoresceína.

CF_i/PC_i: razão molar entre a 5 (6)-carboxifluoresceína e a fosfatidilcolina de ovo determinados na fase de hidratação.

CL: capacidade de ligação.

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DPH-PA: ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]fenilpropiónico.

DPH: 1,6-difenilhexa-1,3,5-trieno.

DSHA: n-hexadecil-5-dimetilamino-1-naftalenosulfonamida.

EE: eficiência de encapsulação.

OPAP: O-palmitoilamilopectina.

OPP: O-palmitoilpululano.

PC: fosfatidilcolina de ovo.

p.a.: pró-análise.

RMN-¹H: ressonância magnética nuclear protónica.

RMN: ressonância magnética nuclear.

r.p.m.: rotações por minuto.

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

TMS: tetrametilsilano.

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol.

u.a.: unidades arbitrárias.

VE: Volume de encapsulação.

RESUMO

Um dos campos de aplicação dos lipossomas como vectores de fármacos tem sido a quimioterapia do cancro, permitindo, por um lado, a diminuição de efeitos tóxicos associados à administração de citostáticos e, por outro lado, o aumento da eficácia terapêutica. Este trabalho teve por objectivo a vectorização de um fármaco citostático, a carboplatina, em lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo preparados pela combinação dos métodos de evaporação em fase reversa e extrusão, e revestidos com um polissacarídeo natural modificado, o O-palmitoilpululano. Este sistema foi caracterizado, fundamentalmente, em termos do efeito quer do O-palmitoilpululano quer da carboplatina na fluidez membranar, de alguns parâmetros de encapsulação do fármaco, bem como da sua estabilidade (tendo para o efeito sido realizados, entre outros, estudos preliminares de permeabilidade).

A caracterização do O-palmitoilpululano por espectroscopia de infravermelho revelou a formação de uma ligação éster entre o grupo palmitoilo e o pululano, enquanto que a caracterização por ressonância magnética nuclear de protão permitiu determinar que o grau de substituição era de 0.4 resíduos palmitoilo por 100 unidades de glucose (0.4%).

Os estudos de permeabilidade membranar preliminares realizados por recurso ao método fluorimétrico da 5 (6)-carboxifluoresceína (substância hidrossolúvel empregue como modelo da carboplatina) apontam para uma maior estabilidade dos lipossomas unilamelares grandes relativamente aos lipossomas unilamelares pequenos. Na sequência deste estudo avaliou-se o efeito do revestimento na permeabilidade membranar de lipossomas unilamelares grandes para razões ponderais de O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina de ovo de 1 a 4, relativamente a uma amostra controlo (lipossomas unilamelares grandes não revestidos). Concluiu-se que a razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 3 era aquela que induzia uma menor permeabilidade membranar.

Os dados de permeabilidade, a par dos valores de polarização de fluorescência do ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]fenilpropiónico, apontam para um efeito de estabilização da membrana lipossomal pelo O-palmitoilpululano (na razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 3 e com um grau de substituição de 0.4%), respectivamente, por diminuição da permeabilidade membranar e por diminuição da fluidez.

O estudo da influência da carboplatina na fluidez membranar, por determinação dos valores de polarização do 1,6-difenilhexa-1,3,5-trieno e do ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]fenilpropiónico, apontou para uma ausência de efeito do fármaco.

Verificou-se também que o conteúdo em NaCl do meio de hidratação influencia a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas. Ambos os parâmetros apresentam a mesma tendência de variação em função do teor de NaCl do meio de hidratação, aumentando à medida que aumenta a concentração de NaCl do meio de hidratação até 0.6%, após o que diminuem quando a concentração aumenta para 0.9%. O perfil de variação destes parâmetros de encapsulação relaciona-se com o diâmetro médio dos lipossomas os quais apresentam a mesma tendência de variação em função da concentração de NaCl do meio de hidratação.

No que respeita à estabilidade dos lipossomas de carboplatina (avaliada em termos da capacidade de retenção de platina), observou-se uma tendência para uma maior estabilidade quando preparados num meio de hidratação sem NaCl (meio de dextrose 5%) relativamente àqueles preparados em meio de NaCl nas concentrações de 0.6 e 0.9% (os meios de hidratação foram adicionados de dextrose de forma a constituírem soluções isotónicas), facto atribuído à presença de iões cloreto nestes últimos. Em face deste dado, foram realizados estudos de estabilidade com lipossomas de carboplatina revestidos na proporção ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 3 e preparados em meio de dextrose a 5%, tendo-se verificado uma maior estabilidade destes relativamente aos lipossomas não revestidos. Esta

maior estabilidade reflectiu-se igualmente numa menor diminuição do diâmetro médio dos lipossomas revestidos, em função do tempo, relativamente aos lipossomas não revestidos.

No âmbito dos estudos realizados com lipossomas revestidos, verificou-se que a utilização de uma razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 7.5 determinou uma redução acentuada da percentagem de retenção de platina ao fim de 6 dias, comparativamente com os lipossomas revestidos na razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 3 e mesmo em relação aos lipossomas não revestidos. Esta menor estabilidade dos lipossomas revestidos na razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina igual a 7.5 reflectiu-se também numa maior diminuição do tamanho dos lipossomas em função do tempo.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. VECTORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

1.1.1. Introdução ao Conceito de Vectorização de Fármacos

A administração extravascular (como por exemplo, as vias oral, cutânea, rectal, etc.) de um fármaco¹ é seguida sequencialmente no organismo pelos seguintes processos farmacocinéticos: absorção, que consiste na chegada do fármaco ao sangue; distribuição, traduzida pela passagem do fármaco do sangue para diferentes tecidos, entre os quais, o ou os correspondentes ao local de acção, e para o ou os órgãos de eliminação; e eliminação, que se traduz pela depuração do fármaco quimicamente intacto (mais frequentemente por via urinária) e/ou pela sua metabolização em um ou mais metabolitos (Monteiro, 1986; Roblot-Treupel e Puisieux, 1986).

Por administração intravascular (por exemplo, por injeção intravenosa) o conjunto de processos farmacocinéticos descritos aparece simplificado, uma vez que não ocorre a fase de absorção e como tal o fármaco é apenas sujeito à distribuição e à eliminação.

Qualquer dos processos farmacocinéticos depende essencialmente das características físico-químicas do fármaco, como seja, por exemplo, o pKa (Roblot-Treupel e Puisieux, 1986). Em termos práticos, a administração de um fármaco traduz-se pela sua distribuição indiscriminada pelos diversos tecidos, órgãos ou células do organismo e, conseqüentemente, por uma ausência de especificidade para a ou as áreas que necessitam de tratamento, resultando daí muitas vezes o aparecimento de efeitos secundários de toxicidade elevada.

Assim, a tendência actual da investigação em Tecnologia Farmacêutica é a de desenvolver novos sistemas susceptíveis, não só, de aumentar a eficácia terapêutica (por exemplo, por redução do número das doses e da quantidade de fármaco administrado por dose) e a segurança dos fármacos administrados pelos métodos ditos convencionais (caracterizados por uma absorção rápida), de facilitar, por exemplo, a administração de peptídeos e proteínas sem o desenvolvimento acentuado de reacções imunogénicas ou a

¹ Garret (1986, p. 16) define "fármacos" como sendo "todos os agentes químicos capazes de modificar as funções dos seres vivos". No presente trabalho utiliza-se indistintamente os termos "substância activa" e "princípio activo" como sinónimos de "fármaco".

inactivação biológica, mas também, de melhorar a aplicação, nomeadamente, das terapias anticancerígenas através de uma maior especificidade do fármaco para o local de acção (Li, Robinson e Lee, 1987). Com o intuito de atingir estes objectivos têm-se desenvolvido essencialmente dois tipos de sistemas, por um lado, as formas farmacêuticas² de libertação prolongada e, por outro lado, os vectores de fármacos.

As formas farmacêuticas de libertação prolongada controlam a velocidade de cedência dos fármacos a partir das formas farmacêuticas, controlando deste modo a biodisponibilidade³ dos mesmos. Estes sistemas têm por objectivo prolongar as concentrações plasmáticas terapêuticas dos fármacos e assim a sua duração de acção (daí a necessidade de incorporar uma quantidade superior de fármaco em relação à forma farmacêutica convencional, que se caracteriza por uma absorção rápida), reduzir as flutuações dos níveis plasmáticos dos fármacos e, desta forma, melhorar a segurança e diminuir os seus efeitos laterais, bem como assegurar uma melhor cobertura terapêutica do paciente (Li, Robinson e Lee, 1987; Veiga, 1988). Refira-se, como exemplo, os sistemas matriciais poliméricos (Veiga, 1988).

Os vectores de fármacos (ou a vectorização de fármacos, vulgarmente designada na linguagem anglo-saxónica por "drug targeting") têm por finalidade tornar a distribuição no organismo independente das propriedades físico-químicas inerentes à molécula a veicular, submetendo-a àquelas de um agente apropriado (vector), escolhido em função de um determinado objectivo terapêutico (Benoit *et al.*, 1986; Roblot-Treupel e Puisieux, 1986; Puisieux e Roblot-Treupel, 1989). Mencione-se a título de exemplo destes sistemas os lipossomas, que são objecto de estudo neste trabalho.

Na figura 1 apresenta-se de forma esquemática cada um dos processos farmacocinéticos a que um fármaco é submetido no organismo, bem como os níveis de actuação dos dois tipos de sistemas terapêuticos anteriormente referidos.

² De acordo com o Decreto - Lei nº 72/91, de 8 de Fevereiro no seu artigo 2º, o termo "forma farmacêutica" define-se como sendo "o estado final que as substâncias activas apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado" (in Pita, 1993, p. 58).

³ A biodisponibilidade ou disponibilidade fisiológica representa a quantidade relativa de fármaco absorvido a partir de uma forma farmacêutica que atinge a circulação sistémica e a velocidade à qual se processa este fenómeno (Veiga, 1989).

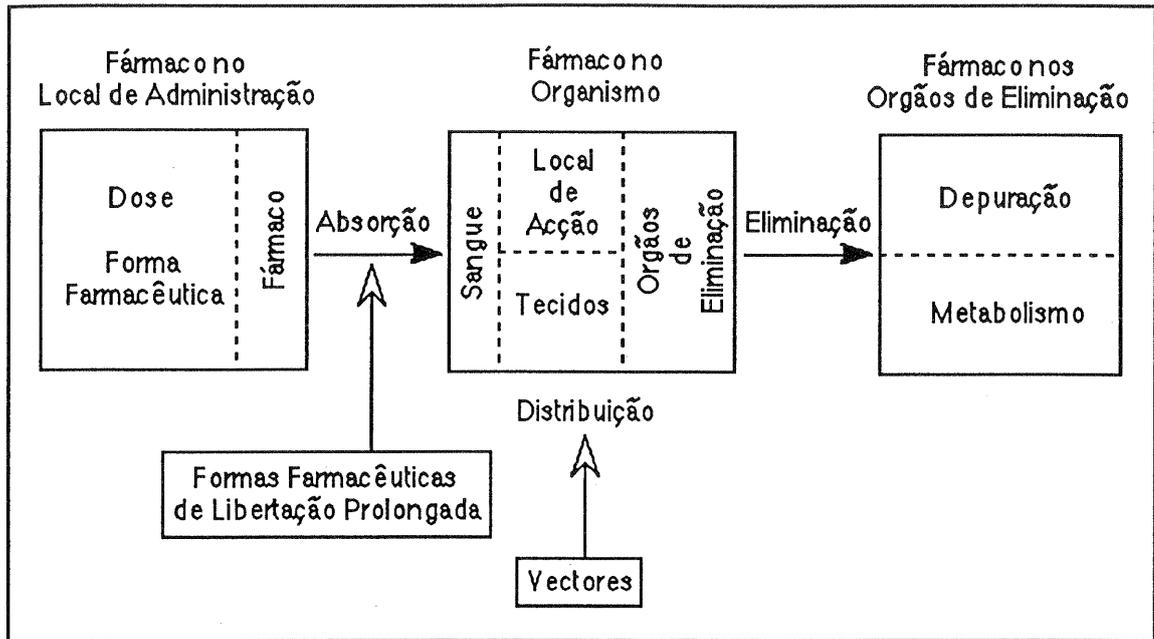


Figura 1: Conjunto de processos farmacocinéticos a que um fármaco é submetido no organismo e níveis de actuação das formas farmacêuticas de libertação controlada e dos vectores de fármacos. Após administração um fármaco é sujeito aos processos de absorção (chegada do fármaco ao sangue), apenas se a administração for extravascular, distribuição (passagem do fármaco do sangue para os diferentes tecidos, entre os quais, o ou os correspondentes ao local de acção, e o ou os órgãos de eliminação) e eliminação (depuração da substância activa quimicamente intacta, mais frequentemente por via urinária, e/ou metabolização daquele em um ou mais metabolitos). As forma farmacêuticas de libertação prolongada e os vectores actuam, respectivamente, ao nível da biodisponibilidade (absorção) e da distribuição (adaptado de Roblot-Treupel e Puisieux, 1986).

1.1.2. Objectivos da Vectorização de Fármacos

A associação de um fármaco a um vector apropriado tem, pelo menos, três objectivos principais que a seguir se descrevem e que se encontram esquematizados na figura 2 (Roblot-Treupel e Puisieux, 1986):

- protecção da molécula activa desde o local de administração até ao local de acção, propriedade que é inerente ao próprio vector (refira-se como exemplo o caso do ATP, adenosina trifosfato, cuja administração quando encapsulado em lipossomas aumenta de

forma significativa os seus níveis plasmáticos durante a ocorrência de períodos de isquémia, o que determina uma maior afluência de ATP ao cérebro, ao contrário do que acontece quando administrado na forma livre pela mesma via, em que é rapidamente eliminado da corrente circulatória - Delattre *et al.*, 1989);

- melhoramento da transposição de algumas barreiras fisiológicas por parte de certas moléculas activas (por exemplo, a associação a um vector apropriado poderá ser tentada no sentido de melhorar a penetração intracelular de fármacos como os antibióticos - Couvreur, Fattal e Andremont, 1991 - e desta forma alcançar zonas celulares de difícil acesso);

- melhoramento da especificidade dos fármacos (por um lado, concentrar um fármaco, caso dos citostáticos, num determinado órgão, tecido ou célula - Iga *et al.*, 1991 - e/ou, por outro lado, evitar a sua acumulação em tecidos particularmente sensíveis aos seus efeitos indesejáveis - Losa *et al.*, 1992).

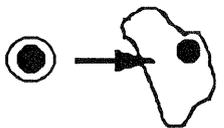
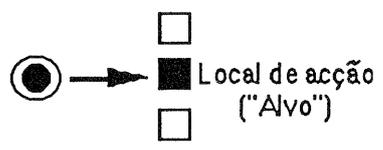
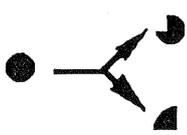
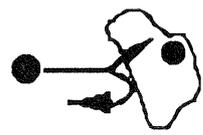
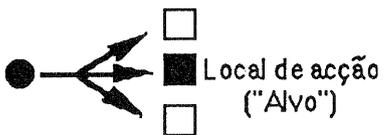
	Protecção contra a inactivação	Penetração celular	Especificidade
Fármaco + Vector			
Fármaco livre			

Figura 2: Objectivos da vectorização de fármacos. A associação de um fármaco a um vector tem essencialmente três finalidades: protecção do fármaco desde o local de administração do medicamento até ao seu local de acção; melhoramento da transposição de certas barreiras fisiológicas por parte de certos fármacos; bem como o melhoramento da especificidade destes. ● - fármaco; ○ - vector; ■ - local de acção ("Alvo"); □ - outros locais (adaptado de Roblot-Treupel e Puisieux, 1986).

A concretização destes objectivos depende necessariamente das características do vector. Segundo diversos autores as características de um bom vector dependem do fim a

que se destina e incluem os seguintes parâmetros (Couvreur, Kante e Roland, 1978; Puisieux, 1978; Jaminet, 1980; Davies e Illum, 1986):

- deve ser biocompatível e biodegradável, qualquer que seja a via de administração, não devendo induzir a formação de metabolitos tóxicos;

- deve possuir uma forma e um tamanho⁴ convenientes, de modo a, por um lado, permitir a incorporação de uma quantidade de fármaco susceptível de exercer o efeito terapêutico desejado e, por outro lado, alcançar determinados objectivos em termos de distribuição *in vivo*;

- deve proteger o princípio activo desde o local de administração até ao local de acção;

- deve possuir poder de fixação da substância medicamentosa de modo a evitar a sua libertação prematura até alcançar o local de acção;

- ao nível do local de acção, deve ser susceptível de libertar a molécula activa o que implica que a ligação vector-fármaco seja reversível;

- deve apresentar uma certa afinidade para um determinado tipo de órgãos, tecidos ou células, afinidade essa que deve ser susceptível de ser modificada em função do princípio activo administrado e do local de acção visado.

1.1.3. Classificação dos Vectores de Fármacos

Os numerosos estudos realizados até ao momento conduziram à elaboração de vectores de fármacos cada vez mais complexos. Os vectores actualmente propostos, em função do objectivo terapêutico, podem ser divididos em três grupos principais: vectores de 1ª geração, vectores de 2ª geração e vectores de 3ª geração que a seguir se passam a

⁴ Neste trabalho, entenda-se por "tamanho" de lipossomas o seu "diâmetro médio".

descrever (Benoit *et al.*, 1986; Roblot-Treupel e Puisieux, 1986; Puisieux e Roblot-Treupel, 1989).

1.1.3.1. Vectores de 1ª Geração

O vector de 1ª geração é um suporte simples, de tamanho relativamente elevado (entre 100 e 800 μm), concebido para libertar o princípio activo ao nível de um determinado órgão. Neste grupo incluem-se as microcápsulas, que são sistemas formados por um reservatório, delimitado por uma parede polimérica, onde se encontra dissolvido o princípio activo, e as microsferas, as quais são formadas por uma matriz polimérica onde se encontra disperso o princípio activo. Os materiais utilizados são de natureza variável (etilcelulose, ácido poliláctico, copolímeros do ácido láctico e glicólico), biodegradáveis ou não.

Os vectores de 1ª geração são bastante utilizados na administração de algumas substâncias antitumorais (cisplatínio, adriamicina, metotrexato, 5-fluoruracilo), caracterizando-se por necessitar de um modo de administração apropriado que permita a implantação do sistema medicamentoso o mais próximo possível do órgão desejado. Este sistema de administração é designado por embolização. As microsferas ou as microcápsulas são administradas por via intra-arterial, sendo conduzidas por cateteres ao nível da artéria que irriga o tumor visado, onde se liberta e difunde o agente antitumoral. A obliteração da artéria, induzida pelas microsferas e microcápsulas, determina uma necrose progressiva do tumor. Assim, através do agente antitumoral que veiculam, as microsferas e as microcápsulas, para além de uma acção mecânica, exercem também um efeito quimioterapêutico que tem a vantagem de ser focalizado no órgão pretendido.

1.1.3.2. Vectores de 2ª Geração

Os vectores de 2ª geração, também chamados, vectores propriamente ditos, não necessitam de nenhum modo de administração particular. De tamanho coloidal, geralmente inferior a 1 μm , podem ser administrados por numerosas vias, de que salienta a via

intravenosa, sendo o local biológico visado um tecido. Dentro deste grupo distinguem-se dois tipos de vectorização: passiva e activa.

1.1.3.2.1. Vectorização Passiva

Na vectorização passiva, a distribuição do princípio activo depende apenas das características físico-químicas do vector escolhido (como por exemplo, o tamanho), ocorrendo preferencialmente para os órgãos ricos em células do sistema monocítico fagocitário (como por exemplo, as células de Kupffer do fígado e os macrófagos do baço, pulmões e medula). Refiram-se como exemplo deste tipo de sistemas, os vectores vesiculares (os lipossomas e as nanocápsulas) e os vectores particulares (as nanosferas).

Os lipossomas são pequenas vesículas constituídas por um núcleo aquoso delimitado por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, consoante o tipo de lipossoma, sendo susceptíveis de veicular fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis. Como já referido, os lipossomas são objecto de estudo neste trabalho, pelo que serão abordados em mais pormenor em secções posteriores. As nanocápsulas são formadas por uma cavidade oleosa, delimitada por uma parede de natureza polimérica, sendo, por esta razão, indicadas para a administração de fármacos de carácter lipófilo.

As nanosferas são constituídas por uma rede de natureza polimérica ou proteica, não se distinguindo qualquer tipo de cavidade ou parede, destinando-se à administração de fármacos susceptíveis de serem incorporados na matriz polimérica ou proteica.

1.1.3.2.2. Vectorização Activa

Neste tipo de vectorização incluem-se os lipossomas, nanocápsulas e nanoesferas, sendo a distribuição do princípio activo dependente de factores extracorporais, como, por exemplo, a temperatura e a presença de partículas magnéticas.

O princípio de utilização da temperatura na libertação selectiva de um princípio activo encapsulado em lipossomas, ao nível de um dado tecido, baseia-se na combinação de um

efeito de hipertermia local ao nível do tecido lesado e no facto das vesículas possuírem uma temperatura de transição que é superior à temperatura fisiológica (37°C). Assim a passagem do lipossoma na região próxima do tecido em causa, determina a transição do estado gele (em que as cadeias hidrocarbonadas dos constituintes fosfolipídicos da bicamada apresentam uma estrutura ordenada) para o estado líquido-cristalino (em que as cadeias hidrocarbonadas dos constituintes fosfolipídicos da bicamada apresentam uma estrutura desordenada) da membrana lipossomal, com a conseqüente libertação do princípio activo no tecido lesado ou numa região adjacente. Esta metodologia tem sido testada com sucesso, em termos de especificidade de acção e de redução de efeitos tóxicos secundários, na administração do cisplatínio (Iga *et al.*, 1991).

A utilização de partículas magnéticas baseia-se na sua incorporação no vector, sendo o sistema vector-fármaco, após administração, guiado por um íman extra-corporal. Desta forma, Ibrahim *et al.* (1983) conseguiram triplicar a concentração, nos rins, de nanosferas de polialquilcianoacrilato contendo dactinomicina e partículas de magnetite, por colocação de um íman extra-corporal ao nível dos rins. Paralelamente conseguiram reduzir em cerca de um terço, a concentração de nanopartículas no fígado.

1.1.3.3. Vectores de 3ª Geração

Os vectores de 3ª geração são suportes vesiculares, particulares ou moleculares acoplados a elementos capazes de reconhecer especificamente o "alvo" biológico visado, celular ou intracelular. Actualmente os elementos de reconhecimento mais utilizados são os anticorpos monoclonais e as glicoproteínas. Os anticorpos são proteínas que são formadas em resposta a determinados agentes (antigénios) e que reagem especificamente com eles, inactivando-os. Uma condição fundamental para o aparecimento do anticorpo é que o agente seja reconhecido como estranho (Constantino, 1990). No âmbito da vectorização de fármacos, a importância dos anticorpos monoclonais resulta do facto de poderem reconhecer selectivamente "alvos" moleculares existentes à superfície de algumas células, nomeadamente, tumorais. As glicoproteínas são moléculas que possuem resíduos de

carboidratos que lhes permitem a ligação selectiva a certas células, nomeadamente, aos hepatócitos.

Neste contexto dos vectores de 3ª geração, uma das estratégias inicialmente utilizadas consistiu no acoplamento directo de fármacos a anticorpos monoclonais. No entanto, esta metodologia é limitada pelo número restrito de fármacos susceptível de se ligar aos anticorpos monoclonais, pela fraca capacidade destes em acumularem fármaco e pelo facto da ligação poder inactivar, quer o fármaco, quer o anticorpo monoclonal. Em consequência, propôs-se, alternativamente, o acoplamento dos anticorpos monoclonais a vectores coloidais contendo o fármaco a veicular.

Este grupo de vectores abriu incontestavelmente novos horizontes no campo da vectorização, constituindo potencialmente uma forma de aumentar a selectividade de fármacos, especialmente daqueles dotados de uma grande toxicidade como sejam os citostáticos. Existe ainda, todavia, uma série de questões importantes a resolver:

- o incompleto conhecimento das características antigénicas dos tumores;
- a reduzida especificidade dos antígenios das células malignas;
- o risco de neutralização prematura dos anticorpos monoclonais pelos antígenios circulantes, libertados a partir da superfície das células malignas.

Neste grupo dos vectores de 3ª geração incluem-se também vectores macromoleculares como é o caso do ácido desoxirribonucleico (DNA), o qual tem a propriedade de induzir processos de endocitose ao nível celular, particularmente ao nível de células malignas. Há já registo de estudos em que, por recurso ao acoplamento do DNA com a daunorubicina ou a adriamicina, se conseguiu aumentar a especificidade de acção destes fármacos e, paralelamente, diminuir os seus efeitos secundários (Couvreur, Kante e Roland, 1978; Jaminet, 1980; Poznansky e Juliano, 1984).

Com o objectivo de atribuir alguma capacidade de reconhecimento aos lipossomas e assim melhorar a sua utilização como vectores de fármacos, uma das estratégias actualmente em estudo consiste no seu revestimento com polissacarídeos naturais, como por exemplo a

amilopectina, o manano e o pululano, que serão abordados na secção 1.3.2.. No entanto, a inclusão dos lipossomas revestidos com o pululano no grupo dos vectores de 3ª geração apenas se justifica se a este polissacarídeo for acoplado um anticorpo monoclonal, uma vez que o pululano, por si só, é praticamente desprovido de capacidade de reconhecimento celular.

Na tabela I apresenta-se de forma sistemática a classificação e algumas das características dos grupos de vectores de fármacos descritos.

Tabela I: Classificação dos vectores de fármacos (adaptado de Benoit *et al.*, 1986).

Geração	1ª	2ª		3ª
Local de acção	Orgãos	Tecidos		Células
Tamanho	> 1 µm	< 1 µm		< 1 µm
Vectores	Microsféras Microcápsulas	Passivos	Activos	Anticorpos monoclonais Suporte molecular (ex.: DNA) Suporte vesicular (ex.: lipossomas) ou particular (ex.: nanosferas) Glicoproteínas Lipossomas revestidos com polissacarídeos Etc.
		Lipossomas	Lipossomas	
		Nanosferas	Nanosferas	
		Nanocápsulas	Nanocápsulas magnéticas termossensíveis	
Mecanismo condicionante da distribuição	Embolização	Captura pelo sistema monocítico fagocitário	Intervenção extracorporal	Reconhecimento celular ou intracelular

1.2. OS LIPOSSOMAS COMO VECTORES DE FÁRMACOS

1.2.1. Vantagens e Potenciais Aplicações

O conceito de lipossoma e a sua caracterização surgiu pela primeira vez em 1965 por Bangham, Standish e Watkins (1965). Estes autores verificaram que as propriedades de difusão de catiões e aniões univalentes através das membranas das vesículas de lecitina (lipossomas), formadas espontaneamente por hidratação aquosa de um filme lipídico de lecitina, eram muito semelhantes às verificadas nas membranas biológicas. Desde então, os lipossomas têm sido utilizados como modelos de estudo das membranas biológicas (Bangham, Hill e Miller, 1974). Em 1976, Gregoriadis (1976 a e b) propôs a utilização dos lipossomas na vectorização de fármacos.

No âmbito da vectorização de fármacos, os lipossomas assumem, hoje em dia, uma posição de relevo face às vantagens decorrentes das características únicas destes sistemas, que os tornam veículos seguros e eficazes, e de que se salientam (Cruz, 1989; Barenholz e Crommelin, 1994; Crommelin, Herron e Storm, 1994):

- a biocompatibilidade, resultante, por um lado, da sua biodegradabilidade e toxicidade reduzida e, por outro lado, do facto de não determinarem o desenvolvimento de reacções imunogénicas;

- a grande versatilidade estrutural, devida à existência do núcleo interno aquoso e da bicamada fosfolipídica de carácter lipófilo, de que resulta a possibilidade de veicularem moléculas de diferentes características (hidrófilas, anfipáticas e hidrófobas);

- a existência do núcleo aquoso, que minimiza a possibilidade de ocorrerem alterações conformacionais dos fármacos a eles associados que pudessem levar a diminuição ou perda de actividade (este é um aspecto crítico na administração de proteínas);

- a possibilidade de manipulação das suas características físico-químicas e, conseqüentemente, do seu comportamento *in vitro* e *in vivo* ;

- e a possibilidade de fusão com células, que facilita a introdução intracelular de fármacos e de material genético.

Estas características tornam os lipossomas potenciais vectores numa vasta área de aplicação como seja na quimioterapia do cancro (Kim, 1993), na transferência de material genético como o DNA (Smith, Walzem e German, 1993), na terapia antimicrobiana, como adjuvantes imunológicos em vacinas, no diagnóstico por recurso à imagem (veiculando agentes de contraste), no tratamento de desordens oculares (Gregoriadis e Florence, 1993), no aumento da eficácia terapêutica no tratamento de doenças pulmonares (Taylor e Farr, 1993) e no tratamento de doenças da pele (Skalko, Cajkovac e Jalsenjak, 1992).

A versatilidade demonstrada por um tão vasto campo de aplicação, consequência da capacidade de transporte de uma tão grande variedade de substâncias, necessariamente com características físico-químicas diferentes, resulta precisamente da versatilidade da sua constituição e estrutura que a seguir se passam a descrever.

1.2.2. Constituintes Químicos Principais

Os grupos de moléculas utilizados com maior frequência na preparação de lipossomas com fins farmacêuticos são os lípidos polares e os esteróis (com especial relevo para o colesterol), os quais se caracterizam por possuir propriedades anfífilas (ou anfipáticas).

A parte hidrofílica dos lípidos polares (também designada por "cabeça" polar) consiste num grupo fosfato (por este motivo estas moléculas são designadas por fosfolípidos), enquanto que a parte hidrofóbica é formada por duas longas cadeias hidrocarbonadas (também denominadas por "caudas" apolares). Os grupos polares constituintes destes tipo de lípidos podem ser carregados positiva ou negativamente, podem

ter características isoeléctricas ou ainda serem desprovidos de qualquer carga. Os grupos apolares são constituídos por uma ou duas cadeias de ácidos gordos, com um comprimento variável entre 8 e 24 átomos de carbono, sendo o mais frequente entre 14 e 18 átomos de carbono, podendo ser completamente saturadas ou insaturadas com uma a quatro ligações duplas (Lasic, 1993 a).

Dos lípidos polares com maior interesse na preparação de lipossomas com vista ao uso com objectivos terapêuticos destacam-se os glicerofosfolípidos, os lisolípidos, os esfingolípidos e os lípidos semi-sintéticos.

Os glicerofosfolípidos são os principais componentes das formulações de lipossomas e representam mais de 50% do peso em lípido existente nas membranas biológicas (Weiner, Martin e Riaz, 1989). Dentro deste grupo de moléculas, a fosfatidilcolina é aquela utilizada com maior frequência na formulação de lipossomas devido ao seu baixo custo e à sua inércia química (New, 1990 a). Saliente-se também a utilização da fosfatidiletanolamina, por exemplo, para acoplar polímeros (como o polioxietilenoglicol) à superfície dos lipossomas, e ainda a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol e o ácido fosfatídico que conferem carga negativa à bicamada dos lipossomas (Dousset e Douste-Blazy, 1985; Lasic, 1993 a).

No que diz respeito aos lisolípidos, refira-se a utilização da lisofosfatidilcolina que aumenta a capacidade fusogénica dos lipossomas com as células (Dousset e Douste-Blazy, 1985).

O composto mais importante do grupo dos esfingolípidos é a esfingomiéline a qual é utilizada para aumentar a estabilidade *in vivo* dos lipossomas (Dousset e Douste-Blazy, 1985).

Os lípidos semi-sintéticos possuem grupos polares semelhantes aos referidos para os grupos de lípidos anteriormente descritos, distinguindo-se destes pelo facto de terem uma composição em cadeias hidrocarbonadas bem definida. Este facto leva a que algumas das suas propriedades físicas, nomeadamente, a temperatura de transição de fase, sejam melhor definidas e sujeitas a uma menor variabilidade em função da origem, relativamente ao que acontece com os lípidos de origem natural (Lasic, 1993 a). Refira-se como exemplo deste

tipo de lípidos a distearoilfosfatidilcolina e a dipalmitoilfosfatidilcolina, os quais são bastante utilizados no fabrico de lipossomas termosensíveis mencionados na secção 1.1.3.2.2..

Ao contrário dos lípidos anteriormente referidos, os esteróis são moléculas insaponificáveis, ou seja, na presença de uma substância alcalina não se hidrolisam nem se degradam nos sabões dos seus ácidos gordos, lisocompostos e álcoois (Lasic, 1993 a). O esterol mais comum na formulação de lipossomas com fins farmacêuticos é o colesterol (Weiner, Martin e Riaz, 1989).

O colesterol por si só não forma estruturas em bicamada, podendo, todavia, ser incorporado na membrana dos lipossomas até uma concentração máxima de 50 mol%, dado que valores superiores de colesterol desestabilizam a membrana. O colesterol, quando incorporado na membrana na fase líquida-cristalina, dispõe-se nos espaços vazios entre as moléculas de lípidos constituintes, interagindo com as cadeias hidrocarbonadas (que nesta fase possuem alguma mobilidade), aumentando desta forma o grau de ordem da membrana. Este aumento determina, conseqüentemente, a diminuição da fluidez e da permeabilidade da membrana, bem como o aumento da sua estabilidade na presença de fluidos biológicos, como por exemplo, o plasma. De referir, no entanto, que para temperaturas inferiores à temperatura de transição dos lípidos constituintes da membrana lipossomal, a incorporação de colesterol determina efeitos opostos aos referidos (Weiner, Martin e Riaz, 1989; New, 1990 a; Lasic, 1993 a).

1.2.3. Estrutura Física dos Lipossomas

Dadas as propriedades anfifílicas das moléculas constituintes dos lipossomas, na presença de um excesso de água, uma das estruturas mais simples que se pode formar a partir de alguns dos lípidos referidos anteriormente é uma bicamada, em que os grupos polares se encontram orientados para a superfície da estrutura, em contacto directo com a fase aquosa, enquanto que as cadeias hidrofóbicas se encontram orientadas para o interior da bicamada de forma a excluir o seu contacto com a fase aquosa. Nestas condições, a forma

mais estável (termodinamicamente mais favorável) é aquela que corresponde à formação de estruturas esféricas incluindo um núcleo aquoso delimitado por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas. O seu tamanho é bastante diverso, podendo variar desde 25 nm a um tamanho superior a 1000 nm. Estas estruturas esféricas são designadas por lipossomas. Caso as estruturas possuam apenas uma bicamada fosfolipídica designam-se por lipossomas unilamelares. Caso exista mais de uma bicamada fosfolipídica, as estruturas formadas tomam o nome de lipossomas multilamelares, sendo o espaço entre cada bicamada preenchido por fase aquosa (Lasic, 1992).

Em face desta estrutura, as moléculas com características hidrófilas encapsuladas nos lipossomas distribuem-se ao nível do núcleo aquoso ou na fase aquosa intercalada entre as bicamadas fosfolipídicas (no caso de se tratar de um lipossoma multilamelar), as moléculas anfifílicas na fronteira entre a fase aquosa e o interior da membrana, enquanto que as moléculas hidrófobas se distribuem ao nível dos componentes hidrófobos da bicamada fosfolipídica (figura 3). Uma vez que o processo de incorporação destas substâncias é físico, não se colocam restrições em relação à natureza química daquelas (New, 1990 a). Como referido, a possibilidade de veicular moléculas com propriedades tão diversas constitui uma das características que tornam os lipossomas sistemas de vectorização de fármacos tão versáteis.

No presente trabalho optou-se pela classificação dos lipossomas em função de parâmetros estruturais como o tamanho e o número de bicamadas (tabela II), atendendo a que, frequentemente, o cumprimento de determinados objectivos terapêuticos é condicionado pela utilização de lipossomas dentro de uma determinada gama de tamanhos. De referir que, uma vez que lipossomas de diferentes tamanhos requerem normalmente diferentes métodos de preparação, é igualmente frequente encontrar-se a classificação com base no método de preparação de lipossomas (New, 1990 a).

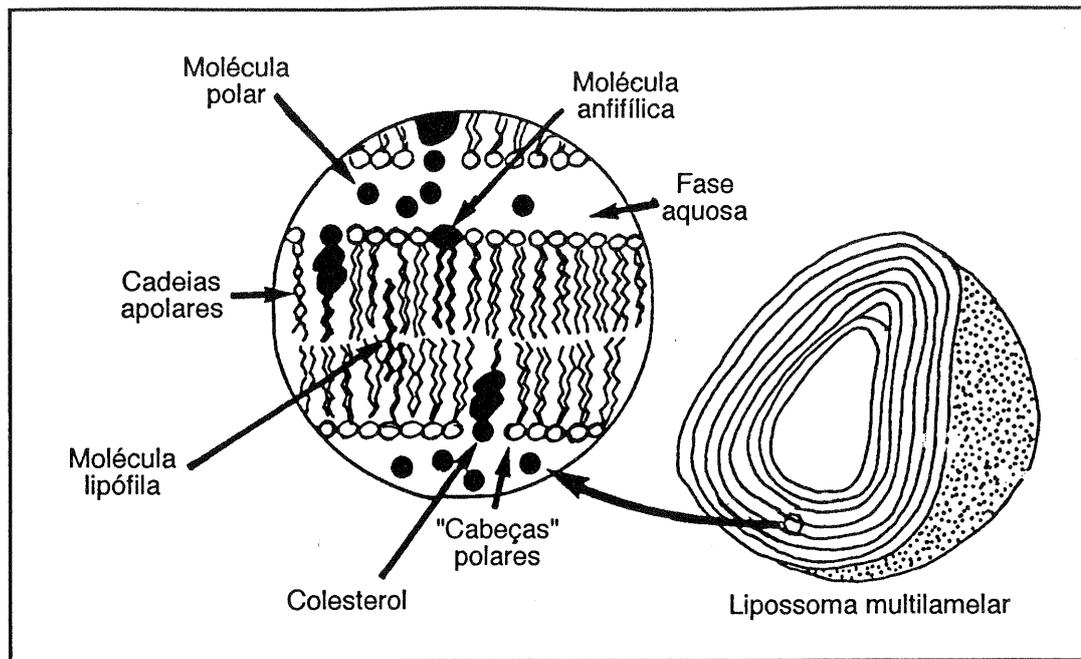


Figura 3: Representação esquemática de um lipossoma multilamelar, de uma bicamada fosfolipídica, e de possíveis localizações das moléculas susceptíveis de serem incorporadas num lipossoma. A bicamada de um lipossoma é formada por fosfolípidos, os quais são constituídos por uma parte hidrofílica, que está em contacto directo com a fase aquosa, e uma parte hidrófoba, que se encontra orientada para o interior da bicamada de forma a excluir o contacto com a fase aquosa. As moléculas hidrófilas encapsuladas nos lipossomas distribuem-se no núcleo aquoso ou na fase aquosa intercalada entre as bicamadas fosfolipídicas (no caso de se tratar de um lipossoma multilamelar), as moléculas anfifílicas na fronteira entre a fase aquosa e o interior da membrana, enquanto que as moléculas hidrófobas se distribuem ao nível dos componentes hidrófobos da bicamada fosfolipídica (adaptado de Puisieux e Benita, 1984).

As vesículas (termo utilizado como sinónimo de lipossomas) ditas grandes são diferenciadas das pequenas pelo facto de nas primeiras não se verificar qualquer efeito da curvatura da bicamada nas suas propriedades físicas, como por exemplo, na temperatura de transição de fase do estado gele para o estado líquido-cristalino e na distribuição dos fosfolípidos entre os dois folhetos da bicamada. Considera-se como sendo de 100 nm o valor de tamanho que separa estes dois tipos de vesículas. Assim, vesículas com um tamanho superior a 100 nm são consideradas grandes, enquanto que vesículas com um tamanho inferior são consideradas pequenas (Barenholz e Crommelin, 1994).

Tabela II: Classificação dos lipossomas com base em parâmetros estruturais (tamanho e número de bicamadas) (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994; e de New, 1990 a).

Tipo de lipossoma	Parâmetros estruturais característicos
Lipossomas unilamelares pequenos	Tamanho compreendido entre 20 e 100 nm e constituídos por uma bicamada fosfolipídica concêntrica
Lipossomas unilamelares grandes	Tamanho superior a 100 nm e constituídos por uma bicamada fosfolipídica concêntrica
Lipossomas oligolamelares	Tamanho compreendido entre 100 e 1000 nm e com um número de bicamadas fosfolipídicas concêntricas inferior a cinco
Lipossomas multilamelares grandes	Tamanho superior a 100 nm e constituídos por cinco ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas
Lipossomas multivesiculares	Normalmente com um tamanho superior a 1000 nm e contendo um determinado número de pequenas vesículas

Na figura 4 apresenta-se a representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas referidos.

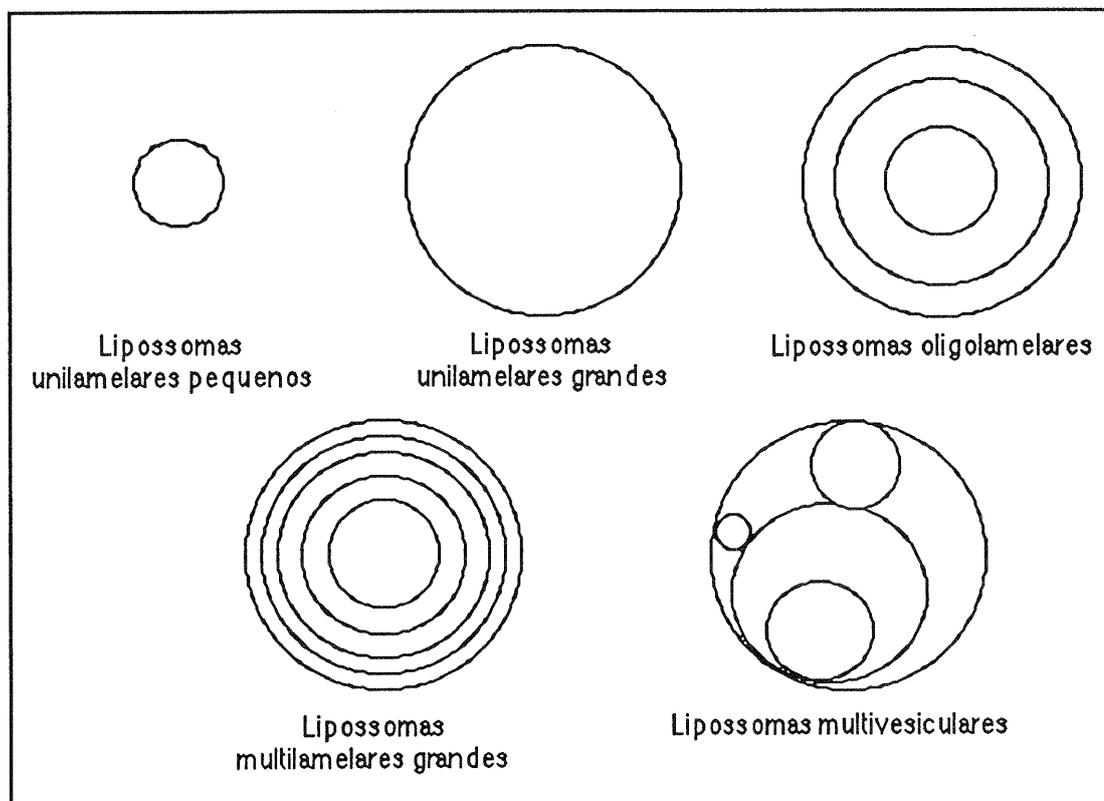


Figura 4: Representação esquemática das diferentes estruturas lipossomais.

As linhas concêntricas representam bicamadas fosfolipídicas. De referir que as representações não estão desenhadas à escala (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994).

Feita a abordagem dos principais constituintes químicos e da estrutura dos lipossomas, passa-se, em seguida, à descrição da metodologia de obtenção de lipossomas, tendo sempre em mente a sua utilização com objectivos terapêuticos.

1.2.4. Metodologia de Preparação de Lipossomas

A metodologia de preparação de lipossomas como veículos de fármacos inclui três etapas principais, de que se salientam a preparação dos lipossomas, a sua purificação e caracterização (New, 1990 b).

1.2.4.1. Preparação de Lipossomas

Actualmente, encontra-se ao dispor dos investigadores uma grande variedade de técnicas de preparação de lipossomas (New, 1990 b; Gregoriadis, 1993; Lasic, 1993 b), em que o critério de escolha depende do fim a que se destinam os lipossomas.

Aos métodos de preparação de lipossomas é comum a secagem dos lípidos a partir de soluções em solventes orgânicos e a dispersão daqueles numa solução aquosa. Segundo New (1990 b) os métodos de preparação de lipossomas podem ser classificados de acordo com o modo de dispersão dos lípidos na fase aquosa, salientando-se a dispersão física, a dispersão de duas fases e a solubilização de detergentes.

Nos métodos de preparação por dispersão mecânica, os lípidos são secos a partir de um solvente orgânico num suporte sólido (normalmente as paredes do recipiente de preparação), após o que são dispersos em fase aquosa por agitação (por exemplo, agitação em vórtex, agitação manual, etc.). Após hidratação, dá-se a formação geralmente de lipossomas multilamelares. O conjunto de métodos de preparação incluídos nesta categoria são especialmente adequados para encapsulação de fármacos lipossolúveis.

No conjunto de métodos de preparação que recorrem à dispersão do solvente, os lípidos são primeiramente dissolvidos num solvente orgânico, ao qual é posteriormente

adicionado o composto a encapsular dissolvido numa solução aquosa. Os lípidos dispõem-se na interface entre as duas fases na forma de uma monocamada. Dentro deste grupo de métodos de preparação é possível distinguir três categorias: aqueles que envolvem a utilização de um solvente orgânico miscível com a fase aquosa; aqueles em que a fase orgânica é imiscível com a fase aquosa, encontrando-se esta última em largo excesso relativamente à primeira; e finalmente, aqueles em que a fase orgânica é imiscível e se encontra em largo excesso em relação à fase aquosa.

Na terceira classe de métodos de preparação de lipossomas, os fosfolípidos são solubilizados num meio aquoso por recurso à utilização de moléculas de detergente, dando origem à formação de micelas mistas. Segue-se a remoção do detergente (por exemplo por diálise) que leva a um cada vez maior enriquecimento das micelas em fosfolípidos o que determina, conseqüentemente, a formação espontânea de lipossomas unilamelares (New, 1990 b).

Neste trabalho prepararam-se lipossomas unilamelares grandes e lipossomas unilamelares pequenos. De acordo com a classificação anteriormente apresentada, e ainda segundo New (1990 b), os primeiros foram obtidos por combinação de um método de dispersão de duas fases (a evaporação em fase reversa), em que a fase orgânica era imiscível e existia em excesso relativamente à fase aquosa, com um método de dispersão física (a extrusão). Os lipossomas unilamelares pequenos foram obtidos apenas por recurso a um método de dispersão física, a sonicação de lipossomas multilamelares grandes, formados espontaneamente aquando da hidratação do filme lipídico com uma solução aquosa.

1.2.4.2. Purificação de Lipossomas

Uma vez preparados os lipossomas, segue-se a sua purificação que corresponde à separação do material não encapsulado e/ou à separação de uma dada população de lipossomas de uma outra existente no mesmo meio.

Na maior parte dos casos verifica-se que a encapsulação de fármacos em lipossomas não é completa, tornando-se essencial a remoção do material não encapsulado, uma vez que, ao fármaco livre pode estar associado um grande potencial tóxico, como acontece, por exemplo, com muitos antibióticos (caso dos aminoglicósidos), ou interferir com a estabilidade do lipossoma. A doxorubicina não encapsulada, por exemplo, é susceptível de induzir a agregação e depois a fusão de vesículas carregadas negativamente (Barenholz e Crommelin, 1994).

Acontece também frequentemente que, na sequência da preparação de um dado tipo de lipossomas, coexistam no mesmo meio várias populações de lipossomas, para além do material não encapsulado. É o que acontece, por exemplo, quando se preparam, por sonicação, lipossomas unilamelares pequenos a partir de lipossomas multilamelares grandes. Neste caso, se se pretender a utilização apenas de uma população, é necessário efectuar-se a sua purificação.

Como exemplo de técnicas de purificação de lipossomas refira-se a cromatografia de exclusão molecular e a ultracentrifugação, cuja utilização depende de factores como o volume de amostra a tratar.

1.2.4.3. Caracterização de Lipossomas

Após a purificação dos lipossomas, segue-se a sua caracterização. O uso potencial dos lipossomas como vectores de fármacos, determina que a caracterização de lipossomas constitua um passo fundamental em todo um protocolo que deve ser seguido com o intuito de alcançar os objectivos pretendidos e obter resultados tão reprodutíveis quanto possível.

De entre os vários parâmetros de caracterização destaque-se o tamanho, o volume e a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação. A caracterização de lipossomas será abordada em mais pormenor na secção 2.1.4..

Seguidamente apresentam-se alguns aspectos gerais relativos aos polissacarídeos potencialmente susceptíveis de revestirem a superfície dos lipossomas e ao princípio do revestimento.

1.3. OS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM POLISSACARÍDEOS NA VECTORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

1.3.1. Objectivos do Revestimento

As células vegetais e bacterianas, para além de serem constituídas por uma membrana celular, possuem igualmente uma parede celular, que é externa em relação à membrana, e que é essencialmente formada por polissacarídeos. Assim, por exemplo, a parede celular das bactérias gram-positivas é constituída principalmente por peptidoglicano, enquanto que a parede celular das células vegetais é normalmente formada por celulose. A parede celular tem pois por função manter a forma e a rigidez das células, bem como proteger a membrana celular contra alterações químicas e físicas, como por exemplo, alterações de pressão osmótica e de temperatura. Assim sendo, os polissacarídeos naturais poderão exercer um papel importante no melhoramento da estabilidade lipossomal, concretamente, por revestimento da superfície externa dos lipossomas.

Em termos de reconhecimento celular ou de especificidade de acção, o papel dos polissacarídeos naturais ainda não se encontra totalmente esclarecido. No entanto, atendendo ao facto de que alguns glicolípidos e glicoproteínas associadas à superfície celular desempenham um importante papel em vários processos de reconhecimento biológico, é pois possível que aos polissacarídeos naturais esteja associada alguma capacidade de reconhecimento celular (Sato, 1990; Sato e Sunamoto, 1992).

No âmbito da utilização dos lipossomas na vectorização de fármacos, é importante a escolha de uma estratégia que privilegie a estabilidade física e química do lipossoma, *in vitro* e *in vivo*, que garanta a inocuidade da preparação quando administrada de forma repetida

durante, por exemplo, vários meses, e que de acordo com o objectivo terapêutico proporcione uma especificidade do sistema para o local de acção. Nesta perspectiva, Sunamoto e seus colaboradores desenvolveram uma metodologia que pretendeu satisfazer aqueles requisitos e que consiste no revestimento dos lipossomas com polissacarídeos naturais biodegradáveis e não imunogénicos (Sunamoto e Iwamoto, 1986).

1.3.2. Tipos de Polissacarídeos

De entre os polissacarídeos naturais disponíveis, e dos mais intensamente estudados em termos das suas potencialidades no revestimento de lipossomas, destacam-se o pululano, a amilopectina e o manano. Na figura 5 apresenta-se a fórmula de estrutura do polímero utilizado neste trabalho, o pululano.

O pululano é um polissacarídeo linear produzido pelo fungo da levedura *Pullularia pullulans* constituído por cerca de 480 unidades de maltotriose ligadas por ligações glicosídicas α -1,6 (Bender e Wallenfels, 1966).

Por sua vez, a amilopectina é um dos constituintes do amido, sendo formada por unidades de glucose-D, ligadas entre si por ligações α -1,4. A sua estrutura é, no entanto, altamente ramificada sendo formada por centenas de pequenas cadeias, cada uma com 20-25 unidades de glucose-D. Uma das extremidades de cada uma destas cadeias liga-se com a cadeia seguinte por ligações α -1,6 (Morrison e Boyd, 1973).

O manano é um tipo de polissacarídeo que aparece na parede celular de muitas leveduras, sendo constituído por uma cadeia principal formada por unidades de manose ligadas por ligações α -1,6, à qual se ligam por ligações α -1,2 e α -1,3 pequenas cadeias de uma a três unidades de manose (Metzler, 1977).

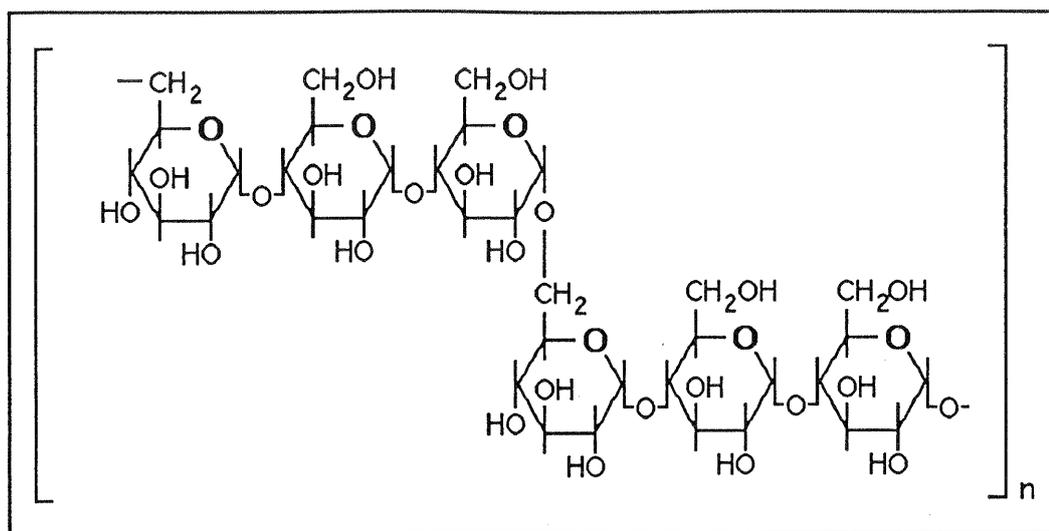


Figura 5: Fórmula de estrutura do pululano. O pululano é constituído por cerca de 480 unidades de maltotriose ligadas entre si por ligações α -1,6 (adaptado de Akiyoshi *et al.*, 1993).

A aplicação destes polissacarídeos no revestimento dos lipossomas tem sido já objecto de diversos estudos.

Entre outros trabalhos realizados, Sato (1990) estudou a capacidade de reconhecimento celular dos lipossomas revestidos com polissacarídeos. Este estudo consistiu na determinação *in vitro* da eficiência endocítica por células fagocitárias do sistema monocítico fagocitário (monócitos sanguíneos humanos) dos lipossomas marcados radioactivamente e revestidos com polissacarídeos. Os resultados demonstraram que a eficiência endocítica é aumentada de forma significativa para os lipossomas revestidos com amilopectina e o manano, relativamente aos lipossomas não revestidos (ditos convencionais) e aos revestidos com o pululano. Foi considerado neste estudo que a endocitose dos lipossomas é mediado por um receptor.

A administração intravenosa dos lipossomas é seguida pela sua captura rápida pelas células do sistema monocítico fagocitário, por exemplo os macrófagos, as quais são células com capacidade fagocítica e que são susceptíveis de participar na destruição de elementos estranhos ao organismo, como sejam microrganismos e células tumorais (Sato, 1990). Esta captura constitui um obstáculo a ultrapassar quando se pretende, por exemplo, o tratamento de um tumor, todavia, poderá ser bastante vantajosa quando se trate da administração de substâncias que visem aquelas células, como sejam, os imunomoduladores (exemplo:

polímeros polianiónicos). Os imunomoduladores são substâncias que activam os macrófagos na sua função de protecção do organismo, por estimulação da produção de metabolitos de oxigénio, como por exemplo, o anião superóxido. De referir que os imunomoduladores, por si só, não têm nenhuma afinidade específica para os macrófagos, mesmo quando administrados por via intravenosa. Neste contexto, um dos trabalhos realizados por Sato consistiu no estudo da activação de macrófagos peritoneais de rato (quantificada pela produção de anião superóxido) por polímeros polianiónicos encapsulados em lipossomas revestidos com um polissacarídeo específico para os macrófagos, o manano. Verificou-se, por um lado, que a activação dos macrófagos pelos polímeros polianiónicos encapsulados em lipossomas, revestidos ou não, era mais rápida do que no caso da administração dos polímeros polianiónicos não encapsulados em lipossomas e, por outro lado, o aumento de produção de anião superóxido induzido pelos polímeros aniónicos encapsulados nos lipossomas revestidos com o manano era 3.2 vezes superior relativamente ao aumento induzido pelos polímeros aniónicos encapsulados em lipossomas não revestidos. Estes dados revelam que o acesso dos polímeros polianiónicos aos macrófagos é mais rápido quando encapsulados em lipossomas revestidos com manano do que quando administrados na forma livre ou encapsulados em lipossomas não revestidos (Sato *et al.*, 1986; Sato 1990).

Ainda no âmbito da vectorização de fármacos para macrófagos, foi possível observar que a administração de 36% de sisomicina encapsulada em lipossomas revestidos com a amilopectina (a par da administração de 64% de antibiótico livre) a cobaias com a doença do legionário, permitiu a sobrevivência de 100% das cobaias submetidas ao tratamento, enquanto que as cobaias submetidas à administração do antibiótico não encapsulado em lipossomas morreram ao fim de 6 dias, após o início do tratamento (Sunamoto e Iwamoto, 1986).

Ao contrário dos exemplos anteriores em que a especificidade de acção é mediada por um receptor específico do tipo sacarídico existente à superfície das células, é possível, no caso de algumas células cancerígenas, que a especificidade seja mediada por um antigénio existente na superfície daquelas. Neste caso, a estratégia de vectorização envolve o revestimento da superfície do lipossoma com um polissacarídeo (o pululano) ao qual é

acoplado covalentemente um anticorpo monoclonal (este tipo de lipossomas são normalmente designados por imunolipossomas). Dos polissacarídeos referidos o pululano apresenta-se como o mais adequado, uma vez que apresenta uma eficiência de revestimento da superfície do lipossoma que é superior à dos restantes polissacarídeos, bem como uma capacidade de especificidade de acção bastante reduzida (quando comparada, por exemplo, com o manano), não interferindo assim com a capacidade de ligação específica do anticorpo monoclonal com que se encontra associado (Sato, 1990). Desta forma consegue-se ultrapassar um dos principais problemas associados aos lipossomas convencionais aos quais se encontram associados anticorpos monoclonais e que se relacionam com a instabilidade mecânica e/ou bioquímica do sistema após administração *in vivo* (Sato e Sunamoto, 1992). Num dos trabalhos realizados por Sato (1990), a administração de adriamicina encapsulada em imunolipossomas (revestidos com o pululano e munidos de um anticorpo monoclonal específico) revelou uma eficiência de tratamento bastante superior, em termos de inibição do crescimento de células tumorais do pulmão implantadas por via subcutânea em ratos, à verificada com a administração da adriamicina livre ou encapsulada em lipossomas revestidos com o pululano mas desprovidos do anticorpo monoclonal específico.

Uma vez que no presente trabalho se visou a vectorização de um fármaco citostático e se adoptou a estratégia de revestir a superfície dos lipossomas com um polissacarídeo natural, a escolha recaiu no pululano, de acordo com o referido no parágrafo anterior. Este polímero permite o posterior acoplamento de um anticorpo monoclonal e, desta forma, aumentar a especificidade de acção do sistema coloidal.

1.3.3. Modificação Química do Pululano

Os polissacarídeos naturais referidos são susceptíveis de serem adsorvidos à superfície dos lipossomas, no entanto são facilmente removidos por diluição. Assim sendo, torna-se necessário realizar uma modificação química do polímero que consiste na introdução

de um grupo hidrofóbico, o qual é o responsável pela ligação não covalente do polissacarídeo à membrana lipossomal.

Esta modificação química foi já realizada por Sato (1990), tendo consistido, no caso do pululano, na reacção deste com o cloreto de palmitoilo (haleto de ácido contendo 16 átomos de carbono, $C_{16}H_{31}OCl$), em presença de piridina, com formação do O-palmitoilpululano (figura 6).

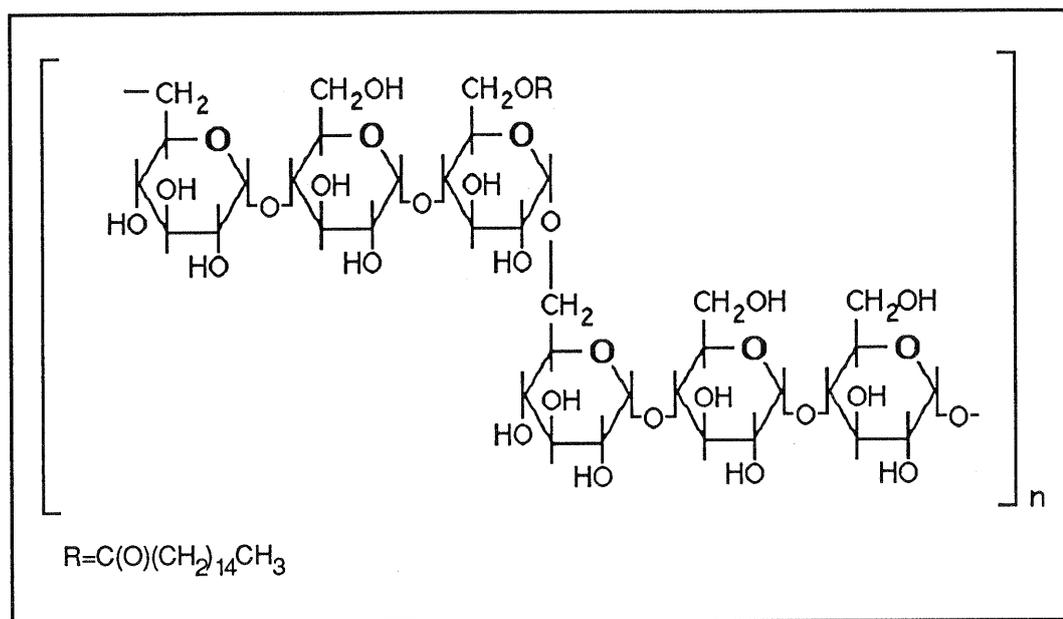


Figura 6: Fórmula de estrutura do O-palmitoilpululano. O grupo palmitoilo, formado por 16 átomos de carbono, liga-se através de uma ligação éster ao pululano, polissacarídeo formado unidades de maltotriose ligadas por ligações α -1,6 (adaptado de Akiyoshi *et al.*, 1993).

Segundo Kirk, Hartshorn e Phil (1968), a formação do O-palmitoilpululano poderá ocorrer através de duas vias reaccionais diferentes.

Um dos mecanismos poderá envolver a formação de um complexo entre a piridina e o cloreto de palmitoilo, seguido pelo ataque nucleofílico do oxigénio do hidroxilo do pululano ao carbono do grupo carbonilo do complexo formado anteriormente (figura 7).

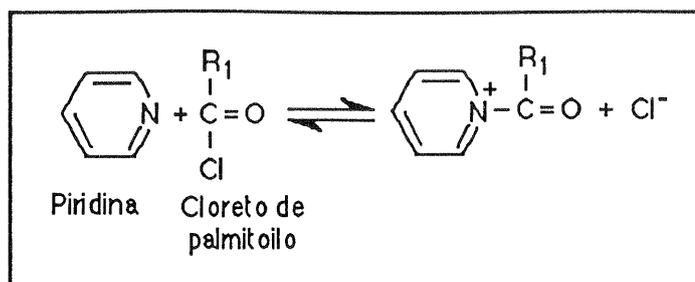


Figura 7: Passo intermédio, envolvendo a formação de um complexo entre a piridina e o cloreto de palmitoilo, de um possível mecanismo para a formação do O-palmitoilpululano. O mecanismo de reacção de formação do O-palmitoilpululano poderá envolver, primeiramente, a formação de um complexo entre a piridina e o cloreto de palmitoilo, seguido do ataque nucleofílico do oxigénio do hidroxilo do pululano ao carbono do grupo carbonilo do complexo formado anteriormente (adaptado de Kirk, Hartshorn e Phil, 1968).

A outra hipótese de mecanismo, consiste na formação de um estado de transição termolecular no qual a remoção do protão hidroxílico do pululano pela piridina e o ataque nucleofílico do oxigénio do grupo hidroxilo ao carbono do grupo carbonilo do cloreto de palmitoilo ocorrem simultaneamente (figura 8).

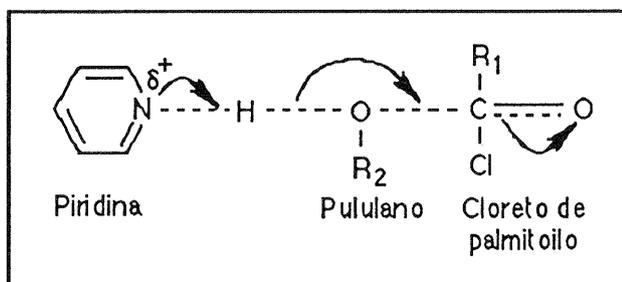


Figura 8: Outro possível mecanismo de formação do O-palmitoilpululano, este via formação de um estado de transição termolecular entre a piridina, o cloreto de palmitoilo e o pululano. Este mecanismo envolve a remoção do protão do grupo hidroxilo do pululano pela piridina e o ataque nucleofílico simultâneo do oxigénio do grupo hidroxilo ao carbono do grupo carbonilo do cloreto de palmitoilo (adaptado de Kirk, Hartshorn e Phil, 1968).

O revestimento dos lipossomas pelo O-palmitoilpululano baseia-se precisamente no facto deste polímero ficar adsorvido à superfície do lipossoma por intermédio do seu grupo hidrofóbico (o grupo palmitoilo), o que determina, conseqüentemente, que as unidades de

glucose vizinhas sejam preferencialmente adsorvidas à superfície dos lipossomas comparativamente com outras unidades de glucose do polímero (figura 9) (Kobayashi, Sumitomo e Ichikawa, 1986).

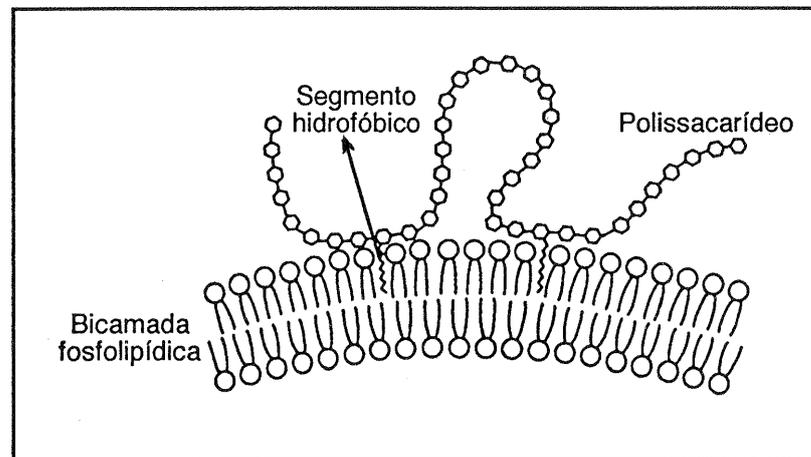


Figura 9: Modelo conformacional proposto para a adsorção de polissacarídeos à superfície dos lipossomas. O polissacarídeo é adsorvido à superfície do lipossoma de acordo com o esquema da figura, através do grupo hidrofóbico introduzido (adaptado de Kobayashi, Sumitomo e Ichikawa, 1986).

1.4. VECTORIZAÇÃO DE CARBOPLATINA EM LIPOSSOMAS

Uma vez abordados alguns aspectos relacionados com o revestimento da superfície de lipossomas com o O-palmitoilpululano, passam-se a referir algumas características da carboplatina, nomeadamente, no que diz respeito aos seus efeitos secundários, que justifiquem a utilização terapêutica de lipossomas de carboplatina.

A carboplatina é um composto de platina estruturalmente relacionado com o cisplatínio (ambos compostos de coordenação do ião Pt (II)) que, ao contrário deste, possui um ligando dicarboxilado bidentado em vez dos dois átomos de cloro (figura 10) (Wagstaff *et al.*, 1989; Arnaud, 1990).

Como análogo estrutural do cisplatínio (figura 10), a carboplatina apresenta um espectro de acção semelhante, de que se destaca o tratamento do cancro dos órgãos genitais

(ovário e testículos), carcinoma das células escamosas da cabeça e do pescoço e o cancro das células pequenas do pulmão, no entanto, é desprovido dos efeitos tóxicos associados ao cisplatínio como sejam a nefrotoxicidade, a ototoxicidade, a neuropatia periférica e a toxicidade gastro-intestinal (Koch, 1986; Wagstaff *et al.*, 1989). O efeito secundário mais importante associado à carboplatina (e que limita a dose administrada) é a mielossupressão, com trombocitopenia severa e menos frequentemente leucopenia e anemia, que pode ser grave em pacientes idosos, em insuficientes renais ou em pacientes que já tenham sido submetidos a quimioterapia. Hoje em dia pouco se sabe acerca do efeito da administração repetida de carboplatina sobre a mielossupressão, embora tudo indique que a trombocitopenia e a leucopenia possam ser cumulativas. Um outro efeito secundário bastante comum é a alopecia, sobretudo quando a terapia é continuada por mais de três ciclos e quando combinada com outros citostáticos. Com alguma frequência é também associada à administração de carboplatina a toxicidade gastro-intestinal, bem como náuseas e vômitos, no entanto, estes efeitos são menos severos comparativamente com o que acontece com o cisplatínio, ocorrem 6 a 12 horas após a administração do fármaco e raramente continuam por mais de 24 horas (Wagstaff *et al.*, 1989).

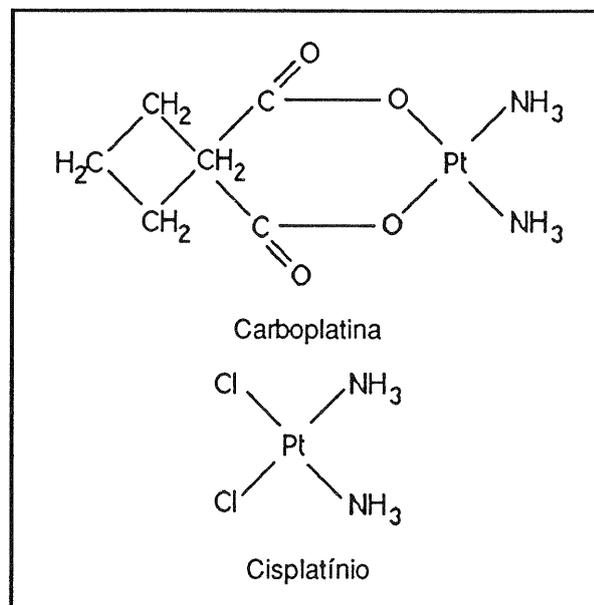


Figura 10: Fórmulas de estrutura da carboplatina e do cisplatínio. A carboplatina e o cisplatínio são compostos de coordenação do íon Pt (II), diferindo entre si pelo facto do primeiro possuir um ligando dicarboxilado e o segundo dois átomos de cloro (adaptado de Wagstaff, 1989).

A actividade antitumoral inerente à carboplatina, bem como à generalidade dos complexos do tipo PtX_2A_2 (em que X corresponde a dois ligandos monodentados ou a um ligando aniónico bidentado, e A corresponde aos dois ligandos amina), está associada ao seu isómero *cis*, dado que as moléculas *trans* correspondentes são inertes em termos de actividade antitumoral, embora, paradoxalmente, retenham a toxicidade geral dos isómeros *cis* (Koch, 1986).

A actividade terapêutica da carboplatina resulta da sua activação intracelular, em que um ou os dois ligandos de ciclobutano dicarboxilados são substituídos por moléculas de água, após o que reagem com os locais nucleofílicos do DNA, interpondo-se entre as suas cadeias complementares (Koch, 1986; Wagstaff *et al.*, 1989; Allsopp *et al.*, 1991; Kim, 1993).

A carboplatina é um fármaco normalmente administrado por via intravenosa e cujas concentrações plasmáticas aumentam proporcionalmente com a dose. Após distribuição, as concentrações mais elevadas observam-se ao nível do fígado, rins, pele e tumores. Verifica-se também que as concentrações de carboplatina são superiores nos tumores dos pulmões e do fígado, relativamente às concentrações nos órgãos dos tecidos circundantes. A extensão de ligação às proteínas plasmáticas é relativamente reduzida (em comparação, por exemplo, com o cisplatínio), pelo menos nas horas que se seguem à administração (cerca de 4 horas), todavia tende a aumentar com o tempo. Grande parte da fracção de carboplatina ligada às proteínas plasmáticas perde a sua capacidade antitumoral. A principal via de eliminação da carboplatina é a via renal, verificando-se que cerca de 50 a 75% da carboplatina administrada é eliminada na urina nas primeiras 24 horas (Wagstaff *et al.*, 1989).

Com o objectivo de prevenir a mielossupressão induzida pela carboplatina, um dos processos actualmente em estudo consiste na administração prévia (1 a 2 dias antes) de ciclofosfamida. Com o intuito de diminuir a leucopenia e a anemia devidas à utilização de carboplatina, está também actualmente em fase de estudo o efeito da administração concomitante de dietilditiocarbamato, o qual à partida não influencia a actividade antitumoral da carboplatina (Wagstaff *et al.*, 1989).

Estas estratégias utilizadas no âmbito da clínica têm pois como objectivo a prevenção ou a diminuição dos efeitos secundários mais importantes associados à administração de carboplatina. Contudo, envolvem a administração de substâncias químicas às quais o organismo poderá ser sensível e que poderão, elas próprias, induzir algum tipo de efeito indesejável.

Neste contexto, a encapsulação de carboplatina em lipossomas revestidos constitui uma estratégia alternativa bastante válida, na medida em que, além de prevenir ou diminuir alguns dos efeitos secundários associados, tem a capacidade potencial de proporcionar a especificidade de acção do fármaco, com a consequente redução das doses administradas e aumento da eficácia terapêutica.

No que diz respeito aos estudos realizados até ao momento, Fichtner *et al.* (1993) referem o papel desempenhado pelos lipossomas de carboplatina (constituídos por fosfatidilcolina de ovo e colesterol) na estimulação da hematopoiese, após administração intraperitoneal em ratos. Com base neste facto, estes autores referem a possibilidade, por tratamento combinado, de prevenção da leucopenia em consequência da administração de certos citostáticos, como por exemplo a ciclofosfamida.

Há registo de um outro estudo em que a administração intraperitoneal em ratos, aos quais foram inoculados hepatomas tipo ascítico de yoshida (AH 130), de lipossomas contendo carboplatina (e constituídos por fosfatidilcolina de ovo e colesterol), prolongou a esperança de vida dos animais e evitou o aparecimento de efeitos secundários associados à administração daquele fármaco, de acordo com o verificado com estudos bioquímicos e histológicos do fígado, rim e baço (Yasui *et al.*, 1992).

Estes estudos são reveladores das potencialidades terapêuticas deste sistema e bastante motivadores para a realização deste trabalho, no sentido em que a introdução do revestimento com um polissacarídeo poderá aumentar a estabilidade e a especificidade de acção dos lipossomas de carboplatina.

1.5. OBJECTIVOS E BREVE DESCRIÇÃO DO TRABALHO

Com este trabalho pretendeu-se, numa primeira fase, avaliar a influência do revestimento com o O-palmitoilpululano na permeabilidade e fluidez membranar de lipossomas unilamelares grandes.

Uma vez atingido aquele objectivo preliminar pretendia-se enveredar por um projecto que visasse a encapsulação de carboplatina nesses lipossomas revestidos, fazendo fundamentalmente a avaliação da estabilidade destes, do efeito da carboplatina na fluidez membranar, bem como de alguns parâmetros de encapsulação do fármaco.

Numa primeira fase, procedeu-se à síntese do O-palmitoilpululano e à sua caracterização por espectroscopia de infravermelho, com o objectivo de confirmar a formação do O-palmitoilpululano através da identificação da formação da ligação éster, e por ressonância magnética nuclear protónica (RMN- ^1H), com o intuito de determinar o grau de substituição de grupos palmitoilo por 100 unidades de glucose.

Seguidamente avaliaram-se as diferenças de estabilidade, em termos de permeabilidade membranar, entre lipossomas unilamelares pequenos e lipossomas unilamelares grandes, por recurso a um método fluorimétrico com utilização de 5 (6)-carboxifluoresceína (CF).

Atendendo às suas características de hidrossolubilidade, a CF foi utilizada como substância modelo da carboplatina, fármaco também hidrossolúvel, nos estudos preliminares de permeabilidade.

A utilização dos lipossomas unilamelares pequenos, prendeu-se com o facto de Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) terem utilizado este tipo de lipossomas no estudo do efeito do O-palmitoilpululano na permeabilidade da membrana lipossomal. A utilização de lipossomas unilamelares grandes preconiza-se à partida neste trabalho, devido ao facto do fármaco que se pretende encapsular (a carboplatina) ser hidrossolúvel. Neste tipo de

lipossomas a fracção de volume aquoso encapsulada é superior à fracção de volume aquoso encapsulada, por exemplo, em lipossomas unilamelares pequenos, para a mesma concentração de lípido (Lasic, 1993 b), para além de que, proporcionam velocidades de libertação dos compostos encapsulados reprodutíveis (Weiner, Martin e Riaz, 1989). A preparação deste tipo de lipossomas pela combinação dos métodos de evaporação em fase reversa e extrusão é de fácil execução e proporciona a obtenção de uma população homogénea de vesículas unilamelares grandes, o que garante uma maior reprodutibilidade das suas propriedades (Szoka *et al.*, 1980).

Desde logo, e em consequência dos resultados obtidos, avaliou-se também o efeito do revestimento com o O-palmitoilpululano sintetizado na permeabilidade membranar de lipossomas unilamelares grandes (na razão ponderal O-palmitoilpululano/fosfatidilcolina de ovo - OPP/PC - igual a 3, correspondente ao valor que, nas condições experimentais utilizadas por aqueles autores, induzia uma menor permeabilidade membranar).

No seguimento deste estudo, e ainda por recurso à CF, avaliou-se o efeito de diferentes razões ponderais OPP/PC (de 0 a 4) na permeabilidade membranar de lipossomas unilamelares grandes, com o objectivo de determinar qual o valor da razão ponderal OPP/PC que induzia uma menor permeabilidade da membrana lipossomal. O valor determinado neste ensaio foi depois utilizado nos estudos de estabilidade realizados com lipossomas revestidos contendo carboplatina.

Na sequência dos resultados do estudo anterior, e como complemento dos estudos de permeabilidade realizados com o polímero, avaliou-se o seu efeito na biofísica da membrana lipossomal em termos de fluidez membranar por determinação dos valores de polarização de fluorescência das moléculas fluorescentes (sondas), 1,6-difenilhexa-1,3,5-trieno (DPH) e ácido 3-[p-(6-fenil)-1,3,5-hexatrienil]fenilpropiónico (DPH-PA), previamente incorporadas.

No que se refere aos estudos realizados com o fármaco, primeiramente foram estudadas as potenciais alterações na organização dos lípidos da membrana lipossomal induzidas pela carboplatina encapsulada nos lipossomas e traduzidas pela determinação dos valores de polarização de fluorescência das sondas já referidas.

Este estudo foi complementado com outros visando a análise da influência do teor em NaCl do meio de hidratação no diâmetro médio dos lipossomas não revestidos e em alguns parâmetros de encapsulação da carboplatina, designadamente, a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação aos lipossomas igualmente não revestidos.

Avaliou-se também a estabilidade dos lipossomas de carboplatina em função da concentração em NaCl do meio de hidratação, bem como a estabilidade dos lipossomas de carboplatina revestidos com diferentes razões OPP/PC (3 e 7.5).

CAPÍTULO 2

**MATERIAL
E
MÉTODOS**

2.1. METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

2.1.1. Preparação de Lipossomas

2.1.1.1. Preparação de Lipossomas Unilamelares Grandes

A preparação de lipossomas unilamelares grandes por combinação dos métodos de evaporação em fase reversa e extrusão foi realizada de acordo com o descrito por Szoka *et al.* (1980).

O processo de preparação de lipossomas por evaporação em fase reversa foi originalmente estabelecido por Szoka e Papahadjopoulos (1978). Este método consiste na mistura, em atmosfera de azoto, de fosfolípidos dissolvidos num solvente orgânico (figura 11, painel 1) com uma solução aquosa (figura 11, painel 2). Forma-se um sistema de duas fases, o qual é submetido a períodos de sonicação, que podem perfazer um total de 2 a 5 min, até à obtenção de uma dispersão límpida monofásica ou de uma dispersão homogénea opalescente que não se separe durante, pelo menos, os primeiros 30 min após a sonicação. Este período de sonicação determina a formação de pequenas gotas de água estabilizadas por uma monocamada fosfolipídica (também designadas por micelas invertidas) (figura 11, painel 3) que colapsam num gele viscoso, quando a fase orgânica é removida por evaporação sob pressão reduzida (figura 11, painel 4). Este gele é submetido a uma agitação mecânica vigorosa que leva à desagregação de uma certa fracção de micelas invertidas e à consequente libertação do material encapsulado (figura 11, painel 5). O excesso de lípido contribui para a formação de uma bicamada completa à volta das micelas remanescentes, resultando a formação de vesículas unilamelares grandes (figura 11, painel 6).

Os lipossomas unilamelares grandes obtidos segundo a metodologia anterior são submetidos a um processo de extrusão através de membranas de policarbonato o qual determina a formação de uma população homogénea de vesículas unilamelares. Segundo Olson *et al.* (1979), as vesículas neste processo deformam-se até certa extensão, ocorrendo a sua ruptura a partir de um certo valor de pressão. Formam-se assim lipossomas mais

pequenos, por rearranjo das vesículas anteriormente desagregadas, os quais são susceptíveis de atravessar os poros da membrana.

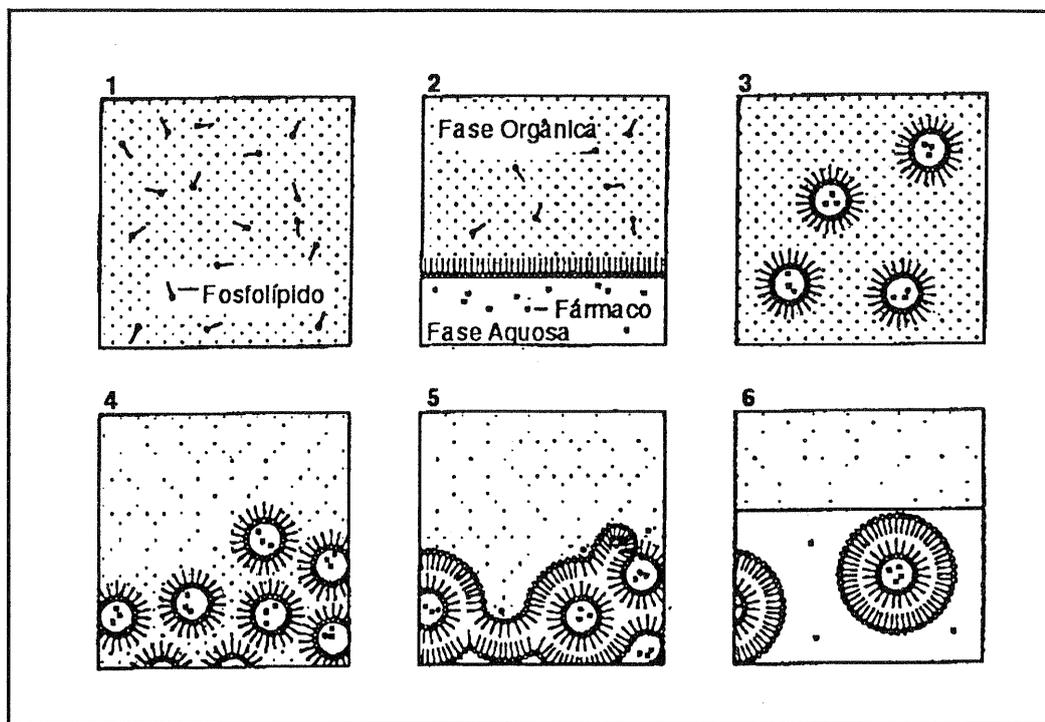


Figura 11: Diagrama de formação de lipossomas por evaporação em fase reversa. O lípido dissolvido em solvente orgânico (painel 1) é adicionado a uma solução aquosa contendo a substância a encapsular (painel 2). Forma-se um sistema de duas fases que é submetido a períodos de sonicação, que podem perfazer um total de 2 a 5 min, levando à formação de pequenas gotas de água estabilizadas por uma monocamada fosfolipídica (micelas invertidas) (painel 3). A evaporação sob pressão reduzida do solvente orgânico determina a formação de um gele viscoso a partir das micelas invertidas (painel 4). Mediante agitação mecânica vigorosa do gele, ocorre desagregação de algumas micelas invertidas libertando-se o material não encapsulado (painel 5). O excesso de lípido contribui para a formação de uma bicamada completa à volta das micelas remanescentes, resultando a formação de vesículas unilamelares grandes (painel 6). As estruturas em cauda representam os lípidos dissolvidos no solvente orgânico apropriado; os pontos a negro representam o fármaco a ser encapsulado e que se encontra dissolvido na fase aquosa (adaptado de Szoka e Papahadjopoulos, 1978).

Em cada preparação de lipossomas foram utilizados 30 mg (3.9×10^{-2} mmol) de L- α fosfatidilcolina de ovo em solução de clorofórmio (Sigma Chemical Co.), os quais, após evaporação do solvente, sob pressão reduzida, a cerca de 5 mm de Hg, em atmosfera de gás inerte, à temperatura ambiente e em evaporador rotativo (Heidolph VV 2000) com banho

termostatizado (Heidolph OB 2000), foram dissolvidos em 4 ml de éter dietílico (Merck, pró-análise - p.a.). O éter (fase orgânica) foi previamente lavado com água com o objectivo de eliminar eventuais produtos de peroxidação que se tenham formado. Seguidamente, procedeu-se à adição de 2 ml de uma solução aquosa da substância a encapsular (Sato, 1990).

Consoante o objectivo do estudo a realizar, a fase aquosa foi constituída por uma solução aquosa de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris) - HCl (Merck, p.a.) 20 mM e de NaCl (BDH) 200 mM, a pH 8.6 contendo CF 50 mM (Sigma Chemical Co.), ou soluções aquosas fisiológicas a pH entre 6 e 7 de NaCl a 0.9%, dextrose (Merck, p.a.) a 5% ou ainda por soluções de NaCl a 0.3 e 0.6% adicionadas de dextrose de forma a perfazer, respectivamente, as concentrações de 3.33% e 1.67% (e assim constituírem soluções isotónicas), contendo carboplatina 0.027 mM (Sigma Chemical Co.), por ser este o valor que corresponde à sua concentração terapêutica (Pharmachemie, 1990).

Depois da adição da fase aquosa, formou-se o já referido sistema de duas fases, que foi submetido à acção de ultra-sons (Heat Systems Ultrasonics, Inc.) sob atmosfera de azoto, durante 10 ciclos de 20 s alternados com períodos de 10 s sem sonicação e a uma temperatura de cerca de 5°C. O éter foi depois lentamente evaporado mediante pressão reduzida em evaporador rotativo (por recurso a uma trompa de água) a um valor de temperatura compreendido entre 20 e 25°C e a cerca de 200 rotações por minuto (r.p.m.). Durante esta fase manteve-se a pressão reduzida a cerca de 380 mm de Hg até à formação do gele. A destruição deste efectuou-se pela aplicação alternada de breves períodos de agitação em vórtex e de evaporação, procedimento que foi repetido até à obtenção de uma suspensão aquosa opalescente. A esta foram adicionados 2 ml da solução aquosa anteriormente utilizada, mas agora sem a substância a encapsular, tendo-se prolongado a evaporação, à pressão de cerca de 5 mm de Hg, de modo a eliminar o éter residual que pudesse existir. De salientar que, atendendo ao facto de se estar a trabalhar com um lípido insaturado, o restabelecimento da pressão do sistema de evaporação rotativo foi sempre realizado com azoto.

Os lipossomas unilamelares grandes obtidos foram submetidos a duas extrusões através de uma membrana de policarbonato (Nucleopore Polycarbonate Costar) com um diâmetro de poro de 0.4 μm , por aplicação de um fluxo de azoto com um valor de pressão compreendido entre 2 e 3 bar.

2.1.1.2. Preparação de Lipossomas Unilamelares Pequenos

Os lipossomas unilamelares pequenos foram preparados por sonicação de lipossomas multilamelares grandes.

A aplicação de um elevado nível de energia a lipossomas multilamelares grandes por aplicação de ultra-sons durante um período de tempo adequado, por recurso a um banho de ultra-sons (Papahadjopoulos e Watkins, 1967) ou a uma sonda de sonicação (Huang, 1969), determina a formação de lipossomas unilamelares pequenos.

Em cada preparação de lipossomas, 30 mg de L- α fosfatidilcolina de ovo foram dissolvidos em 4 ml de clorofórmio (Merck, p.a.) num balão piriforme de 50 ml. Na sequência da evaporação do solvente orgânico, de forma análoga à referida na secção 2.1.1.1., o lípido depositou-se sob a forma de um filme delgado nas paredes do balão. Este filme lipídico foi depois submetido a um vácuo intenso (a cerca de 5 mm de Hg) durante 1 h, de forma a garantir a completa remoção do clorofórmio, após o que se procedeu à sua hidratação por adição de 4 ml de solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e de NaCl 200 mM a pH 8.6 contendo CF 50 mM, saturada com azoto. Tal como referido na secção anterior, o restabelecimento da pressão do sistema de evaporação rotativo foi sempre efectuado com azoto. A dispersão dos lípidos foi realizada alternando períodos de agitação em vórtex e de ultra-sons em banho de água, respectivamente, de 20 e 10 s de forma a perfazer um total de 10 ciclos.

Os lipossomas multilamelares assim obtidos foram submetidos a uma sonicação (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company) com uma sonda de titânio a 80 W (Heat

Systems Ultrasonics, Inc.) durante períodos de 1 min de forma a perfazer um total de 10 min (Sato, 1990). Entre cada período de sonicação, a suspensão de lipossomas foi arrefecida em gelo, de forma a prevenir o sobreaquecimento da amostra e assim evitar tanto quanto possível a degradação lipídica e a degradação da substância encapsulada. Apesar da reduzida temperatura utilizada, a sonicação foi sempre realizada a uma temperatura superior à temperatura de transição da fosfatidilcolina de ovo, facto importante na prevenção da formação de vesículas com defeitos estruturais (Dousset e Douste-Blazy, 1985). Com o objectivo de eliminar as partículas de titânio formadas durante o processo de sonicação, a dispersão de lipossomas obtida foi sujeita a uma centrifugação em rotor Beckman (tipo 70 ITI, série 92E426) durante 1 h a 113000 g (valor referente à força no fundo do tubo) e à temperatura de 4°C (em ultracentrífuga Beckman L 80).

2.1.2. Purificação de Lipossomas

Consoante o volume de amostra a tratar, a purificação dos lipossomas foi realizada por cromatografia de exclusão molecular ou por ultracentrifugação.

O princípio de separação por cromatografia de exclusão molecular baseia-se nos diferentes tamanhos moleculares dos constituintes a separar, sendo aqueles de menores dimensões retardados relativamente aos de maiores dimensões no seu deslocamento ao longo da coluna de gele (Pinto, 1972; Scopes, 1982). Através de uma escolha adequada do gele, esta técnica permite uma separação eficiente.

Na purificação dos lipossomas por cromatografia de exclusão molecular, utilizou-se uma coluna de sephadex G-25 medium (Pharmacia, 37 x 1 cm) para a separação do material não encapsulado dos lipossomas unilamelares grandes, e uma de sepharose 4B (Sigma Chemical Co., 45 x 1.5 cm) para a separação dos lipossomas unilamelares pequenos obtidos por sonicação dos lipossomas multilamelares e do material não encapsulado (Sato, 1990).

Antes do processo de separação, as colunas foram equilibradas numa solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6 ou numa solução aquosa fisiológica a pH entre 6 e 7 de NaCl a 0.9%, de dextrose a 5% ou ainda de NaCl a 0.6 ou 0.3%, adicionadas de dextrose de forma a perfazer, respectivamente, as concentrações de 1.67 e 3.33%, consoante o meio de hidratação dos lipossomas.

Independentemente do tipo de gele utilizado, procedeu-se ao registo contínuo da variação da densidade óptica a 280 nm (detector Gilson, modelo 111 B) num registador Kipp & Zonen com uma velocidade do papel de 1 mm/min.

Na ultracentrifugação a amostra é sujeita a forças centrífugas que determinam, em função da sua intensidade, a sedimentação dos constituintes de maior densidade, permanecendo os restantes no líquido sobrenadante. Assim a ultracentrifugação, além de separar os componentes de uma mistura, tem também a vantagem de concentrar a amostra.

Esta técnica foi empregue aquando da preparação das amostras de lipossomas de carboplatina para os estudos de estabilidade, devendo-se a sua utilização ao facto do volume de amostra a tratar ser suficientemente elevado para tornar pouco exequível, por exemplo, a utilização da cromatografia de exclusão molecular. No presente caso, o material não encapsulado foi removido através da realização de duas lavagens com a solução utilizada como meio de hidratação na preparação dos lipossomas, por ultracentrifugação em rotor Beckman (tipo TLA 100.3, SN 1600) a 135000 g (valor referente à força no fundo do tubo) durante 30 min à temperatura de 4°C (em ultracentrífuga Beckman TL-100).

2.1.3. Determinação Quantitativa de Fosfolípido

A quantificação de fosfolípido foi realizada segundo o método descrito por Bartlett (1959), que se baseia na análise colorimétrica de um complexo de fosfomolibdato que, depois de reduzido, apresenta uma coloração azul de intensidade proporcional à quantidade de fosfato inorgânico existente na amostra e resultante da hidrólise acídica dos fosfolípidos.

Em cada análise, as amostras de lipossomas previamente evaporadas à secura em bico de Bunsen foram sujeitas a hidrólise ácida com ácido perclórico a 70% (0.5 ml) (Merck, p.a.) em banho de areia à temperatura de 180°C durante 1 a 2 h, com refluxo do ácido (Böttcher, van Gent e Pries, 1961). Os tubos foram tapados com esferas de vidro, constituindo tanto a parte do tubo exposta ao ar como a esfera de vidro superfícies frias de condensação dos vapores de ácido perclórico, mantendo-se assim um refluxo contínuo. Após arrefecimento dos tubos, o fosfato inorgânico foi convertido em ácido fosfomolibdico, de acordo com Bartlett (1959), por adição de 7.5 ml de molibdato de amónio a 0.22% em ácido sulfúrico a 2%. O ácido fosfomolibdico foi quantitativamente reduzido a azul de molibdénio por adição de 0.3 ml de reagente de Fiske e Subbarow (bissulfito de sódio a 15%, sulfito de sódio a 0.5% e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico a 0.25%) e depois de aquecimento em banho fervente durante 15 min. Após arrefecimento, as absorvências foram lidas a 830 nm num espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Lambda 3, tendo a quantificação de fosfato sido feita com base numa curva de calibração obtida a partir de soluções padrão contendo quantidades de fosfato até 130 nmol.

As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução mãe de fosfato de potássio monobásico equivalente a 20 µg de fósforo inorgânico por ml (0.65 mM) em HCl 0.05 N, tendo sido submetidas ao mesmo tratamento referido para as amostras. Foi calculada assim a concentração molar em fosfolípido considerando que para a maioria das classes de fosfolípidos, incluindo a fosfatidilcolina, a razão molar fosfato:fosfolípido é de 1:1. A concentração ponderal de fosfolípido foi calculada tomando 775 dalton como peso molecular médio da fosfatidilcolina.

2.1.4. Caracterização de Lipossomas

Seguidamente apresentam-se os parâmetros de caracterização de lipossomas utilizados neste trabalho e que se revelam fundamentais para a selecção de condições

experimentais conducentes à obtenção de lipossomas com características adequadas aos objectivos pretendidos.

2.1.4.1. Capacidade de Ligação

A capacidade de ligação (CL) corresponde à massa de composto a encapsular (expressa em μg) por quantidade de lípido na preparação final (expressa em μmol) e traduz-se pela expressão (Steerenberg *et al.*, 1987):

$$\text{CL } (\mu\text{g}/\mu\text{mol}) = \frac{(\text{massa de composto encapsulado})_{\text{na preparação final}}}{(\text{quantidade de lípido})_{\text{na preparação final}}} \quad (1)$$

Entenda-se por preparação final a amostra obtida após as fases de extrusão ou sonicação (consoante o tipo de lipossomas) e filtração por cromatografia de exclusão molecular.

2.1.4.2. Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) é traduzida pelo quociente entre a razão molar do composto a encapsular e do lípido na preparação final e a razão molar desse composto e do lípido na fase inicial de hidratação (antes da realização da extrusão ou da sonicação e da cromatografia de exclusão molecular), expresso em percentagem:

$$\text{EE } (\%) = \frac{[\text{composto encapsulado}]/[\text{lípido}]_{\text{na preparação final}}}{[\text{composto a encapsular}]/[\text{lípido}]_{\text{na fase de hidratação}}} \times 100 \quad (2)$$

A utilização na expressão anterior dos termos concentração de lípido determinados na preparação final e na fase de hidratação elimina a influência, na eficiência de encapsulação,

das perdas de lípido que ocorrem, nomeadamente, durante os processos de extrusão e de cromatografia de exclusão molecular (Constantino e Cruz, 1989; Cruz *et al.*, 1993).

2.1.4.3. Tamanho

A determinação de tamanho (diâmetro médio) dos lipossomas foi realizada por espectroscopia de autocorrelação fotónica. Esta técnica consiste na análise das variações de intensidade resultantes da dispersão de um raio laser por partículas em suspensão (que neste caso são lipossomas) animadas de movimentos Brownianos. A análise das flutuações da intensidade da luz difractada ao longo do tempo por um autocorrelacionador permite a determinação do coeficiente de difusão das partículas e deste modo, do seu tamanho, a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k T}{3 \pi \eta d} \quad (3)$$

em que D é o coeficiente de difusão das partículas em suspensão, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η a viscosidade do meio no qual as partículas de diâmetro médio d estão em suspensão (New, 1990 c; Barber, 1993).

As amostras utilizadas para a análise de tamanho dos lipossomas foram as obtidas após a filtração por cromatografia de exclusão molecular.

Estas análises foram realizadas à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ num aparelho Malvern Autosizer II C (Malvern Instruments, U. K.), utilizando como fonte de luz incidente um raio laser de neon-hélio, a um valor de comprimento de onda de 633 nm e operando a 5 mW. A luz difractada foi detectada a 90° por um sistema de detecção de fotões que transmite o sinal a um autocorrelacionador (Malvern Multi-8, tipo 7032 CE). Todo o sistema encontra-se integrado com um computador Olivetti. Os valores de viscosidade e de índice de refração utilizados nas determinações, e correspondentes aos meios de dispersão dos lipossomas,

basearam-se nos descritos na literatura (Weast, 1980) e variaram consoante o meio de hidratação dos lipossomas (tabela III).

Tabela III: Valores de viscosidade e de índice de refração dos meios de dispersão dos lipossomas.

Meio de dispersão dos lipossomas	Viscosidade (cp)	Índice de refração
Solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6 contendo CF 50 mM	1.0020	1.3330
Solução aquosa de NaCl a 0.9% a pH 6-7 contendo carboplatina 0.027 mM	1.0187	1.3346
Solução aquosa de NaCl 0.6% e dextrose 1.67% a pH 6-7 contendo carboplatina 0.027 mM	1.0360	1.3351
Solução aquosa de NaCl 0.3% e dextrose 3.33% a pH 6-7 contendo carboplatina 0.027 mM	1.1087	1.3380
Solução aquosa de dextrose a 5% a pH 6-7 contendo carboplatina 0.027 mM	1.1457	1.3400

2.1.4.4. Volume de Encapsulação

O volume de encapsulação (VE) corresponde ao volume de fase aquosa encapsulado (expresso em μl) por quantidade de lípido (expressa em μmol), sendo calculado a partir da razão molar do material a encapsular existente na preparação final e aquele existente na fase de hidratação, multiplicado pelo inverso da concentração de lípido existente na preparação final:

$$\text{VE } (\mu\text{l}/\mu\text{mol}) = \frac{[\text{composto encapsulado}]_{\text{na preparação final}}}{[\text{composto a encapsular}]_{\text{na fase de hidratação}}} \times \frac{1}{[\text{lípido}]_{\text{na preparação final}}} \quad (4)$$

Este parâmetro depende do tamanho dos lipossomas e do número de bicamadas que os constituem (Benita *et al.*, 1984).

2.1.4.5. Recuperação

A recuperação corresponde à razão molar do composto a encapsular existente na preparação final e aquele existente na fase de hidratação, expressa em percentagem:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{[\text{composto encapsulado}]_{\text{na preparação final}}}{[\text{composto a encapsular}]_{\text{na fase de hidratação}}} \times 100 \quad (5)$$

Este parâmetro reflecte o rendimento da metodologia de preparação no que se refere à substância a encapsular (Cruz *et al.*, 1993).

2.2. REVESTIMENTO DE LIPOSSOMAS COM O-PALMITOILPULULANO

2.2.1. Síntese e Caracterização do O-palmitoilpululano

A síntese do O-palmitoilpululano foi realizada de acordo com a técnica descrita por Sato (1990). Dissolveu-se 1 g de pululano (Sigma Chemical Co.) em 11 ml de dimetilformamida anidra (Merck, p.a.) a 60°C. À solução resultante, adicionou-se 1 ml de piridina anidra (Merck, p.a.) e 0.1 g de cloreto de palmitoilo (Sigma Chemical Co.) dissolvidos em 0.24 ml de dimetilformamida anidra. Esta mistura foi agitada durante 2 h à temperatura de 60°C e depois durante 1 h à temperatura ambiente. A mistura reaccional obtida foi vertida lentamente sobre etanol absoluto gelado (70 ml) (Merck, p.a.) e sob forte agitação magnética. O precipitado obtido foi recolhido por filtração e lavado, sucessivamente, em etanol absoluto (80 ml) e em éter dietílico (60 ml). O material branco

obtido foi seco no vácuo a 50°C durante 2 h. No final obtiveram-se 828 mg de O-palmitoilpululano.

O O-palmitoilpululano foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho, com o objectivo de identificar a formação da ligação éster, e por RMN-¹H, com o intuito de determinar o grau de substituição do resíduo palmitoilo por 100 unidades de glucose.

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na absorção de radiação na gama do infravermelho com um determinado valor de frequência, por uma amostra colocada numa célula adequada. Em consequência desta absorção, ocorre a emissão de radiação com diferentes componentes de frequência, os quais são dispersos por um monocromador e seleccionados por uma fenda, obtendo-se assim, radiação monocromática. Esta é dirigida para um sistema de detecção e medida que determina, a cada frequência, a intensidade da radiação emitida pela amostra (Gonçalves, 1983 a; Teixeira Dias, 1986).

Os ensaios de infravermelho foram realizados num espectrómetro Nicolet 740 FTIR - Spectrometer de feixe único, acoplado a um computador 680 Spectral Workstation Nicolet, a partir de uma pastilha de KBr a 1 %.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que se baseia na absorção selectiva de ondas de rádio por amostras colocadas num campo magnético, com a consequente emissão de energia radiante no domínio das radiofrequências (Gil e Geraldes, 1987).

As análises de RMN foram efectuadas num espectrómetro Varian-Unity 500 sintonizado para a frequência de 499.843 MHz, tendo-se utilizado um volume de 600 µl de amostra em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro externo. Os espectros foram adquiridos à temperatura ambiente com rotação livre do tubo. Procedeu-se à análise do O-palmitoilpululano (50 mg/ml) dissolvido em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) e utilizando-se como referência o tetrametilsilano (TMS), bem como do ácido palmítico (2.56 mg/ml) dissolvido no mesmo solvente e com a mesma referência.

2.2.2. Preparação de Lipossomas Revestidos

Os lipossomas uma vez preparados, purificados e determinado o seu conteúdo em fosfato, estão prontos para serem revestidos com o pululano.

O revestimento dos lipossomas pelo O-palmitoilpululano foi realizado por adição do polímero, solubilizado em 1 ml de solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e de NaCl 200 mM a pH 8.6 ou de solução aquosa de dextrose a 5% (a um valor de pH entre 6 e 7), a 1 ou 1.5 ml de suspensão de lipossomas preparada no mesmo meio de solubilização do polímero e previamente separada do material não encapsulado por filtração em coluna de sephadex G-25 ou por ultracentrifugação (consoante se trate, respectivamente, dos ensaios relativos à CF ou à carboplatina). A mistura foi sujeita a agitação magnética durante 1 h à temperatura de 20°C (Sunamoto *et al.*, 1987). A concentração final de fosfatidilcolina de ovo foi de 1.5×10^{-3} mM e as quantidades de O-palmitoilpululano utilizadas relacionaram-se com o objectivo de perfazer razões ponderais OPP/PC entre 1 e 4 e de 7.5.

2.3. ESTUDO DO EFEITO DO REVESTIMENTO NA MEMBRANA LIPOSSOMAL

2.3.1. Estudo de Permeabilidade

Os estudos de permeabilidade da membrana lipossomal foram realizados por recurso à CF (figura 12), a qual é um derivado da fluoresceína bastante hidrossolúvel e com menor tendência do que esta para se associar às membranas fosfolipídicas e que, como tal, se localiza no núcleo aquoso dos lipossomas (New, 1990 c). A forma mais hidrossolúvel e mais fluorescente da CF é o seu anião trivalente, o qual é predominante em meios com pH neutro e alcalino (Weinstein *et al.*, 1984).

O princípio de utilização da CF em estudos de permeabilidade membranar baseia-se numa perda de eficiência da sua fluorescência para concentrações elevadas do fluoróforo (a partir de 10 mM), resultante das interações entre as suas moléculas. Este fenómeno é

conhecido por efeito de filtro interno (sinónimo do termo "self-quenching" da linguagem anglo-saxónica). Contudo, em soluções diluídas de CF, a sua fluorescência é proporcional ao número de moléculas presentes. Assim com base nesta propriedade, é possível distinguir a CF existente no interior dos lipossomas encapsulada numa concentração elevada, daquela que foi libertada para o meio exterior onde é diluída e, conseqüentemente, estudar a permeabilidade da membrana dos lipossomas através do registo do aumento da intensidade de fluorescência com o tempo, a qual, de acordo com o que foi referido, é directamente proporcional ao número de moléculas de CF que se libertaram (Weinstein *et al.*, 1977; Weinstein *et al.*, 1984).

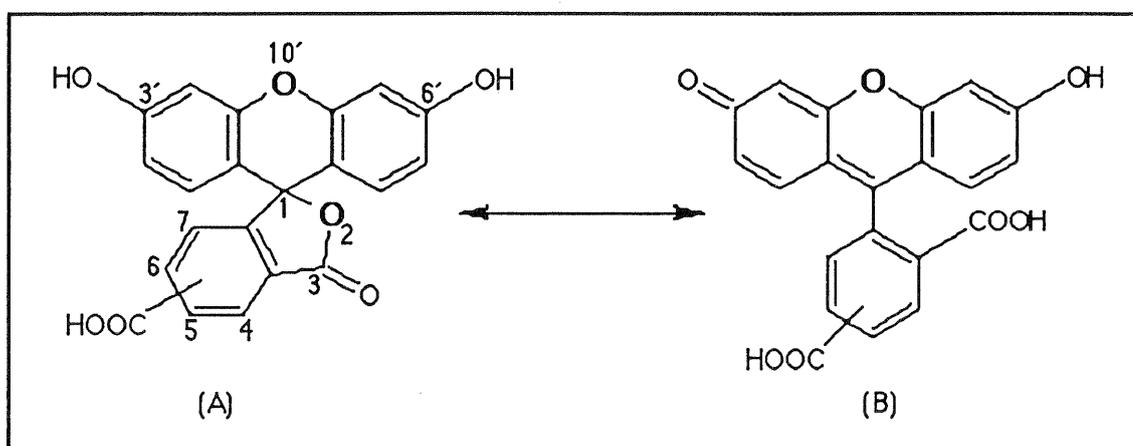


Figura 12: Fórmula de estrutura da carboxifluoresceína. Em (A) representa-se a lactona e em (B) a estrutura aberta da carboxifluoresceína (adaptado de Weinstein *et al.*, 1984).

A CF é uma molécula fluorescente que apresenta um máximo de excitação a 494 nm e um máximo de emissão a 515 nm (figura 13).

Neste estudo, os lipossomas unilamelares grandes, não revestidos e revestidos, e os lipossomas unilamelares pequenos foram preparados numa solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6 contendo de CF 50 mM, segundo as metodologias referidas (respectivamente, nas secções 2.1.1.1., 2.2.2. e 2.1.1.2.). Relativamente aos lipossomas unilamelares grandes, os estudos de permeabilidade da membrana lipossomal foram realizados para diferentes razões ponderais OPP/PC (0 a 4) e para uma concentração de fosfatidilcolina de ovo de 1.5×10^{-3} mM. Nos estudos de permeabilidade com lipossomas

unilamelares pequenos a concentração de fosfatidilcolina de ovo foi de 27×10^{-3} mM. A libertação de CF foi seguida pela variação do sinal de fluorescência a 50°C (a temperatura da amostra no interior da célula que a contém foi verificada com uma precisão de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por recurso a uma sonda de temperatura Crison Thermometer 637), num fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 B equipado com um porta-células termostatzado, a 515 nm (o comprimento de onda de excitação foi de 494 nm) e usando fendas de excitação e de emissão de 2.5 nm. Estes ensaios foram realizados mantendo a amostra sob agitação magnética suave de forma a garantir a homogeneidade do meio.

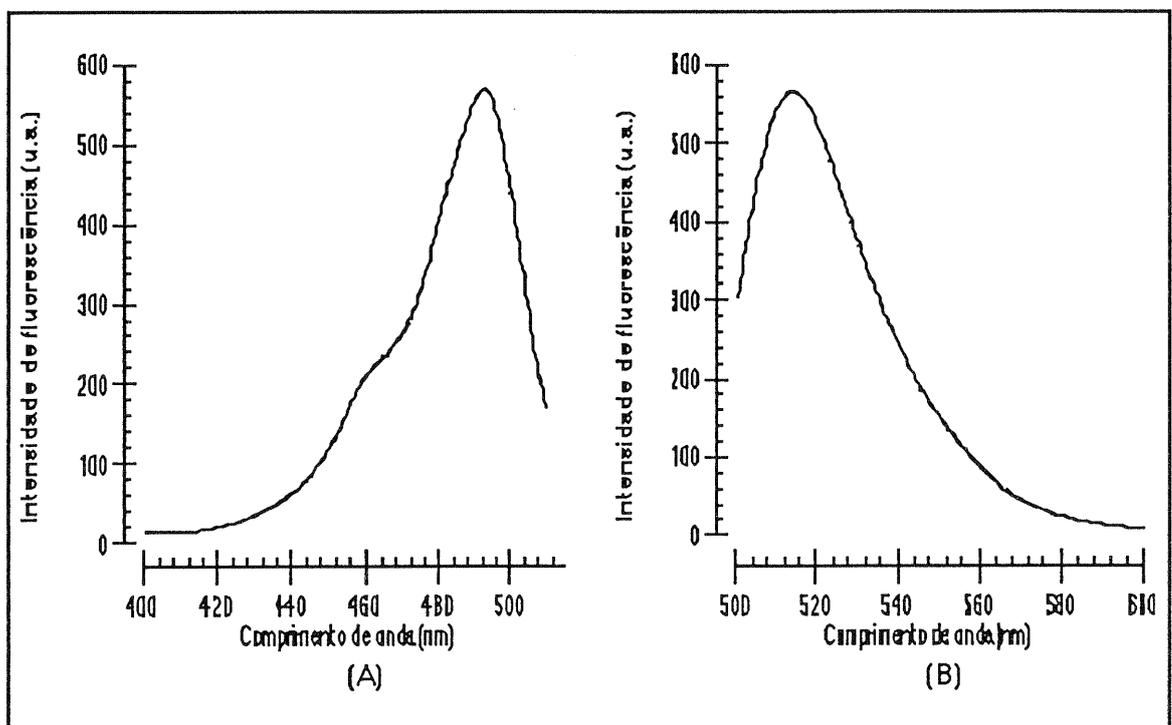


Figura 13: Espectros de excitação (A) e de emissão (B) da CF. Espectros de excitação (comprimento de onda de emissão de 515 nm) e de emissão (comprimento de onda de excitação de 494 nm) de uma solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e de NaCl 200 mM a pH 8.6 contendo CF 0.31 μM , obtidos à temperatura de 25°C .

A percentagem de libertação da CF foi calculada, de acordo com o referido por diversos autores (Au, Weiner e Schacht, 1987; Reig *et al.*, 1992), a partir da seguinte expressão:

$$\text{Libertação da CF (\%)} = \frac{F_i - F_0}{F_t - F_0} \times 100 \quad (6)$$

em que F_t é a intensidade de fluorescência registada ao fim de um determinado período de tempo, F_0 é a intensidade de fluorescência inicial e F_t é a intensidade de fluorescência correspondente à CF total (não encapsulada e encapsulada nos lipossomas), registada após a adição de 100 μ l de triton x-100 a 20% (BDH) e a homogeneização do conteúdo da célula que contém a suspensão de lipossomas (este valor de F_t foi corrigido para a diluição introduzida pela adição de triton x-100).

De referir que a realização deste estudo à temperatura de 50°C teve como único objectivo acelerar a libertação do conteúdo dos lipossomas e desta forma obter resultados no mais curto intervalo de tempo possível.

2.3.2. Estudo de Fluidiez

Para além da permeabilidade, foi igualmente estudado o efeito do revestimento na fluidez da membrana lipossomal.

Às membranas fosfolipídicas é inerente um certo grau de mobilidade molecular e de desordem, sobretudo, quando no estado líquido-cristalino. Esta mobilidade (vulgarmente associada ao termo fluidez) resulta, por um lado, dos movimentos de flexão das cadeias hidrocarbonadas, por rotação das ligações carbono-carbono e, por outro lado, dos movimentos oscilantes e deslocamentos laterais das moléculas (Jones e Cossins, 1990). Uma das técnicas mais utilizadas na obtenção de informação acerca da fluidez de membrana é a polarização de fluorescência (Engel e Prendergast, 1981; Jones e Cossins, 1990).

Na figura 14 representa-se um esquema da determinação experimental da polarização de fluorescência. A amostra colocada em O é excitada na direcção XO com um feixe de luz monocromático e polarizado (através, respectivamente, de um monocromador de excitação e de um polarizador de excitação) num plano paralelo a OZ (de direcção vertical). A fluorescência emitida é observada ao longo do eixo OY, sendo determinada a intensidade de dois componentes polarizados, com um ângulo de 90° entre eles. Estes componentes são representados por $I_{||}$ e I_{\perp} , e correspondem às intensidades de luz emitida através de um

monocromador e de um polarizador de emissão orientado, respectivamente, paralela e perpendicularmente em relação ao plano de luz polarizada de excitação na direcção vertical (paralelo a OZ) (Gennis, 1989).

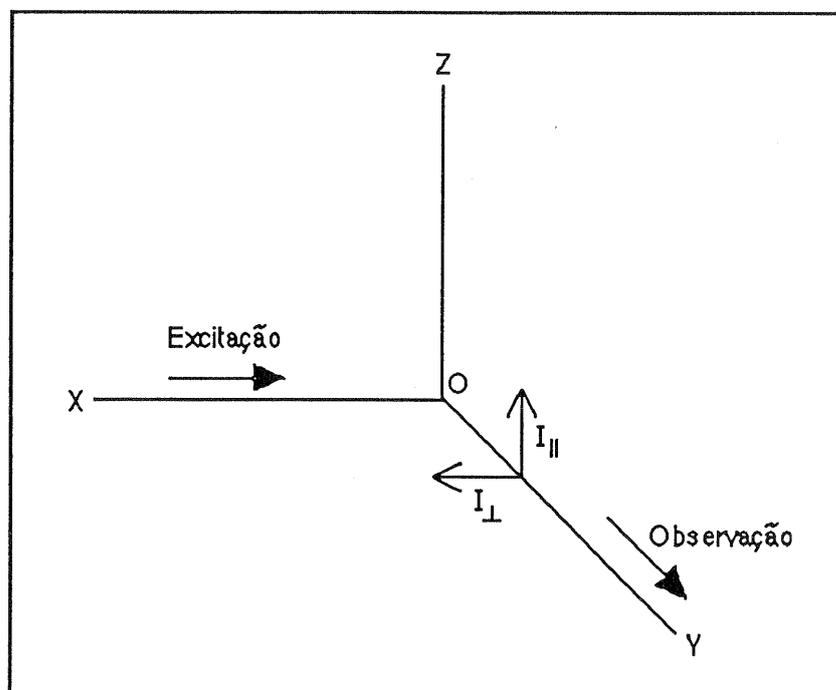


Figura 14: Representação da determinação experimental da polarização de fluorescência. A amostra colocada em O é excitada na direcção XO com um feixe de luz monocromático e polarizado num plano paralelo a OZ (de direcção vertical). A fluorescência emitida é observada ao longo do eixo OY, sendo determinada a intensidade de dois componentes polarizados, com um ângulo de 90° entre eles. Estes componentes são representados por $I_{||}$ e I_{\perp} , e correspondem às intensidades de luz emitida através de um monocromador e de um polarizador de emissão orientado, respectivamente, paralela e perpendicularmente em relação ao plano de luz polarizada de excitação na direcção vertical (paralelo a OZ) (adaptado de Gennis, 1989).

O grau de polarização (p) é então calculado de acordo com a seguinte expressão (Andrich e Vanderkooi, 1976; Antunes-Madeira, Almeida e Madeira, 1991):

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp} G}{I_{||} + I_{\perp} G} \quad (7)$$

sendo G o factor de correcção para o artefacto de polarização introduzido pelo monocromador de emissão, resultante da possibilidade de transmitir luz fluorescente

polarizada de diferentes orientações e com diferentes eficiências (Jones e Cossins, 1990). O factor G é dado pela razão dos componentes de emissão polarizados verticalmente, I_{\perp}^* , e horizontalmente, I_{\parallel}^* , quando a luz de excitação é polarizada na direcção horizontal OY (Antunes-Madeira e Madeira, 1989).

A aplicação da polarização de fluorescência ao estudo de moléculas fluorescentes susceptíveis de serem incorporadas e localizadas em diversas regiões da bicamada fosfolipídica, permite a avaliação da fluidez ao longo da espessura da bicamada (Shinitzky e Inbar, 1974).

As sondas fluorescentes utilizadas neste estudo foram o DPH e o DPH-PA (figura 15), as quais se incorporam espontaneamente em regiões bem definidas das membranas e cujas características de polarização se relacionam directamente com características de fluidez das regiões em que se localizam (Shinitzky e Barenholz, 1978).

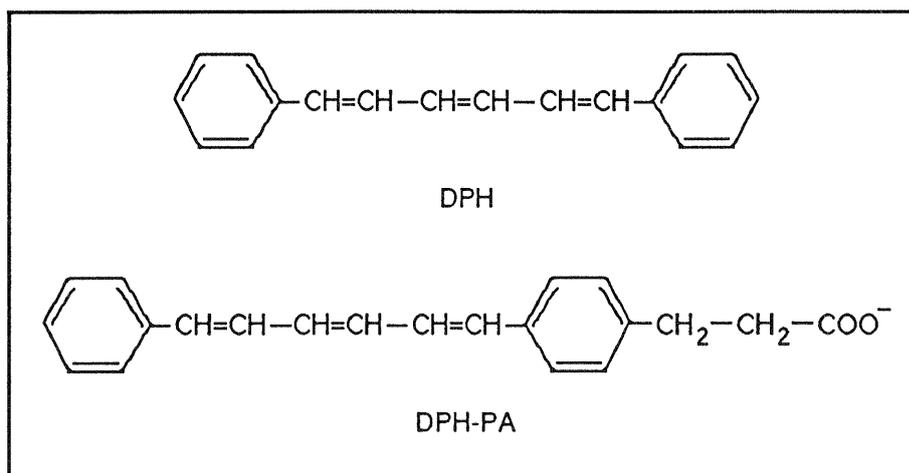


Figura 15: Fórmulas de estrutura da forma neutra do DPH e da forma aniónica do DPH-PA (adaptado de Trotter e Storch, 1989).

O DPH é uma das sondas fluorescentes de fluidez mais usadas ao nível das cadeias hidrocarbonadas dos lípidos membranares (Shinitzky e Barenholz, 1974; Shinitzky e Barenholz, 1978). É um polieno hidrocarbonado com 3 ligações duplas em conformação *trans* estável, sendo esta conformação a responsável pelo fenómeno de fluorescência. Quando misturado com sistemas lipídicos incorpora-se de forma eficiente no domínio hidrofóbico daqueles (entre as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos de uma

monocamada ou entre duas monocamadas de fosfolípidos - Jones e Cossins, 1990), independentemente do estado (gele ou líquido-cristalino) e da composição do sistema. Os espectros de excitação e de emissão do DPH incorporado em sistemas membranares obtidos a temperaturas superiores e inferiores à temperatura de transição dos lípidos são bastante análogos aos obtidos em benzeno, o que reforça a ideia de que o DPH se distribui quase exclusivamente no interior hidrofóbico da bicamada lipídica (Shinitzky e Barenholz, 1978).

O DPH-PA é um derivado do DPH, que se diferencia deste por possuir o ácido propiônico como grupo substituinte ligado a um grupo fenilo. De referir que a introdução deste grupo não altera as propriedades fluorescentes da cadeia fluorescente do DPH. Tal como o DPH, apresenta desvios espectrais mínimos com a variação da polaridade dos solventes e a partilha dos lípidos membranares é independente da fase do sistema (gele ou líquido-cristalino). O DPH-PA dispõe-se na interface aquosa da membrana devido à polaridade do ácido propiônico carregado negativamente, encontrando-se a cadeia fluorescente intercalada entre as cadeias acilo fosfolipídicas, todavia, numa posição mais externa do que a verificada para a cadeia fluorescente do DPH (Trotter e Storch, 1989).

Os espectros de fluorescência do DPH e do DPH-PA obtidos em solução isotrópica (figura 16) são típicos e semelhantes aos referidos na literatura (respectivamente, Shinitzky e Barenholz, 1974; Trotter e Storch, 1989), demonstrando que as sondas usadas neste estudo são adequadas.

Nestes estudos utilizaram-se duas amostras diferentes de lipossomas unilamelares grandes, qualquer uma delas preparadas em solução aquosa de NaCl 0.6% e dextrose 1.67%, a pH entre 6 e 7: lipossomas não revestidos (amostra controlo); e lipossomas que, após a incubação com as sondas, foram revestidos com o O-palmitoilpululano.

A incorporação das sondas foi realizada por adição, sob agitação em vórtex, de uma alíquota de uma solução de DPH 2 mM em tetrahydrofurano (Sigma Chemical Co.) ou de DPH-PA 2 mM em dimetilformamida (Molecular Probes, Junction City) à respectiva suspensão de lipossomas, com uma concentração em lípido de 345 μ M, de forma a obter uma razão molar lípido/sonda fluorescente de 400. A agitação em vórtex foi mantida durante

10 s após o que se procedeu à incubação ao abrigo da luz durante uma noite, à temperatura de 4°C (este valor de temperatura é superior ao valor da temperatura de transição da fosfatidilcolina de ovo o que facilita a incorporação das sondas).

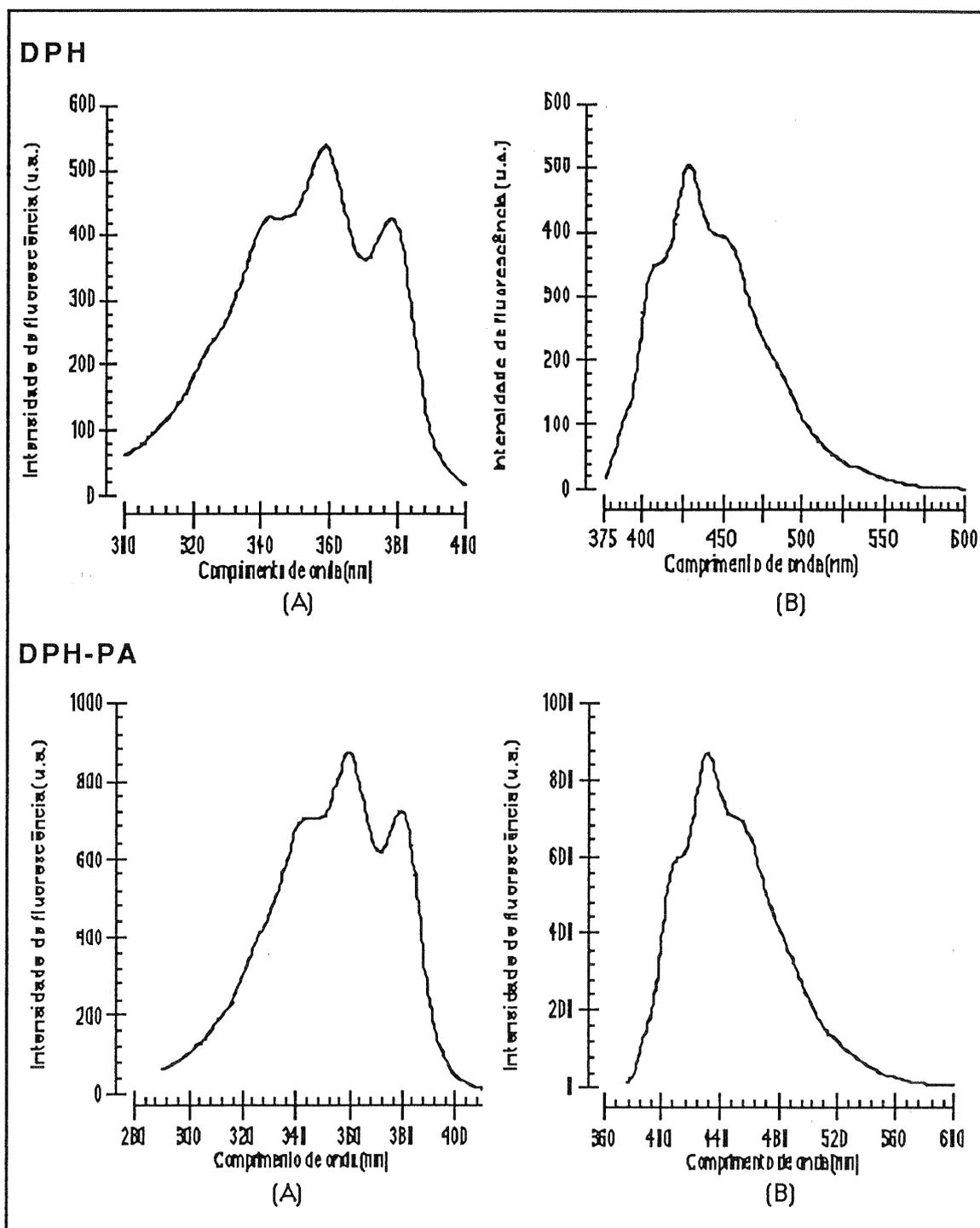


Figura 16: Espectros de excitação (A) e de emissão (B) do DPH e do DPH-PA. Espectros de excitação (comprimento de onda de emissão de 428 nm) e de emissão (comprimento de onda de excitação de 357 nm) de uma solução de DPH (0.67 μ M) em benzeno e de uma solução de DPH-PA (0.67 μ M) em dimetilformamida, obtidos à temperatura de 25°C.

A determinação dos valores de polarização de fluorescência (p) foi realizada à temperatura de 37 e 50°C num fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 B equipado com um porta-células termostaticado, tendo a temperatura da amostra sido verificada com uma precisão de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ por recurso a uma sonda de temperatura. O fluorímetro encontra-se ligado a um computador (Everex Tempo, 386/25) que permite calcular directamente os valores de polarização de fluorescência de acordo com a equação (7), para comprimentos de onda de emissão e de excitação, respectivamente, de 428 e de 357 nm. As fendas de excitação e de emissão foram, respectivamente, de 3 nm e de 4 nm.

Foram realizadas experiências controlo nas mesmas condições do ensaio, sem a adição das sondas, de forma a corrigir a difracção da luz e/ou a fluorescência devida às amostras e/ou aos solventes, tendo-se verificado que nem os solventes da carboplatina, da CF, do DPH e do DPH-PA, nem a própria carboplatina ou os lipossomas utilizados, apresentam qualquer sinal de fluorescência mensurável nas condições experimentais utilizadas.

2.4. ESTUDOS REALIZADOS EM LIPOSSOMAS CONTENDO CARBOPLATINA

2.4.1. Análise do Efeito da Carboplatina na Fluidez da Membrana Lipossomal

Tal como mencionado para o O-palmitoilpululano, o estudo do efeito da carboplatina na fluidez da membrana lipossomal foi realizado por determinação dos valores de polarização de fluorescência das moléculas fluorescentes, DPH e DPH-PA, às temperaturas de 37 e 50°C.

Foram utilizadas duas amostras de lipossomas unilamelares grandes não revestidos, ambas preparadas em solução aquosa de NaCl 0.6% e dextrose 1.67%, a pH entre 6 e 7: uma amostra de lipossomas sem carboplatina, e outra de lipossomas contendo carboplatina

(cuja concentração no meio de hidratação era de 0.027 mM) e previamente filtrada por coluna de sephadex G-25 com o intuito de remover o fármaco não encapsulado.

A incorporação das sondas e as determinações dos valores de polarização de fluorescência foram realizadas da mesma forma descrita para o estudo do efeito do O-palmitoilpululano na fluidez da membrana lipossomal (secção 2.3.2.).

2.4.2. Doseamento da Carboplatina

A concentração de carboplatina nos lipossomas foi determinada por quantificação da platina por espectroscopia de absorção atômica num aparelho Perkin-Elmer 305 AAS a 265.9 nm (com uma fenda de 0.7 nm) com uma chama de ar-acetileno.

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na absorção de energia radiante de frequência apropriada nas zonas do visível e do ultravioleta por átomos neutros no estado gasoso, o que determina a sua passagem para o estado excitado de mais baixa energia e consequente emissão de energia à mesma frequência (Gonçalves, 1983 b).

Preparou-se uma solução mãe de platina 10 mM para o que se dissolveram 195 mg de platina num volume mínimo de água régia (mistura dos ácidos concentrados, nítrico e clorídrico, na proporção de uma molécula-grama de HNO_3 para três de HCl, Magalhães e Tomás, 1957) que se evaporou à secura. Seguidamente, adicionaram-se 5 ml de HCl fumante a 37% (Merck, p.a.) e 0.1 g de NaCl, após o que se evaporou a nova mistura à secura. O resíduo obtido foi dissolvido em 20 ml de uma mistura constituída por HCl concentrado e água na proporção de 1:1, tendo esta solução sido diluída com água para um volume de 100 ml (Slavin, 1978). A partir desta solução mãe prepararam-se soluções padrão de platina de 0, 50 e 100 μM de platina (gama de valores de concentração de platina em que existe uma relação linear com a intensidade de luz absorvida) em HCl a 1%, contendo triton x-100 e $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.) nas mesmas concentrações presentes nas amostras para análise (respectivamente, 0.66% e 4.8 mg/ml).

As amostras prepararam-se por adição de 100 µl de triton x-100 a 20% em água e de 1000 µl de uma solução aquosa de nitrato de lantânio hexahidratado, com uma concentração de 14.4 mg/ml, a 600 µl de suspensão de lipossomas. O volume final foi ajustado para 3000 µl com HCl a 1% (Steerenberg *et al.*, 1987).

2.4.3. Análise do Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação na Encapsulação de Carboplatina

Prepararam-se lipossomas unilamelares grandes, utilizando como meio de hidratação soluções de carboplatina (numa concentração de 0.027 mM) a um valor de pH entre 6 e 7, contendo diferentes percentagens de NaCl: 0, 0.3, 0.6 e 0.9%. Com excepção da solução aquosa de carboplatina contendo 0.9% de NaCl, todas as outras foram adicionadas de dextrose de forma a constituírem soluções isotónicas. Assim, às soluções contendo 0, 0.3 e 0.6% de NaCl adicionou-se dextrose de modo a obter, respectivamente, concentrações de 5, 3.33 e 1.67%. O intervalo de valores de pH escolhidos corresponde à gama de valores de maior estabilidade para soluções aquosas de carboplatina (Allsopp *et al.*, 1991). Após preparação dos lipossomas, procedeu-se à separação da carboplatina não encapsulada por sephadex G-25, de acordo com o referido em 2.1.2., e doseou-se a carboplatina em cada uma das preparações através do método descrito em 2.4.2..

Os parâmetros de encapsulação avaliados neste ensaio foram a capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas e a eficiência de encapsulação da carboplatina, determinados de acordo com o referido, respectivamente, nas secções 2.1.4.1. e 2.1.4.2..

2.4.4. Estudo Acelerado de Estabilidade de Lipossomas de Carboplatina

Os lipossomas unilamelares grandes, preparados em soluções de carboplatina (0.027 mM) a pH entre 6 e 7 e contendo 0, 0.6 e 0.9% de NaCl, foram submetidos a estudos de

estabilidade a 50°C (daí a designação de estudo acelerado de estabilidade). Tal como mencionado em 2.4.3., estas soluções foram adicionadas das referidas percentagens de dextrose de modo a constituírem soluções isotónicas. Nestes estudos de estabilidade foi ainda utilizada uma preparação de lipossomas revestidos com o O-palmitoilpululano (para uma razão ponderal OPP/PC igual a 3 e a 7.5) contendo uma solução de carboplatina em dextrose 5%.

Após preparação, as várias amostras de lipossomas foram submetidas a duas lavagens, com a solução utilizada como meio de hidratação na preparação dos lipossomas, por ultracentrifugação em rotor Beckman (tipo TLA 100.3, SN 1600) a 135000 g (valor referente à força no fundo do tubo) durante 30 min à temperatura de 4°C (em ultracentrífuga Beckman TL-100), para remoção da carboplatina não encapsulada. O sedimento de lipossomas obtido foi ressuspenso em 2.5 ml da solução utilizada como meio de hidratação na preparação dos lipossomas. De referir que, no caso da amostra de lipossomas revestidos, o revestimento foi realizado após a ressuspensão do sedimento anteriormente obtido por ultracentrifugação.

Os estudos de estabilidade dos lipossomas foram efectuados durante 6 dias, tendo-se mantido a suspensão num banho de água a 50°C, sob agitação magnética suave (agitador Variomag Telemodul) com o objectivo de assegurar a homogeneidade do meio. Retiraram-se alíquotas de 175 µl ao longo do tempo, que foram depois filtradas por uma coluna de sephadex G-25 (equilibrada com a solução utilizada na preparação dos lipossomas) com o objectivo de remover a carboplatina libertada. Posteriormente, determinou-se o teor em platina encapsulado nos lipossomas e o seu teor em fosfato (segundo, respectivamente, o que foi descrito nas secções 2.4.2. e 2.1.3.). Foram obtidas amostras antes do início do ensaio e decorridas 4 h, 1, 2, 4 e 6 dias.

Tal como referido nos estudos de permeabilidade, a realização destes ensaios de estabilidade à temperatura de 50°C teve como intuito acelerar a libertação do conteúdo lipossomal e assim obter resultados num intervalo de tempo tão curto quanto possível.

A estabilidade dos lipossomas exprimiou-se em termos da percentagem de retenção de platina de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Retenção de platina (\%)} = \frac{([\text{platina}]/[\text{lípido}]_t)}{([\text{platina}]/[\text{lípido}]_i)} \times 100 \quad (8)$$

sendo $([\text{platina}]/[\text{lípido}]_t)$ e $([\text{platina}]/[\text{lípido}]_i)$, respectivamente, a razão molar platina/lípido determinada ao fim de um determinado tempo t e a razão molar platina/lípido determinada antes do início do ensaio e após filtração por cromatografia de exclusão molecular em coluna de sephadex G-25 ($t=0$). Tal como referido anteriormente para a eficiência de encapsulação, a utilização de razões molares platina/lípido em vez de razões molares de platina elimina a influência na determinação da percentagem da retenção de platina das possíveis perdas de lípido durante, por exemplo, o processo de separação por cromatografia de exclusão molecular.

CAPÍTULO 3

**RESULTADOS
E
DISCUSSÃO**

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO O-PALMITOILPULULANO

Como referido anteriormente, o pululano é um polissacarídeo linear constituído por cerca de 480 unidades de maltotriose ligadas por ligações glicosídicas α -1,6, cuja estrutura é apresentada na secção 1.3.2. (Bender e Wallenfels, 1966). O pululano por si só não é susceptível de revestir a superfície dos lipossomas (tal como os restantes polissacarídeos referidos como exemplo na secção 1.3.2.), na medida em que é facilmente removido por diluição. Torna-se pois necessário realizar uma modificação química deste polímero, através da introdução de um grupo hidrofóbico, o qual é responsável pela ligação não covalente do polissacarídeo à membrana lipossomal.

No presente trabalho, o grupo hidrofóbico introduzido foi o grupo palmitoilo, dando origem ao O-palmitoilpululano (e cuja estrutura se apresenta na secção 1.3.3.), o qual foi sintetizado por reacção do pululano com o cloreto de palmitoilo, na presença de piridina, de acordo com o descrito por Sato (1990).

3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho

Com o objectivo de caracterizar o O-palmitoilpululano, primeiramente, procedeu-se à identificação da formação da ligação éster por espectroscopia de infravermelho (figura 17).

Com base nos valores descritos na bibliografia (Pavia, Lampman e Kriz, 1979), o valor de frequência mais comum correspondente à absorção por alongação da ligação C=O é da ordem dos 1735 cm^{-1} . No que se refere à ligação C-O simples do éster, a frequência de absorção por alongação traduz-se por uma banda larga que se situa no intervalo de valores compreendidos entre 1300 e 1000 cm^{-1} .

Por observação da figura 17 é possível identificar para valores de frequência de cerca de 1664 cm^{-1} , a absorção correspondente à ligação C=O. A cerca de 1024 cm^{-1} , aparece uma banda larga e de grande intensidade que, com estas características, corresponde à absorção por alongação da ligação C-O simples do éster.

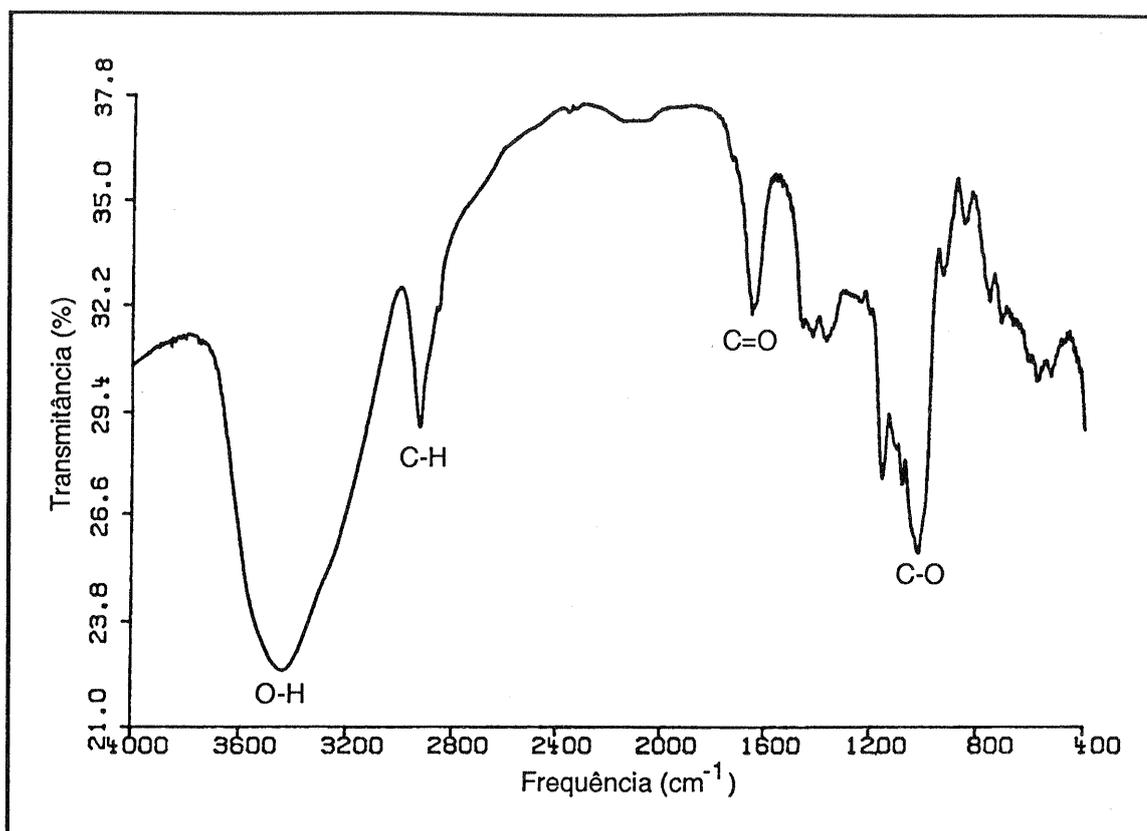


Figura 17: Espectro de infravermelho do O-palmitoilpululano. Espectro obtido num espectrómetro de feixe único, a partir de uma pastilha de KBr a 1 %.

Os valores experimentais determinados relativos a estas ligações encontram-se deslocados para valores de frequências de absorção mais baixas, em relação aos valores descritos, devido, provavelmente, à formação de ligações de hidrogénio intermoleculares no O-palmitoilpululano. O estabelecimento destas ligações diminui a constante de força das ligações C=O e C-O do éster, cuja raiz quadrada é directamente proporcional à frequência de absorção das mesmas e que se relacionam através da seguinte expressão:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2 \pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (9)$$

em que $\bar{\nu}$ é a frequência em cm^{-1} , c a velocidade da luz ($3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$), k é a constante de força da ligação em dyn/cm e μ a massa dos átomos em g (dada por $\frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2}$, em que $m_1 \times$

m_2 correspondem às massas, em gramas, dos átomos que participam numa dada ligação)⁵ (Pavia, Lampman e Kriz, 1979).

A partir da figura 17 é ainda possível identificar uma banda larga a um valor de frequência de cerca de 3456 cm^{-1} , correspondente à absorção por alongação da ligação O-H dos grupos hidroxilos, e uma banda a cerca de 2928 cm^{-1} , que corresponde à absorção por alongação da ligação C-H. O valor de frequência e a forma da banda relativa à ligação O-H traduz, precisamente, a existência de ligações de hidrogénio intermoleculares (Pavia, Lampman e Kriz, 1979).

3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear Protónica

A caracterização do O-palmitoilpululano foi complementada com a determinação do grau de substituição do resíduo palmitoilo naquele polímero por RMN-¹H.

Na figura 18 apresenta-se o espectro de RMN-¹H do O-palmitoilpululano, onde é possível identificar o pico correspondente aos prótons do grupo metilo terminal do radical palmitoilo introduzido no pululano, que aparece para um valor de desvio químico de 0.858 ppm. Os picos que aparecem a valores de desvio químico de 1.062, 1.234 e 2.380 ppm, correspondem, respectivamente, aos prótons dos 12 grupos metilénicos situados imediatamente a seguir ao grupo metilo terminal (e que são equivalentes entre si sob o ponto de vista de RMN-¹H), aos prótons do grupo metilo β e aos prótons do grupo metilo α . O facto dos prótons de cada um destes grupos apresentar valores de desvio químico diferentes, resulta de experimentarem campos magnéticos também diferentes, em virtude de uma cada vez maior proximidade ao átomo de oxigénio (bastante electronegativo) do grupo carbonilo, formado na sequência da reacção de síntese. Esta proximidade determina uma sucessiva diminuição da protecção magnética a que cada um daqueles grupos de prótons está sujeito por parte dos electrões respectivos. Em termos práticos, isto significa que os grupos de prótons sucessivamente mais próximos do grupo carbonilo entram em ressonância para

⁵ Os valores das grandezas referidas são expressos em unidades do sistema CGS.

valores de radiofrequências sucessivamente maiores (por experimentarem campos magnéticos exteriores também sucessivamente maiores) e, conseqüentemente, apresentam valores de desvio químico também sucessivamente maiores (Gil e Geraldês, 1987).

O pico que aparece para um valor de desvio químico de 2.560 corresponde ao DMSO- d_6 (Gil e Geraldês, 1987).

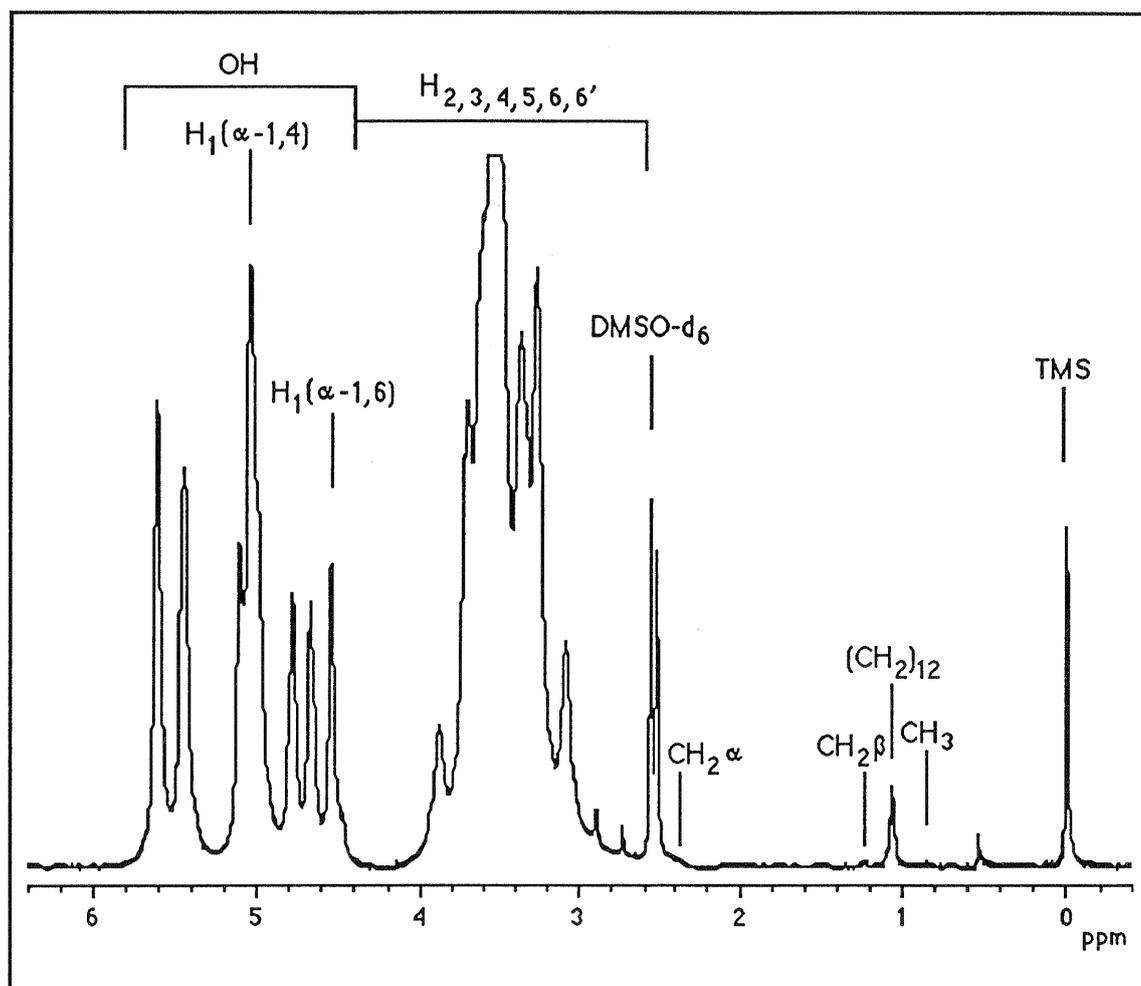


Figura 18: Espectro de RMN- 1H do O-palmitoilpululano. Espectro de RMN- 1H de uma amostra de 600 μ l de O-palmitoilpululano (50 mg/ml) em DMSO- d_6 , utilizando como referência o TMS, obtido à temperatura ambiente com rotação livre do tubo num espectrômetro sintonizado a 499.843 MHz.

Por analogia com o referido por Akiyoshi *et al.* (1993), os picos compreendidos entre os valores de desvio químico de 2.60 e de 4.20 ppm correspondem aos prótons nas posições 2, 3, 4, 5, 6 e 6' de cada um dos resíduos de glucose constituintes do O-palmitoilpululano. Ainda segundo os mesmos autores, os picos que aparecem a 4.545 e a

5.048 ppm correspondem aos prótons na posição 1, respectivamente, das ligações α -1,6 e α -1,4.

Finalmente, com base nos valores de desvio químico dos grupos hidroxilo relativos a uma molécula de maltotriose em DMSO- d_6 (Casu *et al.*, 1966), é possível deduzir para o presente caso, que os prótons dos grupos hidroxilo constituintes dos resíduos de glucose do O-palmitoilpululano se encontram no intervalo de valores de desvio químico entre 4.20 e 5.80 ppm.

Ao contrário do referido por Sato (1990), o pico que aparece para um valor de desvio químico de 1.062 ppm na figura 18 parece corresponder aos prótons de 12 e não de 13 grupos metilénicos. Com o intuito de confirmar esta suposição foi realizado o espectro de RMN- 1H do ácido palmítico. A molécula daquele ácido é formada por 16 átomos de carbono e, como tal, bastante semelhante ao cloreto de palmitoilo.

Por observação do espectro relativo ao ácido palmítico (figura 19) é possível distinguir sucessivamente, entre 0.80 e 0.90 ppm o triplete relativo aos prótons do grupo metilo terminal, entre 1.40 e 1.50 ppm o multiplete relativo aos prótons do grupo metilo β e entre 2.10 e 2.20 ppm o triplete correspondente aos prótons do grupo metilo α . A 3.344 ppm aparece o próton referente ao grupo carboxílico. Atendendo ao facto já referido de que o ácido palmítico é constituído por 16 átomos de carbono (tal como o cloreto de palmitoilo) e às atribuições já realizadas, conclui-se que o pico que aparece a um valor de desvio químico de 1.237 ppm corresponde aos prótons de 12 grupos metilénicos situados entre o grupo metilo terminal e o grupo metilénico β . Estas conclusões estão de acordo com os valores relativos dos integrais daqueles picos.

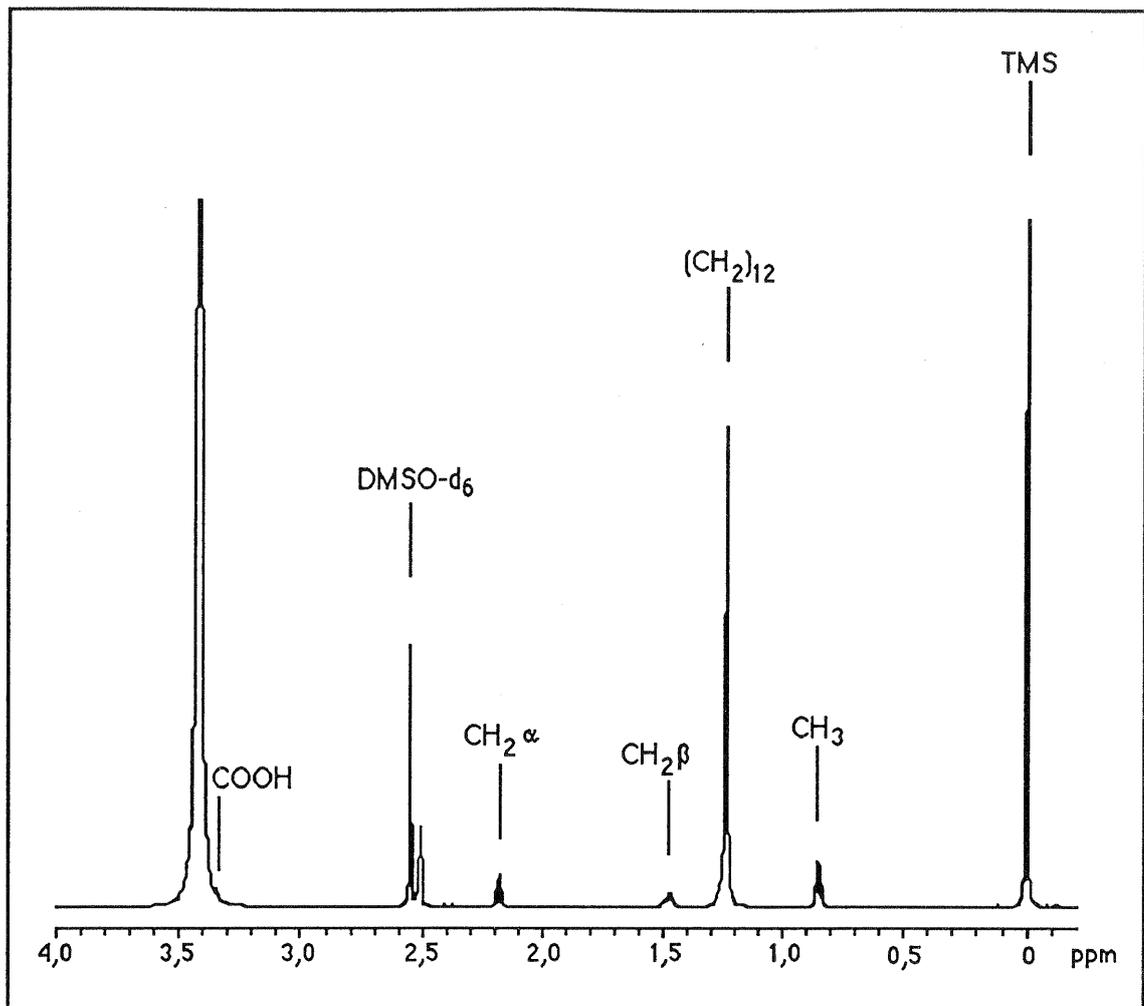


Figura 19: Espectro de RMN-¹H do ácido palmítico. Espectro de RMN-¹H de uma amostra de 600 µl de ácido palmítico (2.56 mg/ml) em DMSO-d₆, utilizando como referência o TMS, obtido à temperatura ambiente com rotação livre do tubo num espectrómetro sintonizado a 499.843 MHz.

Para calcular o grau de substituição do grupo palmitoilo no O-palmitoilpululano, considera-se na figura 18 o valor do integral do pico que aparece a um valor de desvio químico de 1.062 ppm (designado por A) e o valor do integral do conjunto de picos compreendidos entre 4.20 e 5.80 ppm (designado por B). O valor do integral designado por A é resultado dos 24 prótons de 12 grupos metilénicos do grupo palmitoilo ligado a unidades de maltotriose substituídas (cujo o número é designado por Y). O valor do integral designado por B é resultado de 12 prótons (9 relativos aos grupos hidroxilo, 2 correspondentes aos prótons na posição 1 das ligações α -1,4 e 1 próton na posição 1 da ligação α -1,6) existentes em unidades de maltotriose não substituídas (cujo o número é

designado por X) e de 11 protões (8 relativos aos grupos hidroxilo, 2 correspondentes aos protões na posição 1 das ligações α -1,4 e 1 protão na posição 1 da ligação α -1,6) existentes nas unidades de maltotriose substituídas. Simbolicamente tem-se:

$$A = 24 Y \Leftrightarrow Y = \frac{A}{24} \quad (10)$$

$$B = 12 X + 11 Y \Leftrightarrow X = \frac{24 B - 11 A}{288} \quad (11)$$

Assim o grau de substituição do grupo palmitoilo no O-palmitoilpululano é dado pela razão entre o número de unidades de maltotriose substituídas (Y) e o número total de unidades de maltotriose, não substituídas (X) e substituídas (Y):

$$\text{Grau de substituição} = \frac{Y}{X + Y} \quad (12)$$

Substituindo em (12) as expressões de Y e de X deduzidas, respectivamente, nas equações (10) e (11), vem que o grau de substituição é dado por:

$$\text{Grau de substituição} = \frac{\frac{A}{24}}{\frac{24 B - 11 A}{288} + \frac{A}{24}} \quad (13)$$

Por simplificação da expressão (13) vem:

$$\text{Grau de substituição} = \frac{12 A}{24 B + A} \quad (14)$$

Substituindo na expressão (14), A e B pelos respectivos valores de integrais, obtém-se o valor do grau de substituição do grupo palmitoilo no O-palmitoilpululano por unidade de maltotriose:

$$\begin{aligned} \text{Grau de substituição} &= \frac{12 \times 2.361}{24 \times 101.018 + 2.361} \quad (15) \\ &= 0.012 / \text{unidade de maltotriose} \end{aligned}$$

Atendendo a que cada unidade de maltotriose é constituída por 3 unidades de glucose, o grau de substituição do grupo palmitoilo no O-palmitoilpululano por 100 unidades de glucose é dado por:

$$\begin{aligned}\text{Grau de substituição} &= 0.012 \times \frac{1}{3} \times 100 \\ &= 0.4\end{aligned}\tag{16}$$

Em face do exposto, verifica-se que o O-palmitoilpululano sintetizado apresenta um grau de substituição de 0.4 resíduos de palmitoilo por 100 unidades de glucose (0.4%), valor inferior ao obtido por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992), que foi de 1.8 resíduos de palmitoilo por 100 unidades de glucose, apesar de se ter procurado reproduzir a metodologia descrita por aqueles autores. Esta diferença poderá dever-se ao facto do tempo de reacção (2 h a 60°C e depois 1 h à temperatura ambiente), para as condições de agitação magnética utilizadas, ter sido insuficiente.

O O-palmitoilpululano sintetizado e caracterizado desta forma, foi utilizado posteriormente nos estudos de permeabilidade e fluidez da membrana lipossomal e ainda nos estudos acelerados de estabilidade de lipossomas contendo carboplatina.

3.2. EFEITO DO O-PALMITOILPULULANO NA MEMBRANA LIPOSSOMAL

3.2.1. Efeito na Permeabilidade

3.2.1.1. Análise Comparativa entre Lipossomas Unilamelares Pequenos e Grandes Não Revestidos e Lipossomas Unilamelares Grandes Revestidos

Até à década de 70, as técnicas enzimáticas e de radiomarcadores constituíam as metodologias de eleição no estudo de estabilidade de lipossomas (Lelkes, 1984). Em 1977,

Weinstein *et al.* desenvolveram um método fluorimétrico simples para avaliar a estabilidade de um determinado sistema lipossomal utilizando a CF. Actualmente, esta metodologia tem um vasto campo de aplicação, como seja por exemplo, no estudo da interacção de fármacos com membranas (Au, Weiner e Schacht, 1987; Aranda e Kruijff, 1988) e no estudo da interacção de lipossomas com componentes do soro (Lelkes e Friedmann, 1984), com o sangue (Lelkes e Tandeter, 1982), com células (Weinstein *et al.*, 1977), e ainda nos estudos de permeabilidade de membranas lipossomais (Sunamoto *et al.*, 1984 a; Sunamoto *et al.*, 1984 b; Sato, 1990; Sunamoto *et al.*, 1992) e de estabilidade de lipossomas (Talsma, 1991). Esta foi a metodologia adoptada neste trabalho para efectuar o estudo comparativo das propriedades de permeabilidade membranar entre lipossomas unilamelares pequenos e lipossomas unilamelares grandes, bem como para avaliar o efeito do revestimento com o O-palmitoilpululano na permeabilidade de lipossomas unilamelares grandes.

O estudo da influência do O-palmitoilpululano na permeabilidade da membrana lipossomal foi já realizado por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) com lipossomas unilamelares pequenos obtidos por sonicação. Assim, numa fase preliminar, efectuou-se um estudo comparativo da permeabilidade da membrana lipossomal entre lipossomas unilamelares pequenos obtidos por sonicação (de acordo com o descrito na secção 2.1.1.2.) e lipossomas unilamelares grandes, obtidos por combinação dos métodos de evaporação em fase reversa e extrusão (de acordo com o descrito na secção 2.1.1.1.). Neste trabalho preconiza-se a utilização de lipossomas unilamelares grandes devido ao facto de um dos objectivos consistir na encapsulação de um fármaco hidrossolúvel. Estes lipossomas apresentam uma fracção de volume aquoso encapsulado que é superior, por exemplo, à dos lipossomas unilamelares pequenos, para a mesma concentração de lípido (Lasic, 1993 b) e, por esta razão, são especialmente indicados para a encapsulação de compostos hidrossolúveis (New, 1990 b).

Após preparação, os lipossomas unilamelares grandes e contendo CF foram separados da CF não encapsulada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de

sephadex G-25. Na figura 20 apresenta-se um cromatograma típico de uma separação entre lipossomas contendo CF e CF não encapsulada em coluna de sephadex G-25. Os lipossomas foram eluidos num volume entre 7 e 14 ml, enquanto que a CF livre foi eluida num volume compreendido entre 23 e 53 ml. Estes dados, a par da observação do cromatograma respectivo (figura 20), são reveladores de uma separação completa entre lipossomas e CF livre.

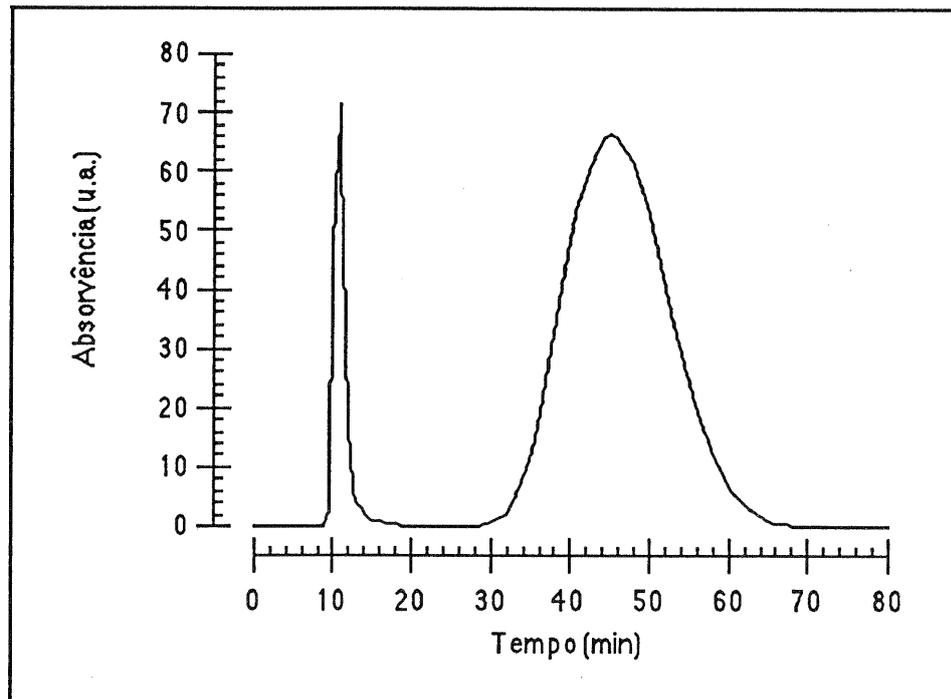


Figura 20: Perfil de eluição típico de uma separação entre lipossomas unilamelares grandes contendo CF e CF livre em coluna de sephadex G-25. Este cromatograma reporta-se à separação, à temperatura ambiente, entre lipossomas unilamelares grandes contendo CF e CF livre. O fluxo foi de 0.78 ml/min, tendo a eluição sido realizada com uma solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6. A variação da densidade óptica foi registada continuamente a 280 nm. Os lipossomas foram eluidos num volume entre 7 e 14 ml, enquanto que a CF livre foi eluida num volume compreendido entre 23 e 53 ml. u.a.: unidades arbitrárias.

Os lipossomas unilamelares pequenos foram separados dos lipossomas multilamelares (ambos contendo CF) e da CF não encapsulada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de sepharose 4B. Na figura 21 apresenta-se um cromatograma típico de uma separação em coluna de sepharose 4B entre lipossomas multilamelares,

lipossomas unilamelares pequenos e CF não encapsulada (Sato, 1990; Sunamoto *et al.*, 1992). Estes componentes foram eluidos, respectivamente, entre 23 e 27 ml, 43 e 51 ml e 62 e 113 ml.

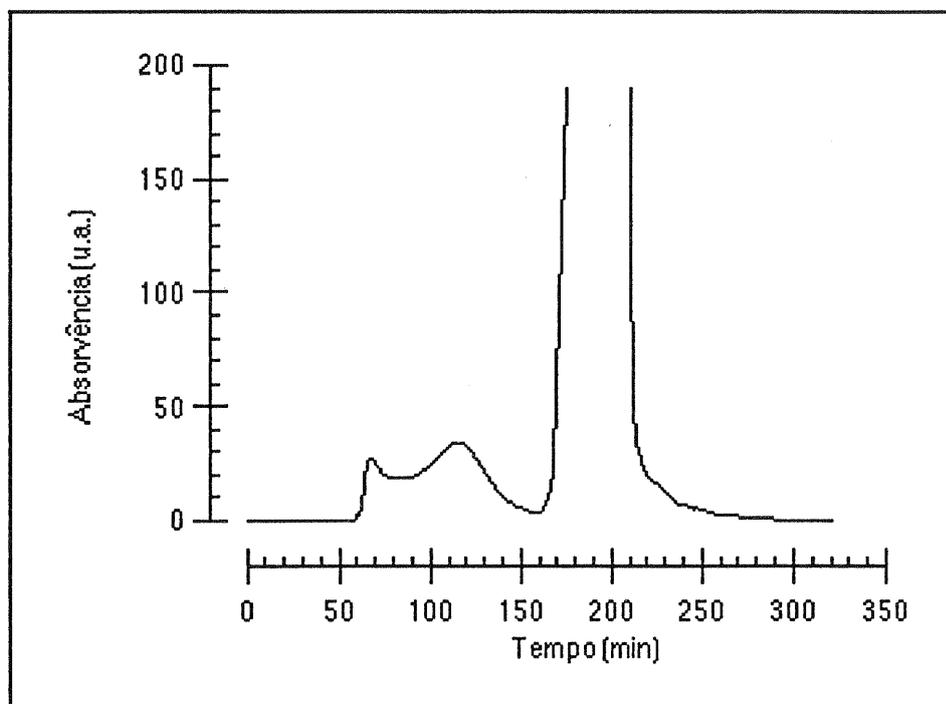


Figura 21: Perfil de eluição típico de uma separação entre lipossomas multilamelares, lipossomas unilamelares pequenos (ambos contendo CF) e CF não encapsulada em coluna de sepharose 4B. Este cromatograma reporta-se à separação, à temperatura ambiente, entre lipossomas multilamelares, lipossomas unilamelares pequenos (ambos contendo CF) e CF livre. O fluxo foi de 0.39 ml/min, tendo a eluição sido realizada com uma solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6. A variação da densidade óptica foi registada continuamente a 280 nm. Os lipossomas multilamelares e os lipossomas unilamelares pequenos foram eluidos, respectivamente, entre 23 e 27 ml e 43 e 51 ml, enquanto que a CF livre foi eluída num volume compreendido entre 62 e 113 ml. u.a.: unidades arbitrárias.

Antes da realização dos estudos de permeabilidade propriamente ditos, procedeu-se à caracterização dos lipossomas utilizados neste estudo. Os lipossomas não revestidos foram caracterizados em termos da razão molar de CF e fosfatidilcolina de ovo determinados na fase de hidratação (CF_i/PC_i), da capacidade de ligação, da eficiência de encapsulação, do tamanho, do volume de encapsulação e da recuperação. Nos lipossomas revestidos apenas foi determinado o tamanho (tabela IV).

Tabela IV: Parâmetros de caracterização de lipossomas unilamelares grandes revestidos e lipossomas unilamelares grandes e unilamelares pequenos não revestidos.

Amostra	CF _i /PC _i (μg/μmol)	CL (μg/μmol)	EE (%)	Tamanho (nm)	VE (μl/μmol)	Recuperação (%)
Lipossomas unilamelares grandes revestidos	-	-	-	242.8 (± 3.1)	-	-
Lipossomas unilamelares grandes não revestidos	1047.6 (± 2.2)	46.6 (± 0.1)	4.4 (± 0.02)	247.3 (± 4.5)	4.0 (± 0.02)	0.3 (± 0.001)
Lipossomas unilamelares pequenos não revestidos	1877.4 (± 1.6)	7.6 (± 0.01)	0.4 (± 0.01)	53.9 (± 0.9)	0.4 (± 0.001)	0.02 (± 0.00005)

Lipossomas unilamelares grandes e unilamelares pequenos de fosfatidilcolina de ovo preparados em solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e de NaCl 200 mM a pH 8.6 contendo CF 50 mM. Os valores apresentados são a média de 3 determinações; o desvio padrão é dado entre parêntesis. CF_i/PC_i: razão molar entre a 5 (6)-carboxifluoresceína e a fosfatidilcolina de ovo determinados na fase de hidratação; CL: capacidade de ligação; EE: eficiência de encapsulação; VE: volume de encapsulação.

Os valores de tamanho apresentados na tabela IV, certificam que os lipossomas preparados por combinação dos métodos de evaporação em fase reversa e extrusão são de facto, e de acordo com a classificação adoptada neste trabalho, lipossomas grandes, por terem um tamanho superior a 100 nm (247.3 nm), e aqueles preparados por sonicação são lipossomas pequenos por possuírem um tamanho inferior a 100 nm (53.9 nm). Assim, os lipossomas unilamelares grandes apresentam valores de capacidade de ligação de CF aos lipossomas, eficiência e volume de encapsulação e recuperação de CF superiores em relação aos lipossomas unilamelares pequenos. De notar que não existem diferenças significativas de tamanho entre os lipossomas unilamelares grandes, revestidos (242.8 nm) e não revestidos (247.3 nm).

Designadamente, os valores de volume de encapsulação apresentados na tabela IV comprovam os dados da literatura (Lasic 1993 b) que referem que a fracção de volume

aquoso encapsulada em lipossomas unilamelares grandes é superior à dos lipossomas unilamelares pequenos, tornando por isso os primeiros especialmente adequados para a encapsulação de fármacos hidrossolúveis como é o caso da carboplatina.

Estes parâmetros (com exceção do tamanho) foram determinados numa gama de valores de concentrações de carboxifluoresceína (de 0 a 0.4 μM) com os quais as intensidades de fluorescência determinadas se relacionam linearmente (figura 22).

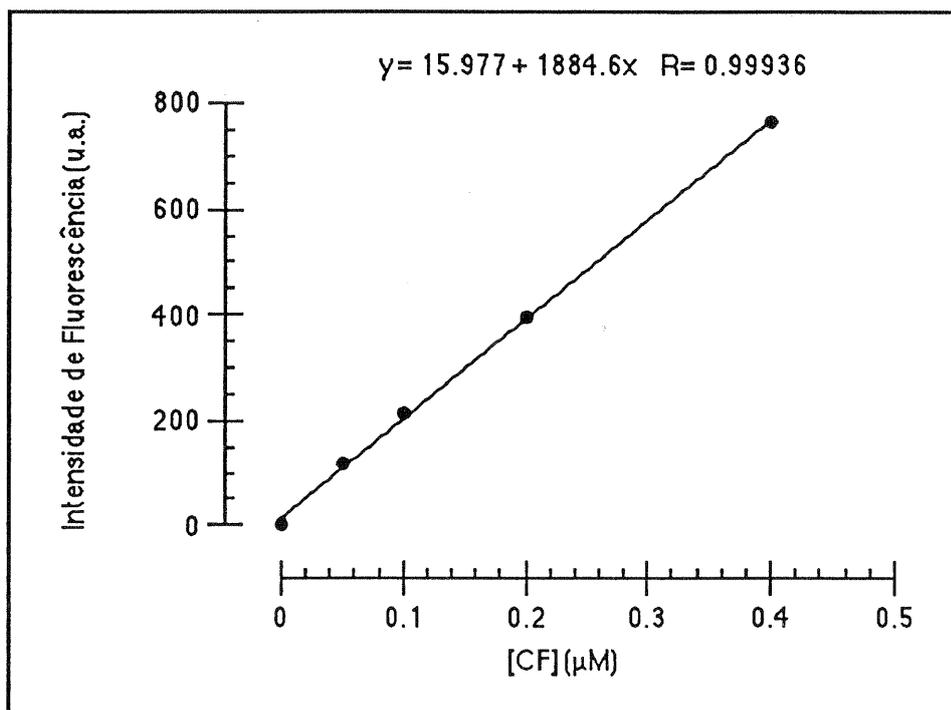


Figura 22: Curva de calibração da CF. Correlação entre a intensidade de fluorescência da CF e a sua concentração em solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM, pH 8.6, à temperatura de 25°C e na presença de 2.9% de triton X-100, para um comprimento de onda de 515 nm (o comprimento de onda de excitação correspondente foi de 494 nm) e com fendas de excitação e de emissão de 2.5 nm.

As amostras assim obtidas e caracterizadas foram submetidas ao estudo de permeabilidade membranar por detecção da libertação espontânea de CF encapsulada nos lipossomas, através da variação do seu sinal de fluorescência, em função do tempo e à temperatura de 50°C.

A observação da figura 23 indica desde logo que os lipossomas unilamelares pequenos não revestidos apresentam uma permeabilidade membranar superior à dos

lipossomas unilamelares grandes e não revestidos. Estes, decorridas 3 h de ensaio libertaram cerca de 26% do seu conteúdo em CF, enquanto que os lipossomas unilamelares pequenos, ao fim do mesmo período de tempo, libertaram mais do dobro daquele valor (cerca de 61%). Ao fim de 42 h, os lipossomas unilamelares grandes não revestidos libertaram cerca de 67% do seu conteúdo, enquanto que os unilamelares pequenos, ao fim de apenas 5 h, tinham já libertado cerca de 80% do seu conteúdo em CF.

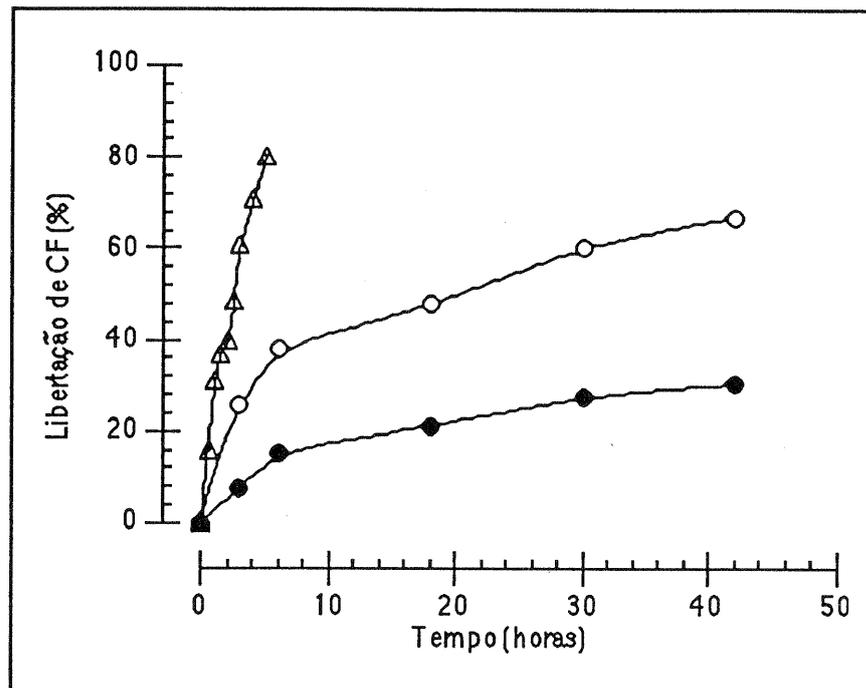


Figura 23: Libertação espontânea de CF encapsulada em lipossomas em função do tempo e à temperatura de 50°C. Libertação, em função do tempo e à temperatura de 50°C, de CF 50 mM em solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6, encapsulada em lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo (1.5×10^{-3} mM), revestidos com o O-palmitoilpululano (—●—; razão ponderal OPP/PC = 3) e não revestidos (—○—), e em lipossomas unilamelares pequenos não revestidos, obtidos por sonicação e constituídos pelo mesmo lípido (27×10^{-3} mM) (—△—). A libertação foi registada a 515 nm (o comprimento de onda de excitação foi de 494 nm) e com fendas de excitação e de emissão de 2.5 nm. A percentagem da libertação de CF foi determinada de acordo com o descrito na secção 2.3.1..

Estes resultados apontam, à partida, para uma menor permeabilidade dos lipossomas de maiores dimensões em relação aos mais pequenos o que se deve, provavelmente, ao facto da diminuição de tamanho determinar um aumento da curvatura da bicamada, o que torna os

lipossomas unilamelares pequenos termodinamicamente mais instáveis do que os lipossomas unilamelares grandes (Sheetz e Chan, 1972).

Estes dados revelam que a utilização dos lipossomas unilamelares grandes, além de ser preconizada neste trabalho, como já referido, tem a vantagem de proporcionar uma maior estabilidade em relação aos lipossomas unilamelares pequenos e que é traduzida por uma menor permeabilidade membranar daqueles.

Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) realizaram estudos de permeabilidade em lipossomas unilamelares pequenos revestidos com o O-palmitoilpululano, variando a razão ponderal OPP/PC entre 0 e 3, tendo constatado que a razão ponderal OPP/PC igual a 3 era aquela que induzia uma menor permeabilidade da membrana desses lipossomas. Assim sendo, a fase seguinte do presente estudo de permeabilidade consistiu em avaliar o efeito do revestimento da superfície dos lipossomas unilamelares grandes com o O-palmitoilpululano sintetizado neste trabalho, numa razão ponderal OPP/PC igual a 3.

Os lipossomas contendo CF e previamente separados de CF livre por passagem em coluna de sephadex G-25, foram revestidos, por incubação com uma solução de O-palmitoilpululano (solubilizado no mesmo meio de preparação dos lipossomas) à temperatura de 20°C durante 1 h e mediante agitação magnética, de forma a perfazer, neste caso, a razão ponderal OPP/PC igual a 3.

A amostra assim preparada foi submetida ao estudo de permeabilidade de forma análoga à referida anteriormente. Assim, e ainda segundo a figura 23, pode constatar-se que ao fim de 42 h de ensaio, os lipossomas unilamelares grandes revestidos libertaram cerca de 30% do conteúdo inicial em CF, enquanto que os não revestidos libertaram mais do dobro daquele valor (cerca de 67%). Estes resultados apontam para um acentuado retardamento da libertação de CF em consequência do revestimento da superfície dos lipossomas, comparativamente com a libertação no mesmo tipo de lipossomas mas não revestidos.

De salientar que por análise da figura 23 verifica-se que as curvas de libertação de CF relativas aos lipossomas unilamelares grandes, revestidos e não revestidos, revelam uma diminuição acentuada da velocidade de libertação a partir das 6 h, após o início do ensaio.

3.2.1.2. Análise de Diferentes Razões Ponderais OPP/PC

Uma vez comprovado o efeito de diminuição da permeabilidade da membrana lipossomal pelo O-palmitoilpululano, seguiu-se o estudo do efeito do revestimento de diversas razões ponderais OPP/PC na permeabilidade da membrana, por analogia com o realizado por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) com lipossomas unilamelares pequenos.

No presente trabalho, para além das razões ponderais OPP/PC entre 0 e 3, utilizou-se também a razão ponderal OPP/PC igual a 4, com o objectivo de verificar se o aumento da razão para um valor superior a 3 acentuava a diminuição da permeabilidade membranar ou se, pelo contrário, induzia algum tipo de desestabilização da membrana, aumentando, consequentemente, a permeabilidade da membrana lipossomal.

O revestimento dos lipossomas e o estudo de permeabilidade foram realizados de forma análoga à já descrita, com a diferença de que, neste caso, o ensaio de permeabilidade teve a duração apenas de 120 min, por este intervalo de tempo se situar naquele correspondente às velocidades de libertação de CF mais acentuadas (figura 23), abreviando-se, deste modo, a duração do ensaio.

De referir que, neste trabalho, não se procedeu à separação do polissacarídeo livre, uma vez que se constatou, tal como já referido por Takada *et al.* (1984), que este não exercia um efeito significativo no comportamento das vesículas, nomeadamente, no que se refere a fenómenos de fusão, agregação e/ou lise. Os dados apresentados na tabela V comprovam este facto dado que se verifica que não existem diferenças significativas entre os valores de tamanho dos lipossomas revestidos (correspondentes aos valores de razão ponderal OPP/PC de 1 a 4) relativamente aos lipossomas não revestidos (correspondente ao valor de razão ponderal OPP/PC igual a 0).

Tabela V: Valores de tamanho de lipossomas unilamelares grandes para diferentes razões ponderais OPP/PC.

OPP/PC	Tamanho (nm)
0	242.0 (\pm 2.2)
1	241.9 (\pm 4.4)
2	254.7 (\pm 2.5)
3	226.0 (\pm 5.7)
4	254.8 (\pm 4.2)

Determinações de tamanho de lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo preparados em solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e de NaCl 200 mM a pH 8.6 e contendo CF 50 mM, realizadas num aparelho Autosizer II C, à temperatura de 20°C, para um ângulo de difracção de 90° e utilizando como fonte de luz incidente um raio laser de neon-hélio, a um valor de comprimento de onda de 633 nm e operando a 5 mW. Os valores de viscosidade e de índice de refracção utilizados foram, respectivamente, 1.0020 cp e 1.33299. Os valores apresentados são a média de 3 determinações; o desvio padrão é dado entre parêntesis.

A partir dos dados representados na figura 24 é possível verificar que, à medida que aumenta a razão ponderal OPP/PC, diminui sucessivamente a velocidade de libertação de CF encapsulada nos lipossomas.

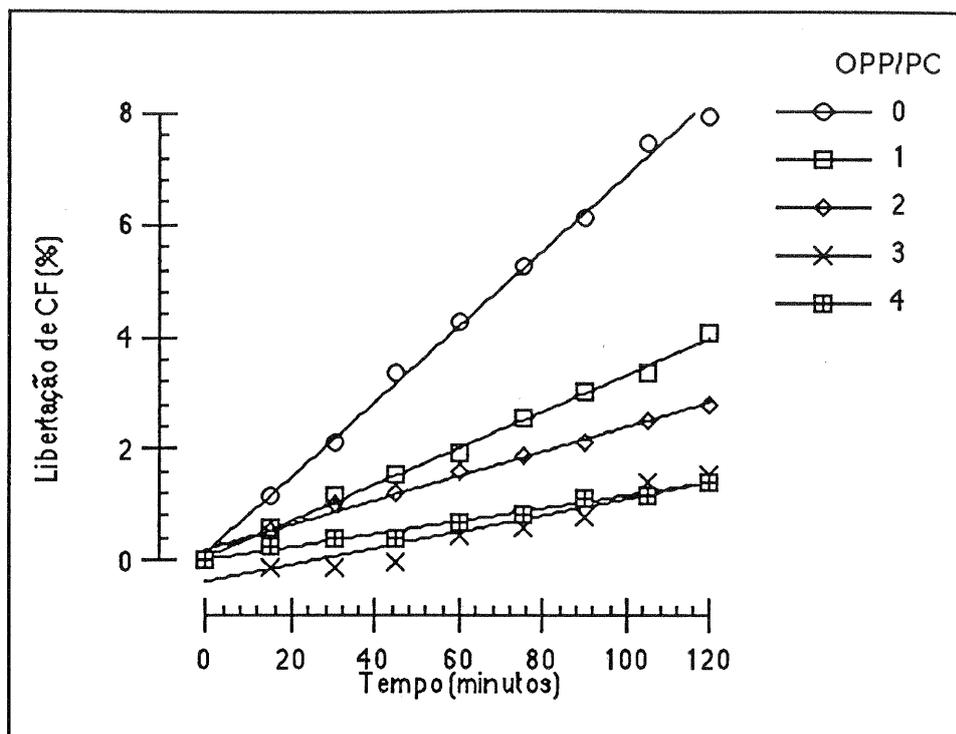


Figura 24: Efeito de diferentes quocientes ponderais OPP/PC na liberação espontânea de CF encapsulada em lipossomas unilamelares grandes, em função do tempo e à temperatura de 50°C. Liberação, em função do tempo, de CF 50 mM em solução aquosa de Tris-HCl 20 mM e NaCl 200 mM a pH 8.6, encapsulada em lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo (1.5×10^{-3} mM), não revestidos (razão ponderal OPP/PC = 0) e revestidos (razão ponderal OPP/PC = 1 a 4). A liberação foi registada a 515 nm (o comprimento de onda de excitação foi de 494 nm) e com fendas de excitação e de emissão de 2.5 nm. A percentagem da liberação de CF foi determinada de acordo com o descrito na secção 2.3.1..

Para além da diminuição da velocidade de liberação de CF com o aumento da razão ponderal OPP/PC, verifica-se, paralelamente, uma tendência cada vez maior para a diminuição da permeabilidade membranar e que se traduz numa cada vez menor percentagem total de CF libertada ao fim de 120 min. Este facto é aliás bem ilustrado na figura 25.

Nos lipossomas não revestidos, decorridos 120 min de ensaio registou-se uma liberação de CF de 8.0% relativamente ao teor inicial. O revestimento da superfície dos lipossomas com quantidades de polímero perfazendo razões ponderais OPP/PC de 1, 2 e 3 determinou diminuições sucessivamente mais acentuadas da percentagem total de CF libertada ao fim de 120 min, e que se traduziram, respectivamente, nos valores 4.5, 2.2 e

1.6%. Para a razão ponderal OPP/PC igual a 4, a percentagem total de CF libertada ao fim de 120 min assumiu o valor de 1.4%.

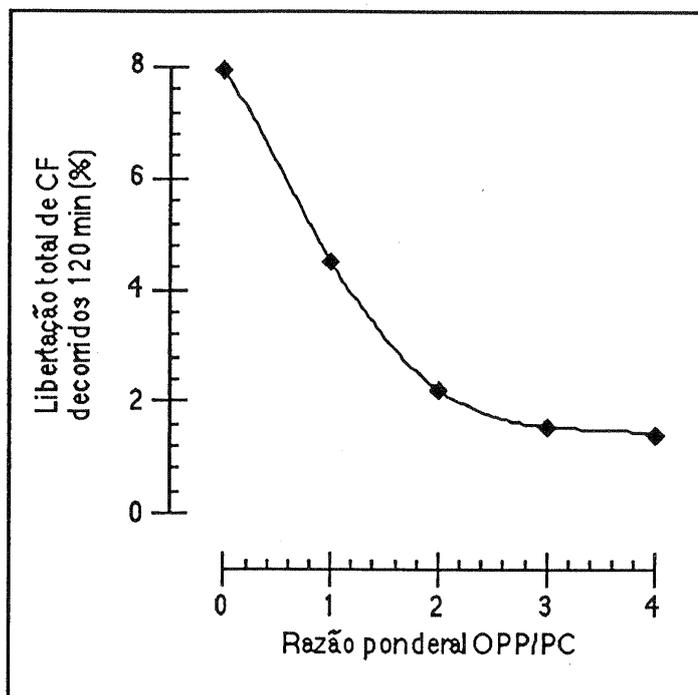


Figura 25: Libertação total de CF encapsulada em lipossomas unilamelares grandes ao fim de 120 min, em função de diferentes razões ponderais OPP/PC à temperatura de 50°C. Para mais pormenores ver legenda da figura 24.

Estes resultados são qualitativamente concordantes com os obtidos por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) em lipossomas unilamelares pequenos, uma vez que também se verifica uma tendência para a diminuição da permeabilidade da membrana lipossomal à medida que se aumenta a razão ponderal OPP/PC desde 0 a 3. Pode constatar-se que para as razões ponderais OPP/PC iguais a 3 e 4, não existem diferenças substanciais em termos da diminuição da permeabilidade membranar de CF. Assim sendo, o valor da razão ponderal OPP/PC igual a 3 foi considerado como sendo aquele que determinava uma menor permeabilidade membranar, dado que é o valor que implica um menor gasto de polissacarídeo. Neste caso o papel do diferente grau de substituição do polímero deve ser apreciado apenas de um ponto de vista qualitativo, uma vez que os sistemas coloidais em causa diferem no seu tamanho e na sua estabilidade relativa, como aliás foi já comprovado.

Uma vez que se comprovou a maior estabilidade dos lipossomas unilamelares grandes relativamente aos pequenos e se considerou que o valor da razão ponderal OPP/PC igual a 3 era aquele que induzia uma menor permeabilidade da membrana dos lipossomas, optou-se pela utilização em estudos posteriores de lipossomas unilamelares grandes revestidos naquela razão ponderal OPP/PC (quando se justifica a utilização de lipossomas revestidos), nomeadamente, no que se refere ao estudo do efeito do O-palmitoilpululano na fluidez da membrana lipossomal e na estabilidade de lipossomas de carboplatina.

3.2.2. Efeito na Fluidez

Com o objectivo de obter dados adicionais sobre o efeito do revestimento da superfície dos lipossomas com o O-palmitoilpululano, foram realizados estudos de fluidez da membrana lipossomal por recurso à técnica de polarização de fluorescência, utilizando as moléculas fluorescentes, DPH e DPH-PA.

A polarização de fluorescência consiste na excitação, com um feixe monocromático de luz polarizada, de um fluoróforo previamente incorporado na membrana cujo eixo molecular está orientado numa determinada direcção em relação ao plano de polarização da luz de excitação. Se o fluoróforo permanecer imobilizado (o que acontece, por exemplo, num meio de grande viscosidade) durante a fase de excitação (cerca de 10^{-8} s), e se o seu eixo molecular for paralelo (ou quase paralelo) ao plano de polarização da luz de excitação, a fluorescência emitida é também polarizada no mesmo plano relativamente ao de excitação. Se pelo contrário, o fluoróforo estiver imbuído de um movimento rotacional (por exemplo, devido a uma diminuição da viscosidade do meio), a polarização da fluorescência emitida diminui. A luz polarizada emitida é utilizada como uma medida do movimento oscilante do fluoróforo durante a fase de excitação, o qual é limitado pela mobilidade e grau de ordem do meio circundante (Jones e Cossins, 1990). O termo fluidez é normalmente associado à mobilidade e grau de ordem das membranas fosfolipídicas.

A fluidez do domínio hidrofóbico da bicamada é dada pelo valor de polarização de fluorescência do DPH, enquanto que o valor de polarização de fluorescência do DPH-PA traduz a fluidez da região correspondente às cadeias acilo fosfolipídicas localizadas numa zona mais próxima da superfície da membrana relativamente ao que se verifica para o DPH (Trotter e Storch, 1989).

Duas amostras de lipossomas foram incubadas, uma com o DPH e outra com o DPH-PA, ao abrigo da luz durante uma noite, à temperatura de 4°C, após o que se revestiram com o O-palmitoilpululano na razão ponderal OPP/PC igual a 3. Paralelamente duas amostras de lipossomas foram incubadas de forma idêntica, não tendo sido, todavia, revestidas, servindo, nestas condições, como amostra controlo. Os valores de polarização de fluorescência foram determinados de acordo com o referido na secção 2.3.2. Os resultados são apresentados na tabela VI.

Os dados relativos ao efeito do revestimento da superfície dos lipossomas com o O-palmitoilpululano na fluidez do domínio hidrofóbico da membrana lipossomal, e obtidos por determinação do valor de polarização de fluorescência do DPH, são pouco conclusivos. Isto porque, quer a 37°C quer a 50°C, os valores de polarização de fluorescência do controlo e das amostras são muito próximos, não se registando assim, uma tendência de variação acentuada da fluidez.

Pelo contrário, o aumento dos valores de polarização de fluorescência do DPH-PA referentes aos lipossomas revestidos, relativamente aos lipossomas não revestidos (amostra controlo), indicam uma tendência para uma diminuição da fluidez em consequência do revestimento com o O-palmitoilpululano. Esta tendência é mais acentuada para a temperatura de 50°C, sendo da ordem dos 17%. De registar que este efeito é idêntico ao verificado aquando da diminuição de temperatura na amostra controlo, de 50 para 37°C. O facto deste efeito ser mais marcado à temperatura de 50°C relativamente à de 37°C, poderá dever-se a uma maior fluidificação da membrana à temperatura de 50°C o que torna mais saliente o efeito do polímero.

Tabela VI: Valores de polarização de fluorescência do DPH e do DPH-PA em lipossomas revestidos com o O-palmitoilpululano.

Amostra	Polarização de fluorescência (p)			
	DPH		DPH-PA	
	37°C	50°C	37°C	50°C
Lipossomas não revestidos (controlo)	0.119 (± 0.003)	0.085 (± 0.009)	0.186 (± 0.002)	0.159 (± 0.006)
Lipossomas revestidos com o O-palmitoilpululano	0.108 (± 0.002)	0.092 (± 0.003)	0.190 (± 0.004)	0.186 (± 0.004)

Determinações de polarização de fluorescência com o DPH e DPH-PA, a 37 e a 50°C, incorporados na membrana de lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo (0.345 mM), preparados em solução aquosa contendo NaCl a 0.6% e dextrose a 1.67% a pH entre 6 e 7, e revestidos com o O-palmitoilpululano. As leituras foram realizadas a 357 e 428 nm (respectivamente, os comprimentos de onda de excitação e de emissão) e com fendas de excitação de 3 nm e de emissão de 4 nm. O valor das razões molares PC/DPH e PC/DPH-PA foi de 400; o valor da razão ponderal OPP/PC foi de 3. Os valores apresentados são a média de 3 determinações; o desvio padrão é dado entre parêntesis. As determinações de polarização de fluorescência foram realizadas de acordo com o descrito na secção 2.3.2..

De acordo com o referido por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992), o O-palmitoilpululano (neste caso, com um grau de substituição de 1.8 e para um valor de razão ponderal OPP/PC igual a 2) diminui ligeiramente a fluidez no domínio hidrofóbico da membrana lipossomal. A observação dos valores publicados por estes autores revela que o efeito do polímero nesta zona da membrana é pouco acentuado, pelo que é de alguma forma discutível afirmar-se que o O-palmitoilpululano exerce algum tipo de efeito na fluidez ao nível da região hidrofóbica da membrana.

Ainda segundo os mesmos autores, o mesmo polímero não induz qualquer alteração de fluidez ao nível da região próxima da superfície da bicamada. De referir todavia, que este último resultado não foi obtido com o DPH-PA, mas sim por recurso a outra sonda fluorescente: n-hexadecil-5-dimetilamino-1-naftalenosulfonamida (DSHA). Assim, a disparidade de resultados poderá ser devida ao facto de se terem utilizado sondas diferentes

nos dois estudos as quais possuem fluoróforos que se localizam em regiões diferentes na bicamada: o fluoróforo do DPH-PA encontra-se intercalado entre as cadeias acilo das moléculas fosfolipídicas, na parte mais próxima do grupo glicerol (Trotter e Storch, 1989), enquanto que o fluoróforo do DSHA se localiza na região polar das moléculas fosfolipídicas e, como tal, mais próximo ainda da superfície da bicamada fosfolipídica comparativamente com a localização do fluoróforo do DPH-PA (Iwamoto e Sunamoto, 1981). De facto o O-palmitoilpululano, numa e noutra zona da bicamada, poderá induzir efeitos diferentes em termos de fluidez, daí eventualmente o registo de resultados diferentes quando os ensaios são realizados com DPH-PA e DSHA.

Em suma, os dados obtidos a partir do valor de polarização de fluorescência do DPH-PA, a par dos de permeabilidade membranar obtidos com a CF, colocam em evidência o potencial efeito de estabilização da membrana lipossomal pelo O-palmitoilpululano (na proporção ponderal testada de OPP/PC igual a 3 e com um grau de substituição de 0.4%), respectivamente, por diminuição da fluidez e por diminuição da permeabilidade membranar.

3.3. ESTUDOS REALIZADOS EM LIPOSSOMAS CONTENDO CARBOPLATINA

Entre outros aspectos, a utilização dos lipossomas como vectores de fármacos requer a realização de uma adequada caracterização destes sistemas, no sentido de apurar os factores (como por exemplo, a capacidade de ligação e a eficiência de encapsulação do fármaco, bem como a estabilidade da preparação) que regem o seu comportamento *in vitro* e que traduzem a sua aptidão para a vectorização de um dado fármaco.

Assim para além do estudo do efeito da carboplatina na fluidez da membrana lipossomal, os lipossomas unilamelares grandes não revestidos, contendo carboplatina e preparados em meios de hidratação com diferentes teores de NaCl, foram caracterizados preliminarmente em termos de eficiência de encapsulação e de capacidade de ligação do fármaco. Foi realizado também o estudo de estabilidade dos mesmos lipossomas, avaliada em termos da percentagem de retenção de platina, que permitiu otimizar o meio de

hidratação a usar na preparação dos lipossomas de carboplatina revestidos com O-palmitoilpululano.

3.3.1. Efeito da Carboplatina na Fluidez da Membrana Lipossomal

Nos estudos realizados com lipossomas contendo carboplatina avaliou-se, numa primeira fase, a influência do fármaco na fluidez da membrana lipossomal por recurso às sondas fluorescentes, DPH e DPH-PA, utilizadas nos estudos com o O-palmitoilpululano.

Duas amostras distintas de lipossomas contendo carboplatina, e previamente filtradas por coluna de sephadex G-25, foram incubadas, uma com DPH e outra com DPH-PA, ao abrigo da luz durante uma noite, à temperatura de 4°C. Paralelamente, duas amostras de lipossomas, sem fármaco, foram incubadas de forma idêntica, tendo sido usadas como referência (amostra controlo que foi a mesma que foi utilizada nos estudos de fluidez membranar realizados com o O-palmitoilpululano). Os resultados deste estudo apresentam-se na tabela VII.

Tabela VII: Valores de polarização de fluorescência do DPH e do DPH-PA em lipossomas contendo carboplatina.

Amostra	Polarização de fluorescência (p)			
	DPH		DPH-PA	
	37°C	50°C	37°C	50°C
Lipossomas sem carboplatina e não revestidos (controlo)	0.119 (± 0.003)	0.085 (± 0.009)	0.186 (± 0.002)	0.159 (± 0.006)
Lipossomas contendo carboplatina e não revestidos	0.101 (± 0.004)	0.084 (± 0.004)	0.190 (± 0.005)	0.163 (± 0.002)

A concentração de carboplatina no meio de hidratação foi de 0.027 mM. Para mais pormenores ver legenda da tabela VI.

A semelhança dos valores de polarização de fluorescência do DPH e do DPH-PA determinados a 37 e a 50°C, entre os lipossomas contendo carboplatina e as amostras controle indicam, aparentemente, que a carboplatina não exerce qualquer efeito ao nível da fluidez membranar, pelo menos, na concentração utilizada.

De momento não se dispõem de outros estudos sobre a influência da carboplatina na fluidez da membrana de lipossomas, envolvendo o DPH. Todavia, é de assinalar que Simpkins e Pearlman (1986) estudaram o efeito da carboplatina (para concentrações de 0.05 e 0.2 mM) na fluidez da membrana de timócitos de ratos a 37°C, por recurso ao DPH, tendo observado igualmente uma ausência de alteração da fluidez membranar. É de assinalar que este resultado é idêntico ao registado no presente trabalho, o qual, no entanto, se reporta à fluidez da membrana de lipossomas de fosfatidilcolina de ovo e para concentrações de carboplatina no meio de hidratação de 0.027 mM.

A ausência de efeito da carboplatina na fluidez em zonas mais próximas da superfície membranar, traduzido pelos valores de polarização de fluorescência do DPH-PA, coincide com o obtido por aqueles autores, mas por recurso à determinação dos valores de polarização de fluorescência do 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) em lipossomas com uma composição fosfolipídica semelhante à membrana de timócitos de rato e com e sem colesterol. De referir, contudo, que segundo Trotter e Storch (1989), tanto o DPH-PA como o TMA-DPH se dispõem ao nível da interface aquosa da membrana, encontrando-se em ambos os casos a cadeia fluorescente (que é igual nas duas moléculas) intercalada entre as cadeias acilo fosfolipídicas. A única diferença reside no facto de, no DPH-PA, devido à existência do ácido propiónico como grupo substituinte ligado a um grupo fenilo, a cadeia fluorescente possuir uma localização ligeiramente mais profunda no seio da bicamada do que no caso do TMA-DPH, o que, todavia, não parece ser relevante na avaliação do fenómeno de fluidez membranar para este caso concreto.

Os estudos de fluidez realizados por Simpkins e Pearlman (1986) com o TMA-DPH revelaram que a carboplatina aumenta a fluidez (este efeito é directamente proporcional à concentração do fármaco) apenas quando os estudos se desenrolam na presença integral das

células de timócitos de rato (e não nas membranas isoladas). Segundo ainda estes autores, este facto poderá indicar que a interacção da carboplatina com a membrana envolve não apenas interacções lípido-lípido mas também interacções lípido-proteínas.

3.3.2. Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação na Encapsulação de Carboplatina

O meio de hidratação dos lipossomas constitui um parâmetro de estudo importante na optimização da preparação de lipossomas contendo fármacos. Crommelin, Slats e van Bloois (1983) demonstraram a influência do pH do meio de hidratação na encapsulação da doxorubicina, enquanto que Steerenberg *et al.* (1987) demonstraram a influência do teor em NaCl do meio de hidratação na capacidade de ligação do cisplatínio.

Sabe-se que a estabilidade de uma solução aquosa de carboplatina em meio de dextrose a 5% é superior à estabilidade de uma solução aquosa do mesmo fármaco num meio de NaCl a 0.9% (Wenfu, Zhenhuan e Yiku, 1993). Em face do exposto, no presente trabalho estudou-se a influência do teor em NaCl do meio de hidratação em alguns parâmetros de encapsulação da carboplatina, nomeadamente, a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação, em lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo não revestidos.

Os lipossomas unilamelares grandes empregues neste estudo foram preparados em solução aquosa de carboplatina (0.027 mM) a pH entre 6 e 7, contendo diferentes percentagens de NaCl: 0, 0.3, 0.6 e 0.9%. Como já referido anteriormente, com excepção da solução de carboplatina contendo 0.9% de NaCl, todas as outras foram adicionadas de dextrose de forma a constituírem soluções isotónicas. Após preparação, separaram-se os lipossomas contendo carboplatina do fármaco livre em coluna de sephadex G-25. Na figura 26 apresenta-se um cromatograma típico de uma separação em coluna de sephadex G-25 entre lipossomas contendo carboplatina, eluidos num volume entre 7 e 13 ml, e o fármaco

não encapsulado, eluído num volume compreendido entre 22 e 36 ml, o que garante uma separação completa entre lipossomas e carboplatina livre.

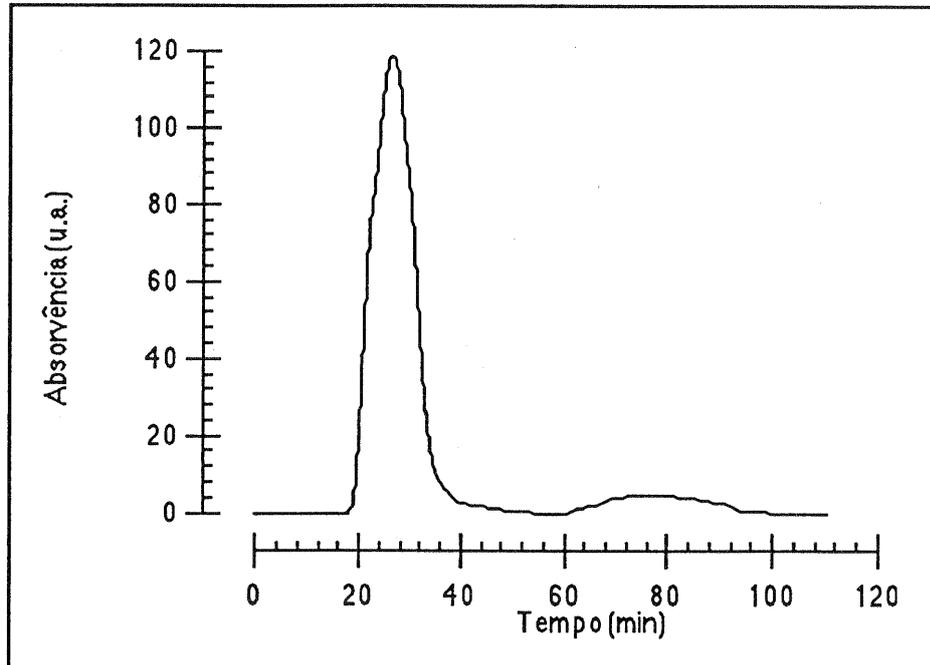


Figura 26: Perfil de eluição típico de uma separação entre lipossomas unilamelares grandes contendo carboplatina e o fármaco não encapsulado, em coluna de sephadex G-25. Este cromatograma reporta-se à separação, à temperatura ambiente, de lipossomas unilamelares grandes contendo carboplatina do fármaco livre. O fluxo foi de 0.36 ml/min, tendo a eluição sido realizada com uma solução de NaCl 0.6% e de dextrose 1.67%, a pH entre 6 e 7. A variação da densidade óptica foi registada continuamente a 280 nm. Os lipossomas foram eluídos num volume entre 7 e 13 ml, enquanto que a carboplatina não encapsulada foi eluída num volume compreendido entre 22 e 36 ml. u.a.: unidades arbitrárias.

As amostras assim preparadas foram caracterizadas em termos da razão molar de platina/fosfatidilcolina de ovo determinados na fase de hidratação, da capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas, da eficiência de encapsulação da carboplatina, do tamanho médio dos lipossomas, e da recuperação do fármaco a encapsular (tabela VIII).

Tabela VIII: Parâmetros de caracterização de lipossomas unilamelares grandes contendo carboplatina e preparados em meios de hidratação com diferentes concentrações de NaCl.

Amostra	Pt _i /PC _i (µg/µmol)	CL (µg/µmol)	EE (%)	Tamanho (nm)	Recuperação (%)
Lipossomas preparados em solução de dextrose a 5% a pH 6-7	547.6 (± 151.5)	75.9 (± 9.9)	14.4 (± 2.8)	244.8 (± 1.4)	0.9 (± 0.2)
Lipossomas preparados em solução de NaCl 0.3% e dextrose 3.33% a pH 6-7	448.1 (± 84.5)	108.3 (± 11.2)	24.5 (± 3.0)	251.9 (± 3.2)	1.2 (± 0.1)
Lipossomas preparados em solução de NaCl 0.6% e dextrose 1.67% a pH 6-7	572.9 (± 22.3)	187.7 (*) (± 0.0)	32.8 (± 1.3)	274.7 (± 2.2)	1.3 (± 0.05)
Lipossomas preparados em solução de NaCl a 0.9% a pH 6-7	544.2 (± 27.6)	89.4 (± 6.1)	16.5 (± 2.0)	256.5 (± 4.1)	1.3 (± 0.2)

(*) Este valor é a média de duas determinações.

Usaram-se lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo, não revestidos, preparados em solução aquosa de carboplatina (0.027 mM) a pH entre 6 e 7 e contendo diferentes percentagens de NaCl: 0, 0.3, 0.6 e 0.9%. Com exceção desta última solução, as restantes foram adicionadas de dextrose de forma a perfazerem, respectivamente, as concentrações de 5, 3.33 e 1.67%, constituindo assim soluções isotónicas. As determinações de tamanho foram realizadas de acordo com o descrito na secção 2.1.4.3.. Os valores apresentados são a média de 3 determinações; o desvio padrão é dado entre parêntesis. Pt_i/PC_i: quociente molar entre a platina e a fosfatidilcolina de ovo determinados na fase de hidratação; CL: capacidade de ligação; EE: eficiência de encapsulação.

A análise da tabela VIII evidencia um comportamento semelhante dos parâmetros eficiência de encapsulação, capacidade de ligação da carboplatina e tamanho dos lipossomas em função da concentração de NaCl do meio de hidratação. Assim para valores de concentração de NaCl até 0.6% verifica-se uma tendência para o aumento daqueles parâmetros, os quais, no entanto, diminuem quando se atinge a concentração de 0.9% de NaCl.

As representações gráficas da variação da eficiência de encapsulação e da capacidade de ligação relativamente à variação de tamanho dos lipossomas e em função da concentração de NaCl do meio de hidratação (respectivamente, figuras 27 e 28), colocam em destaque a existência de uma possível dependência daqueles parâmetros com o tamanho dos lipossomas. Será natural pensar-se que a variação de tamanho dos lipossomas determine variações da fracção de volume aquoso encapsulado e, conseqüentemente, será de esperar que a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas varie em conformidade com aquelas variações.

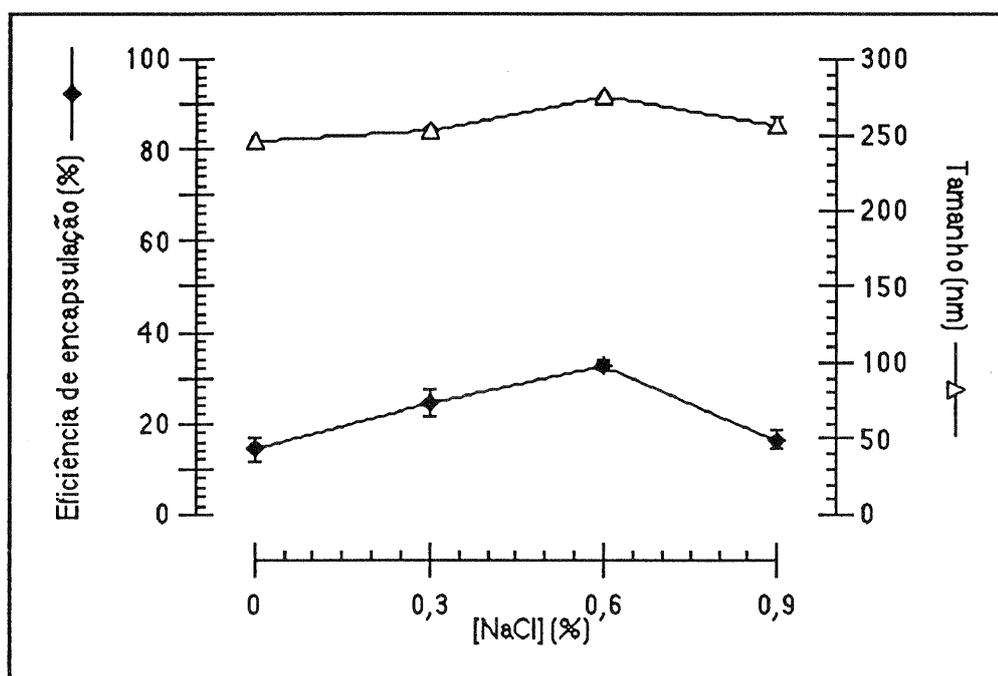


Figura 27: Efeito da concentração de NaCl do meio de hidratação, na eficiência de encapsulação de carboplatina e no tamanho de lipossomas. Para mais pormenores ver legenda da tabela VIII.

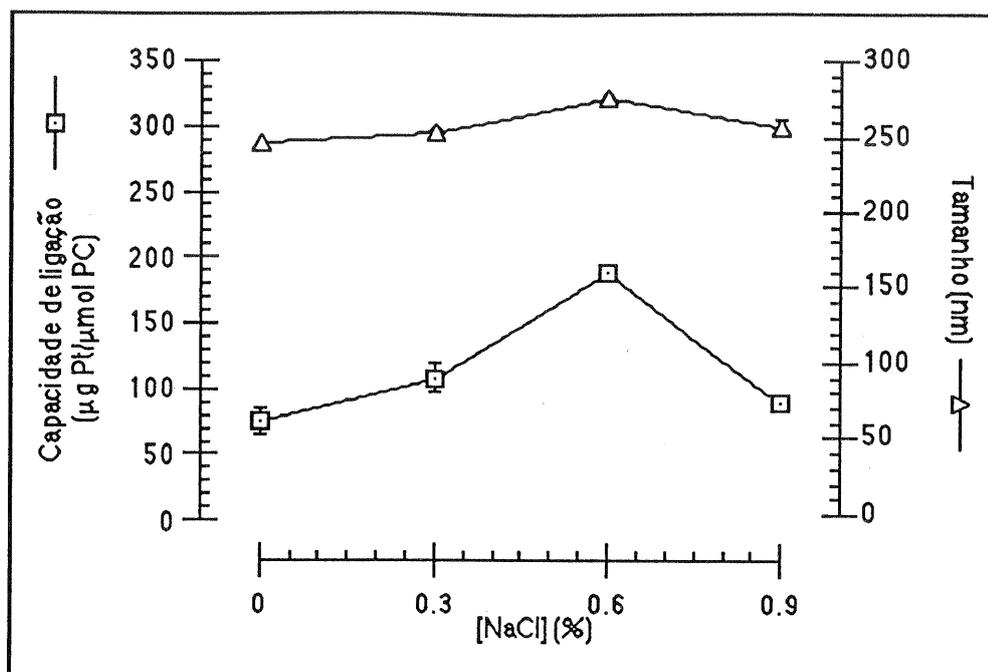


Figura 28: Efeito da concentração de NaCl do meio de hidratação, na capacidade de ligação da carboplatina e no tamanho dos lipossomas. Para mais pormenores ver legenda da tabela VIII.

É de salientar que apesar da CF ter sido utilizada como uma substância modelo de um fármaco hidrossolúvel nos estudos de permeabilidade, os resultados relativos, designadamente, à eficiência de encapsulação e à recuperação obtidos com a sonda não são comparáveis com aqueles obtidos com a carboplatina, uma vez que as concentrações iniciais de partida num e noutra caso são muito diferentes, respectivamente, 50 e 0.027 mM.

3.3.3. Estudo Acelerado de Estabilidade de Lipossomas de Carboplatina

3.3.3.1. Efeito do Teor em NaCl do Meio de Hidratação e do Revestimento com O-palmitoilpululano

A estabilidade de lipossomas no que se refere à capacidade de retenção de uma dada substância encapsulada constitui um dos principais problemas que se colocam na elaboração

de um sistema lipossomal com fins terapêuticos. A maior ou menor capacidade de retenção de uma substância depende, de entre outros factores, da composição do meio de hidratação em que os lipossomas são preparados.

Na sequência do estudo realizado na secção 3.3.2., procedeu-se, primeiramente, à análise da influência da variação da concentração de NaCl do meio de hidratação na estabilidade de lipossomas não revestidos contendo carboplatina, a qual foi avaliada em termos da capacidade de retenção de platina (figura 29).

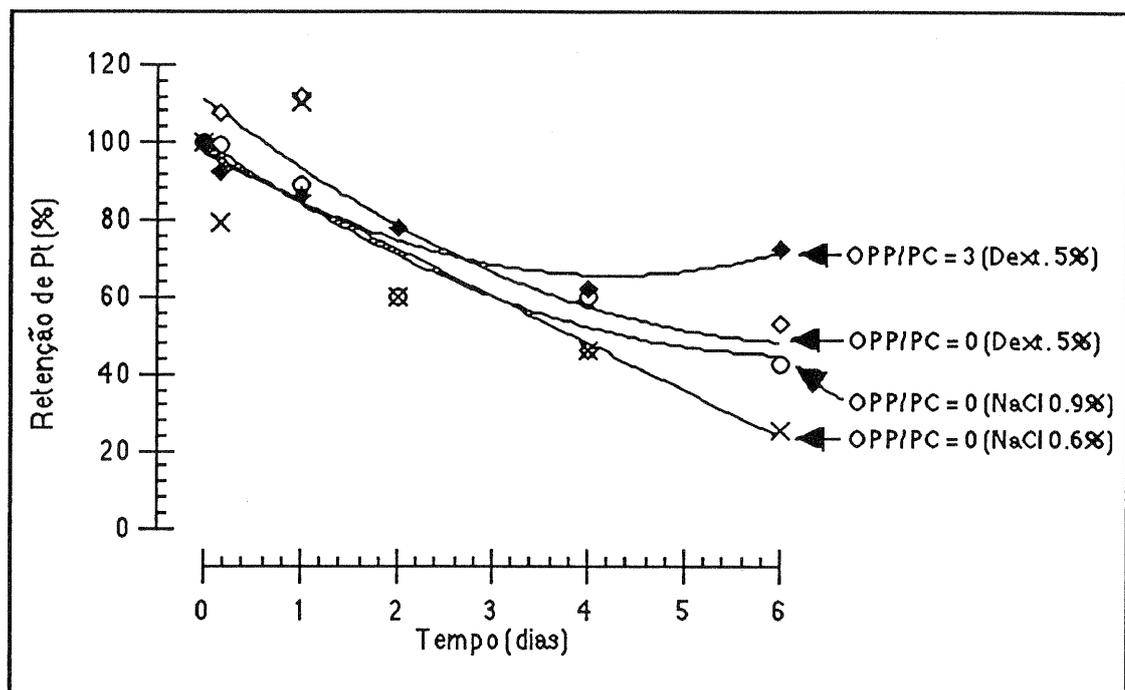


Figura 29: Estabilidade de lipossomas em termos da retenção de platina, preparados em diferentes meios de hidratação (dextrose 5% e NaCl 0.6 e 0.9%), revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 3 e em dextrose 5%) e não revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 0), em função do tempo e à temperatura de 50°C. Estudo de estabilidade, à temperatura de 50°C e durante 6 dias, de lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo preparados em solução aquosa de carboplatina (0.027 mM) a pH entre 6 e 7 e contendo, no caso dos lipossomas não revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 0), diferentes percentagens de NaCl: 0 (—◇—), 0.6 (—X—) e 0.9% (—○—). Com excepção desta última solução, as restantes foram adicionadas de dextrose de forma a perfazerem, respectivamente, as concentrações de 5 e 1.67%, tornando-as isotónicas. Os lipossomas revestidos (na razão ponderal OPP/PC igual a 3) foram preparados em meio de dextrose a 5% (—◆—). As amostragens e as determinações foram realizadas de acordo com o descrito na secção 2.4.4..

Neste estudo prepararam-se lipossomas unilamelares grandes em solução de dextrose a 5% e em soluções de NaCl a 0.3 e 0.6%, estas últimas adicionadas de quantidades de dextrose de modo a perfazer, respectivamente, as concentrações de 3.33 e 1.67%. Os lipossomas preparados e purificados por ultracentrifugação, foram incubados à temperatura de 50°C, durante 6 dias, de acordo com o referido na secção 2.4.4..

A partir dos dados representados na figura 29, verifica-se uma tendência para os lipossomas não revestidos, preparados em meio de dextrose a 5%, apresentarem uma maior estabilidade relativamente aos lipossomas não revestidos, preparados em meio de NaCl. De facto, verifica-se que ao fim de 6 dias os lipossomas preparados em meio de dextrose a 5% permanecem ainda com cerca de 50% do conteúdo inicial de platina, enquanto que os lipossomas preparados em meios de NaCl a 0.9% e a 0.6%, ao fim do mesmo período de tempo, contêm, respectivamente, cerca de 42 e 25% do teor inicial de platina.

De acordo com o referido por vários autores (Cheung *et al.*, 1987; Allsopp *et al.*, 1991), a carboplatina é susceptível de se transformar no cisplatínio quando dissolvida num meio que contenha iões cloreto, para além de se hidrolisar numa espécie iónica, um complexo diaminodiaquoplatina (II) (figura 30; Allsopp *et al.*, 1991). Na ausência de iões cloreto no meio (como por exemplo, em meio de dextrose), a carboplatina hidrolisa-se apenas na espécie iónica já referida (figura 30; Allsopp *et al.*, 1991). Para se ter uma ideia do grau de degradação da carboplatina, Allsopp *et al.* (1991) referem que o tempo necessário para que ocorra 5% de degradação de carboplatina em meio aquoso sem iões cloreto ou em meio de NaCl a 0.9% à temperatura de 25°C é de, respectivamente, 52.7 e 29.2 h. Este facto poderá justificar de alguma maneira os resultados apresentados na figura 29. Assim, quando os lipossomas são preparados em meio de dextrose a 5%, forma-se apenas uma espécie iónica, que apresenta mais dificuldades do que o cisplatínio em se difundir através da membrana lipossomal, já que o cisplatínio é uma molécula pequena, com características hidrofílicas e lipofílicas e, como tal, atravessa com bastante facilidade a membrana lipossomal (Freise *et al.*, 1982; Steerenberg *et al.*, 1987). Esta facilidade com que o cisplatínio atravessa a membrana lipossomal poderá contribuir para a tendência de uma

diminuição mais acentuada do conteúdo lipossomal em platina nos lipossomas preparados em meio de NaCl relativamente aos preparados em meio de dextrose.

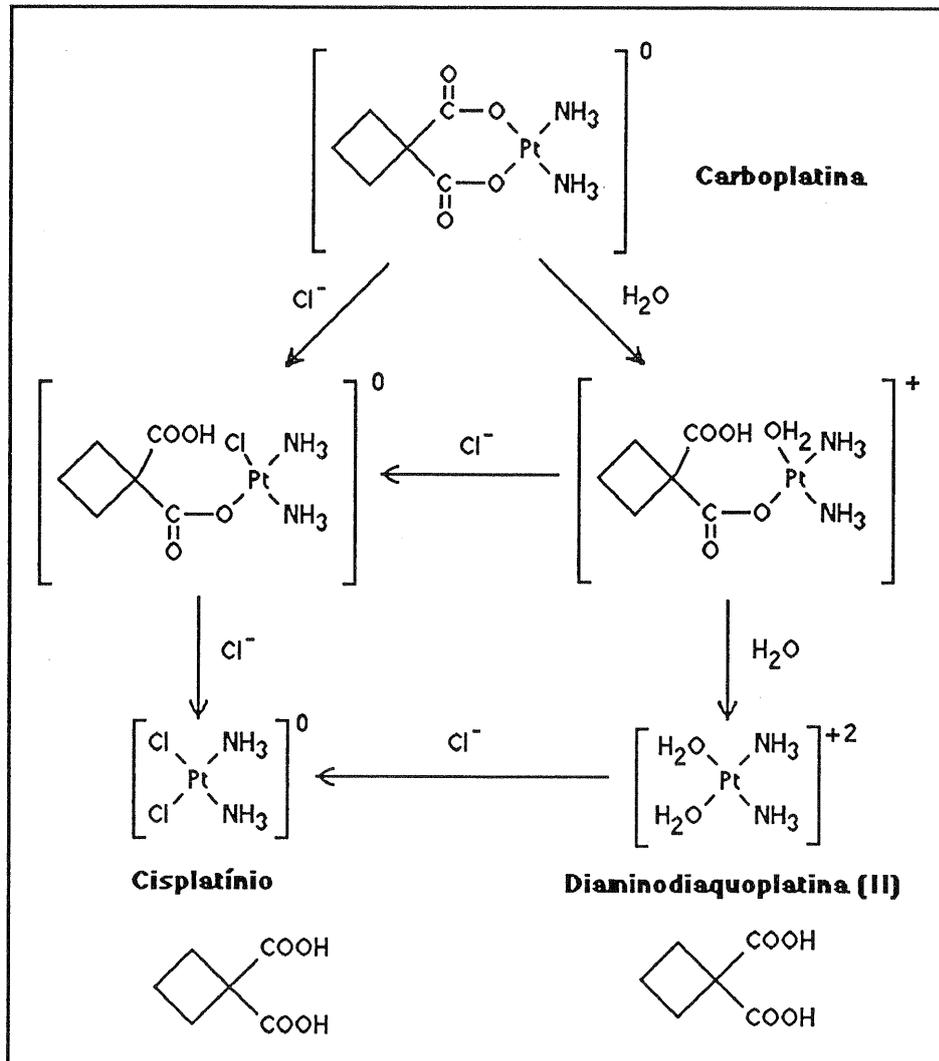


Figura 30: Degradação da carboplatina em solução aquosa contendo íons cloreto. Numa solução aquosa contendo íons cloreto a carboplatina degrada-se no cisplatínio e hidrolisa-se no complexo diaminodиаquoplatina (II) (adaptado de Allsopp *et al.*, 1991).

Os dados obtidos até ao momento no que se refere à influência do teor em NaCl do meio de hidratação nos parâmetros de encapsulação e na estabilidade de lipossomas de carboplatina, poderão dar importantes indicações no que diz respeito à optimização, simultaneamente, daqueles dois parâmetros. Foi determinado, por um lado, que a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação da carboplatina a lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo é máxima para um teor de NaCl no meio de hidratação de 0.6% e,

por outro lado, que a estabilidade dos lipossomas é tendencialmente superior num meio sem iões cloreto. Assim a optimização simultânea dos parâmetros de encapsulação de carboplatina e da estabilidade dos respectivos lipossomas poderá eventualmente ser conseguida através da utilização de um meio de hidratação que possua uma força iónica semelhante à que possui uma solução de NaCl 0.6%, adicionada de uma concentração de dextrose de 1.67%, mas que, no entanto, não envolva a utilização de iões cloreto de forma a preservar a estabilidade dos lipossomas de carboplatina.

Uma vez que os lipossomas preparados em meio de dextrose apresentam uma estabilidade tendencialmente superior à daqueles preparados num meio com iões cloreto, procedeu-se ao revestimento dos primeiros com o O-palmitoilpululano na razão ponderal OPP/PC igual a 3, valor que se concluiu ser aquele que induz menor permeabilidade membranar com base nos resultados da CF e, como tal susceptível de, neste caso, melhorar a estabilidade dos lipossomas em termos da capacidade de retenção de platina.

De acordo com os resultados apresentados na figura 29, os lipossomas revestidos com o O-palmitoilpululano, e preparados em meio de dextrose 5%, revelam uma estabilidade superior relativamente aos lipossomas não revestidos (preparados igualmente em meio de dextrose 5%). De facto, verifica-se que os lipossomas revestidos ao fim de 6 dias apresentam ainda cerca de 70% do conteúdo inicial de platina, enquanto que os lipossomas não revestidos, preparados no mesmo meio de hidratação, como já referido, conservam apenas cerca de 50% do conteúdo inicial de platina, ao fim do mesmo período de tempo.

De acordo com o verificado anteriormente a partir dos ensaios de permeabilidade com a CF e da determinação dos valores de polarização de fluorescência do DPH-PA em lipossomas revestidos (respectivamente, secções 3.2.1.2. e 3.2.2.), este resultado é consequência do efeito de estabilização induzido pelo O-palmitoilpululano (na razão ponderal OPP/PC igual a 3) na membrana lipossomal, designadamente, por diminuição da permeabilidade membranar e por diminuição da fluidez.

De referir que durante o período de 6 dias em que decorreu o estudo de estabilidade registaram-se variações (em qualquer dos casos diminuições) no tamanho dos lipossomas (figura 31). Assim, os lipossomas preparados em meio de NaCl a 0.9% e 0.6% apresentaram uma variação de tamanho de cerca de, respectivamente, 25 e 27%. Nos lipossomas preparados em dextrose 5% registou-se uma variação superior, cerca de 38%, enquanto que nos lipossomas revestidos a variação foi apenas da ordem dos 8%.

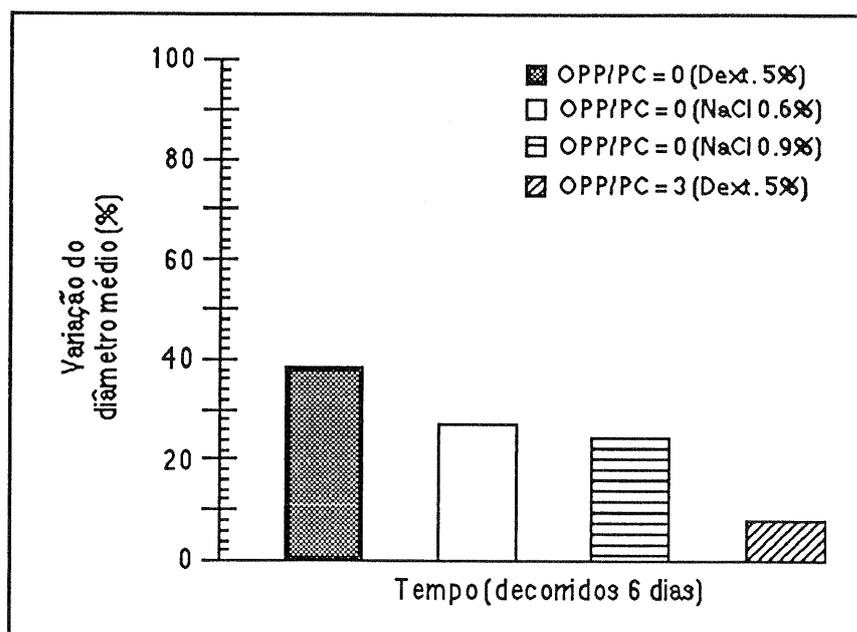


Figura 31: Variação de tamanho de lipossomas contendo carboplatina, preparados em diferentes meios de hidratação (dextrose 5% e NaCl 0.6 e 0.9%), revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 3 e em dextrose 5%) e não revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 0), decorridos 6 dias e à temperatura de 50°C. Variação de tamanho (diminuição) de lipossomas unilamelares grandes calculada a partir de valores de tamanho obtidos num aparelho Autosizer II C à temperatura de 20°C, para um ângulo de difracção de 90° e utilizando como fonte de luz incidente um raio laser de neon-hélio, a um valor de comprimento de onda de 633 nm e operando a 5 mW. As amostras analisadas foram recolhidas durante o estudo de estabilidade apresentado na figura 29. Decorrentes do conteúdo em NaCl do meio de hidratação, respectivamente 0, 0.6 e 0.9% (os dois primeiros contendo concentrações em dextrose, respectivamente, de 5 e 1.67%), assim os valores de viscosidade e de índice de refracção foram, respectivamente, para cada um deles, de 1.1457 cp e 1.340, 1.03602 cp e 1.3351 e 1.0187 cp e 1.3346.

Destes dados saliente-se a variação de tamanho menos acentuada observada nos lipossomas revestidos relativamente aos não revestidos preparados em meio de dextrose 5%.

A menor variação observada nos lipossomas revestidos aponta para um possível efeito de estabilização do O-palmitoilpululano no que se refere à variação de tamanho dos lipossomas em função do tempo. Este dado adquire especial importância quando se efectua a conservação dos lipossomas sob a forma de uma suspensão (como forma farmacêutica), em que existe a possibilidade real de variação de tamanho, já que se sabe que o tamanho é um factor determinante na distribuição *in vivo* dos sistemas coloidais (Müller, 1991).

3.3.3.2. Efeito de Diferentes Razões Ponderais OPP/PC

Nos ensaios de permeabilidade realizados com CF estudou-se o efeito de diferentes razões ponderais OPP/PC na estabilidade de lipossomas unilamelares grandes, tendo-se verificado que os valores iguais a 3 e a 4 eram aqueles que correspondiam a uma maior estabilidade lipossomal (traduzido numa menor permeabilidade membranas). Como referido, uma vez que não existiram diferenças relevantes na diminuição de permeabilidade membranas induzida pelas razões ponderais OPP/PC iguais a 3 e a 4, nos estudos subsequentes optou-se pela razão ponderal OPP/PC que implicava um menor gasto de polímero, precisamente aquela igual a 3. Como mencionado, estes resultados são qualitativamente semelhantes aos obtidos por Sato (1990) com lipossomas unilamelares pequenos.

De entre outros polissacarídeos, Sato (1990) estudou também o efeito do O-palmitoilamilopectina (com um grau de substituição de 4.9%) na permeabilidade membranas de lipossomas unilamelares pequenos, por recurso ao método fluorimétrico da CF. Curiosamente, verificou que para o valor de razão ponderal O-palmitoilamilopectina/fosfatidilcolina de ovo (OPAP/PC) igual a 3 e especificamente para o polímero com o grau de substituição igual a 4.9%, a permeabilidade da membrana lipossomal aumentava relativamente aos lipossomas não revestidos. Segundo aquele autor, este resultado deve-se à penetração no seio da membrana lipossomal de uma grande

quantidade de grupos palmitoilo, com conseqüente desestabilização daquela e aumento da permeabilidade membranar.

No seguimento da ideia anterior, procurou-se avaliar, relativamente ao O-palmitoilpululano com um grau de substituição de 0.4%, a possível existência de razões ponderais OPP/PC que pudessem determinar a desestabilização da membrana de lipossomas unilamelares grandes de carboplatina com o conseqüente aumento da permeabilidade membranar à carboplatina. Para este efeito, revestiram-se lipossomas de carboplatina com um valor de razão ponderal OPP/PC igual a 7.5 (e preparados em meio de dextrose 5%), por se ter considerado que este seria um valor suficientemente elevado relativamente ao utilizado nos ensaios anteriores, podendo revelar por isso se o referido efeito se verificava ou não.

Após decurso de um estudo de estabilidade de 6 dias (figura 32), nas mesmas condições que os anteriores, verificou-se que nos lipossomas de carboplatina revestidos com a razão ponderal OPP/PC igual a 7.5 o conteúdo em platina tende a diminuir rapidamente desde o início do ensaio, conservando, decorridos 6 dias, apenas cerca de 21% do conteúdo inicial em platina. Este valor é bastante inferior ao verificado nos lipossomas revestidos com a razão ponderal OPP/PC igual a 3, cuja percentagem do conteúdo inicial de platina ao fim de 6 dias foi de cerca de 70%, bem como em relação aos lipossomas não revestidos e preparados no mesmo meio de hidratação nos quais a percentagem do conteúdo inicial de platina e ao fim do mesmo período de tempo foi de cerca de 50%.

Este resultado aponta para a eventual ocorrência de um efeito semelhante ao verificado por Sato (1990) com o O-palmitoilamilopectina. É possível que para razões ponderais OPP/PC iguais a 7.5 a quantidade de grupos palmitoilo inseridos no seio da membrana lipossomal seja de tal forma elevada que determine a desestabilização da membrana com o conseqüente aumento da permeabilidade à carboplatina.

Por analogia com as experiências realizadas com o O-palmitoilpululano no início deste trabalho, seria importante complementar este ensaio com o estudo do efeito do O-palmitoilpululano (na razão ponderal OPP/PC igual a 7.5) na fluidez membranar, por determinação dos valores de polarização de fluorescência do DPH e DPH-PA, de forma a verificar se a possível desestabilização referida se reflecte numa diminuição daqueles valores

e, conseqüentemente, num aumento de fluidez. Para além deste aspecto, seria igualmente interessante avaliar o efeito de razões ponderais OPP/PC intermédias entre 4 e 7.5 na estabilidade de lipossomas de carboplatina com o intuito de determinar o valor da razão ponderal OPP/PC a partir do qual se observa o aumento de permeabilidade.

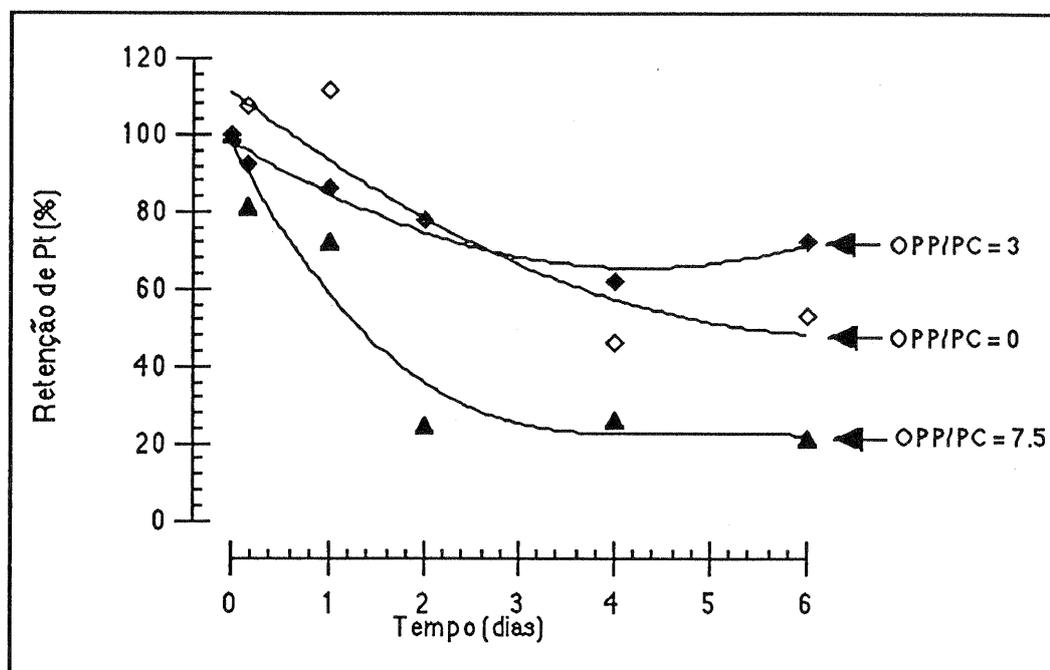


Figura 32: Efeito de diferentes razões ponderais OPP/PC (0, 3 e 7.5) na estabilidade de lipossomas em termos da retenção de platina, em função do tempo e à temperatura de 50°C. Estudo de estabilidade, à temperatura de 50°C e durante 6 dias, de lipossomas unilamelares grandes de fosfatidilcolina de ovo preparados em solução de dextrose 5% a pH entre 6 e 7 e contendo carboplatina 0.027 mM. Foram utilizados lipossomas não revestidos (razão ponderal OPP/PC igual a 0) (—◇—) e lipossomas revestidos nas razões ponderais OPP/PC iguais a 3 (—◆—) e a 7.5 (—▲—). As amostragens e as determinações foram realizadas de acordo com o descrito na secção 2.4.4..

Durante o período de 6 dias em que decorreu o ensaio de estabilidade dos lipossomas revestidos com uma razão ponderal OPP/PC igual a 7.5 avaliaram-se também variações no tamanho dos lipossomas. Como se pode observar a partir do gráfico da figura 33, a razão ponderal OPP/PC igual a 7.5 induz uma variação de tamanho (diminuição), decorridos 6 dias, que é da ordem dos 65%, valor este que é bastante superior às variações que se observaram para os lipossomas não revestidos (diminuição da ordem dos 38%) e dos lipossomas revestidos com a razão ponderal OPP/PC igual 3 (diminuição da ordem dos 8%).

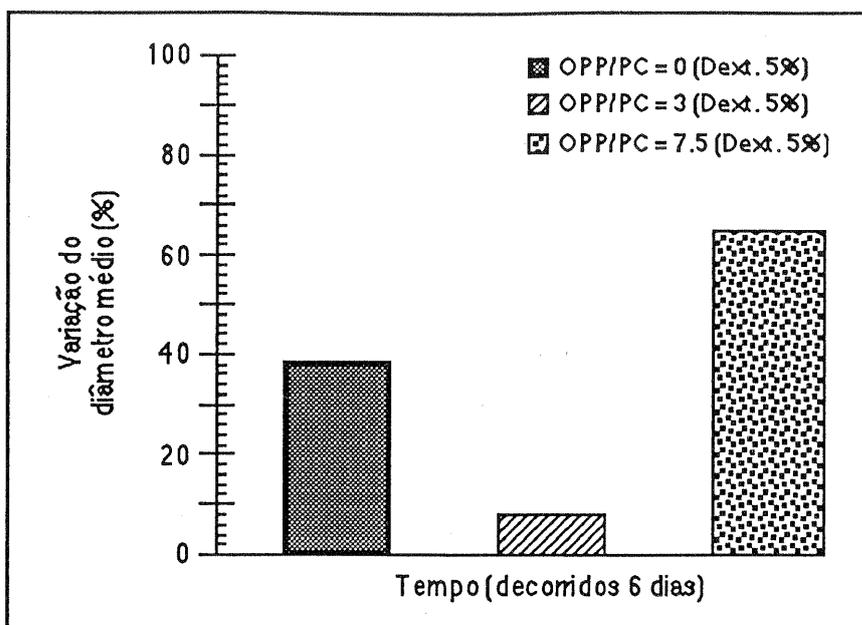


Figura 33: Variação de tamanho de lipossomas contendo carboplatina e revestidos com diferentes razões ponderais OPP/PC (0, 3 e 7.5), decorridos 6 dias e à temperatura de 50°C. Variação de tamanho (diminuição) de lipossomas unilamelares grandes (preparados em meio de dextrose 5%) calculada a partir de valores de tamanho obtidos num aparelho Autosizer II C à temperatura de 20°C, para um ângulo de difracção de 90° e utilizando como fonte de luz incidente um raio laser de neon-hélio, a um valor de comprimento de onda de 633 nm e operando a 5 mW. As amostras analisadas foram recolhidas durante o estudo de estabilidade apresentado na figura 32. Os valores de viscosidade e de índice de refracção utilizados foram, respectivamente, para cada um deles, de 1.1457 cp e 1.340.

Deste estudo verificou-se que a razão ponderal OPP/PC igual a 7.5, além de diminuir a estabilidade dos lipossomas, no sentido em que diminui a capacidade de retenção de platina, determina igualmente variações acentuadas do tamanho.

Ficou deste modo demonstrado que o revestimento dos lipossomas com polissacarídeos, neste caso concreto com o O-palmitoilpululano, pode constituir uma estratégia importante no melhoramento da estabilidade de lipossomas. No entanto, parâmetros como a razão ponderal polissacarídeo/lípido devem ser criteriosamente determinados sob risco de ocorrerem efeitos contrários aos desejados.

CAPÍTULO 4

**CONCLUSÕES
E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

Do trabalho realizado há a destacar os seguintes resultados e conclusões.

Na sequência da reacção de síntese realizada comprovou-se, por espectroscopia de infravermelho, a formação de O-palmitoilpululano através da identificação da ligação éster entre o grupo palmitoilo e o pululano; o grau de substituição foi determinado por espectroscopia de RMN-¹H sendo o valor encontrado de 0.4 resíduos de palmitoilo por 100 unidades de glucose.

Os estudos de permeabilidade membranar preliminares realizados, por recurso ao método fluorimétrico da CF, apontam para uma menor permeabilidade dos lipossomas unilamelares grandes (sinónimo de maior estabilidade) relativamente aos lipossomas unilamelares pequenos. Estes dados indicam que a utilização dos lipossomas unilamelares grandes, além de ser preconizada neste trabalho devido à capacidade de encapsulação de maiores fracções de volume aquoso (em conformidade com as características de hidrossolubilidade do fármaco a encapsular) relativamente aos lipossomas unilamelares pequenos, e para a mesma concentração de lípido (Lasic, 1993 b), tem a vantagem de proporcionar uma maior estabilidade em relação a estes últimos.

Na sequência do estudo anterior, observou-se que o aumento da razão ponderal OPP/PC de 0 a 4 diminui a permeabilidade da membrana lipossomal, tendo-se considerado o valor óptimo da razão igual a 3, atendendo a que implica, em relação à razão OPP/PC igual a 4, um menor gasto de polímero. Estes resultados são qualitativamente semelhantes aos registados por Sato (1990) e Sunamoto *et al.* (1992) com lipossomas unilamelares pequenos e revestidos com um O-palmitoilpululano com um grau de substituição de 1.8%.

Os dados relativos ao efeito do O-palmitoilpululano (na proporção ponderal OPP/PC igual a 3) na fluidez do domínio hidrofóbico da membrana lipossomal, obtidos por determinação do valor de polarização de fluorescência do DPH, são pouco conclusivos. De facto, não se verificou uma tendência de variação marcada daquele parâmetro, apesar de Sato (1990) e de Sunamoto *et al.* (1992) registarem uma ligeira diminuição da fluidez com a

mesma sonda. De referir, no entanto, que o efeito registado por estes autores foi verificado com um O-palmitoilpululano com um grau de substituição de 1.8 e numa razão ponderal OPP/PC igual a 2.

Numa zona mais externa da membrana, o O-palmitoilpululano induz uma diminuição da fluidez, como revelam os valores de polarização de fluorescência do DPH-PA. Este efeito difere do obtido por Sato (1990) e por Sunamoto *et al.* (1992), os quais não registaram qualquer alteração da fluidez. Todavia, a sonda utilizada por estes autores foi o DSHA cujo fluoróforo possui uma localização diferente (região polar das moléculas fosfolipídicas) do fluoróforo do DPH-PA e que portanto, poderá justificar as diferenças de resultados.

Em face do exposto, os dados de fluidez obtidos por determinação da polarização de fluorescência do DPH-PA, a par dos de permeabilidade membranar obtidos com a CF, colocam em evidência o efeito de estabilização da membrana lipossomal pelo O-palmitoilpululano (na razão ponderal OPP/PC igual a 3 e com um grau de substituição de 0.4%), respectivamente, por diminuição da fluidez e por diminuição da permeabilidade membranar.

Uma vez recolhida alguma informação acerca das potencialidades do revestimento em lipossomas unilamelares grandes, procedeu-se aos estudos de caracterização de lipossomas de carboplatina visando a optimização deste sistema.

Os resultados do estudo do efeito da carboplatina na fluidez membranar, realizado por recurso à mesma metodologia referida para o O-palmitoilpululano, indicam não haver qualquer efeito significativo.

Verificou-se também que o teor de NaCl do meio de hidratação dos lipossomas não revestidos tem influência em parâmetros de encapsulação da carboplatina, designadamente, na eficiência de encapsulação e na capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas. Observou-se que ambos os parâmetros apresentam valores máximos para um meio de

hidratação com um teor de NaCl de 0.6%, facto relacionado com o maior tamanho que os lipossomas apresentam neste meio de hidratação relativamente aos outros meios testados.

Os ensaios de estabilidade realizados com lipossomas de carboplatina apontaram para a existência de uma dependência deste parâmetro em função da concentração de NaCl do meio de hidratação. Os resultados obtidos revelaram uma tendência para uma maior estabilidade dos lipossomas de carboplatina (expressa em termos de capacidade de retenção de platina) preparados num meio de hidratação sem iões cloreto (meio de dextrose a 5%) relativamente àqueles preparados em meio de NaCl (nas concentrações de 0.6 e 0.9%).

Estes dados, a par daqueles relativos ao efeito da concentração de NaCl do meio de hidratação na encapsulação do fármaco, poderão indicar que a optimização simultânea dos parâmetros de encapsulação da carboplatina e da estabilidade dos respectivos lipossomas pode ser alcançada através da utilização de um meio de hidratação com uma força iónica semelhante à de uma solução de NaCl 0.6%, mas que não envolva, todavia, a utilização de iões cloreto de forma a preservar a estabilidade dos lipossomas.

Na sequência dos ensaios de estabilidade, os estudos realizados com os lipossomas revestidos preparados em meio de dextrose 5% revelaram que o O-palmitoilpululano, na razão ponderal OPP/PC igual a 3, melhora de forma acentuada a estabilidade dos lipossomas de carboplatina, a qual se reflecte também na menor variação de tamanho dos lipossomas revestidos relativamente aos não revestidos. O melhoramento da estabilidade dos lipossomas de carboplatina em consequência do revestimento é resultado do efeito de estabilização induzido pelo O-palmitoilpululano na membrana lipossomal, nomeadamente, por diminuição da sua permeabilidade (concluído a partir dos dados obtidos com a CF) e da fluidez membranar (verificado a partir dos valores de polarização de fluorescência do DPH-PA).

Do presente trabalho conclui-se também que para certos valores de razão ponderal OPP/PC poderá, provavelmente, ocorrer a inserção de uma quantidade excessiva de grupos

palmitoilo no seio da membrana lipossomal, que determina um aumento da permeabilidade à carboplatina com a consequente diminuição de estabilidade dos lipossomas. Este efeito foi verificado para uma razão ponderal OPP/PC igual a 7.5.

Neste trabalho estudaram-se factores susceptíveis de afectar alguns parâmetros de encapsulação de carboplatina, bem como a estabilidade de lipossomas revestidos e não revestidos.

O estudo destes parâmetros revela-se fundamental quando se pretende o uso terapêutico destes sistemas. Contudo, parece importante dar continuidade a este trabalho, nomeadamente, pela realização de ensaios de estabilidade *in vitro* com lipossomas de carboplatina, revestidos e não revestidos, na presença de fluidos biológicos (como por exemplo, o soro e o plasma), de forma a ter uma ideia prévia acerca dos factores que poderão afectar a integridade destes sistemas *in vivo*.

Ainda com o objectivo de complementar os estudos de caracterização realizados, e tendo em vista a optimização da eficácia terapêutica e uma eventual aplicação industrial dos lipossomas de carboplatina, será importante a análise do efeito do pH e da osmolaridade do meio de hidratação na encapsulação da carboplatina. Interessará também avaliar a influência da variação da razão molar [carboplatina]/[lípidio] inicial (existente no meio de hidratação) na eficiência de encapsulação e na capacidade de ligação da carboplatina aos lipossomas.

No âmbito dos estudos *in vitro*, será ainda conveniente testar a acção citostática do sistema lipossomal perante uma linha celular adequada, de forma a verificar se a actividade da carboplatina é alterada pela sua encapsulação, bem como a sua citotoxicidade.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Moriguchi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. - Self Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles, *Macromolecules*, 26 (1993) 3062-3068.

Allsopp, M.; Sewell, G. J.; Rowland, C. G.; Riley, C. M.; Schowen, R. L. - The Degradation of Carboplatin in Aqueous Solutions Containing Chloride or Other Selected Nucleophiles, *Int. J. Pharm.*, 69 (1991) 197-210.

Andrich, M. P.; Vanderkooi, J. M. - Temperature Dependence of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene Fluorescence in Phospholipid Artificial Membranes, *Biochem.*, 15:6 (1976) 1257-1261.

Antunes-Madeira, M. C.; Almeida, L. M.; Madeira, V. M. C. - DDT-Membrane Interactions Studied with Two Fluorescent Probes, *Pestic. Sci.*, 33 (1991) 347-357.

Antunes-Madeira, M. C.; Madeira, V. M. C. - Membrane Fluidity as Affected by the Insecticide Lindane, *Biochim. Biophys. Acta*, 982 (1989) 161-166.

Aranda, F. J.; Kruijff, B. - Interrelationships Between Tyrocidine and Gramacidin A' in Their Interaction With Phospholipid Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 937 (1988) 195-203.

Arnaud, P. - Complexes. In *Cours de Chimie Physique*. 2^e ed. Paris: Dunod, 1990. p. 446-454.

Au, S.; Weiner, N. D.; Schacht, J - Aminoglycoside Antibiotics Preferentially Increase Permeability in Phosphoinositide-Containing Membranes: A Study With Carboxyfluorescein in Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 902 (1987) 80-86.

Bangham, A. D.; Hill, M. W.; Miller, N. G. A. - Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes. In Korn, E. D. - *Methods in Membrane Biology*. New York: Plenum Press, 1974. Vol. I, p. 1-68.

Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. - Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 238-252.

Barber, T. A. - *Pharmaceutical Particulate Matter: Analysis and Control*. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1993. p. 309-312.

Barenholz, Y; Crommelin, D. J. A. - Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms to Microencapsulation. In Swarbrick, J.; Boylan, J. C. - *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1994. Vol. 9, p. 1-39.

Bartlett, G. R. - Phosphorus Assay in Column Chromatography, *J. Biol. Chem.*, 234:3 (1959) 466-468.

Bender, H.; Wallenfels - Pullulanase (an Amylopectin and Glycogen Debranching Enzyme) from *Aerobacter aerogenes*. In Neufeld, E. F.; Ginsburg, V. - *Methods in Enzymology: Complex Carbohydrates*. New York, London: Academic Press, 1966. Vol. VIII, p. 555-559.

Benita, S.; Poly, P. A.; Puisieux, F.; Delattre, J. - Radiopaque Liposomes: Effect of Formulation Conditions on Encapsulation Efficiency, *J. Pharm. Sci.*, 73:12 (1984) 1751-1755.

Benoit, J. P.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Roblot-Treupel, L. - Les Formes "Vectorisees" ou a "Distribution Modulle", Nouveaux Systemes d'Administration des Medicaments, *J. Pharm. Belg.*, 41:5 (1986) 319-329.

Böttcher, C. J. F.; van Gent, C. M.; Pries, C. - A Rapid and Sensitive Sub-Micro Phosphorus Determination, *Anal. Chim. Acta*, 24 (1961) 203-204.

Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G. G.; Vigevani, A. - Hydrogen Bonding and Conformation of Glucose and Polyglucoses in Dimethylsulphoxide Solution, *Tetrahedron*, 22 (1966) 3061-3083.

Cheung, Y. W.; Cradock, J. C.; Vishnuvajjala, B. R.; Flora, K. P. - Stability of Cisplatin, Iproplatin, Carboplatin and Tetraplatin in Commonly Used Intravenous Solutions, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 44 (1987) 124-130.

Constantino, L. F. V. - Pilotagem de Fármacos, *Boletim SPQ*, 42 (1990) 81-84.

Constantino, L.; Cruz, M. E. M. - Liposomes Containing Rifampicin, *Ciênc. Biol. (Mol. Cell. Biol.)*, 14:1/2 (1989) 1-8.

Couvreur, P.; Fattal, E.; Andremont, A. - Liposomes and Nanoparticles in the Treatment of Intracellular Bacterial Infections, *Pharm. Res.*, 8:9 (1991) 1079-1086.

- Couvreur, P.; Kante, B.; Roland, M.** - Les Perspectives d'Utilisation des Formes Microdispersées Comme Vecteurs Intracellulaires, *Pharm. Acta Helv.*, 53:12 (1978) 341-347.
- Crommelin, D. J. A.; Herron, J. N.; Storm, G.** - Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery. In Lee, V. H. L.; Hashida, M.; Mizushima, Y. - *Trends and Future Perspectives in Peptide Protein Drug Delivery*, Harwood: Academic Press, 1994. p. 207-239.
- Crommelin, D. J. A.; Slats, N.; van Bloois, L.** - Preparation and Characterization of Doxorubicin-Containing Liposomes: I. Influence of Liposome Charge and pH of Hydration Medium on Loading Capacity and Particle Size, *Int. J. Pharm.*, 16 (1983) 79-92.
- Cruz, M. E. M.** - Aplicações Industriais de Lipossomas: Que Perspectivas?, *Futuro*, Ano III, 27 (1989) 40-43.
- Cruz, M. E. M.; Gaspar, M. M.; Lopes, F.; Jorge, J. S.; Perez-Soler, R.** - Liposomal L-Asparaginase: *In Vitro* Evaluation, *Int. J. Pharm.*, 96 (1993) 67-77.
- Davis, S. S.; Illum, L.** - Colloid Carriers and Drug Targeting, *Acta Pharm. Technol.*, 32:1 (1986) 4-9.
- Delattre, J.; Laham, A.; Claperon, N.; Chapat, S.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Rossignol, P.** - Nouvelles Perspectives Offerts par l'Administration de Liposomes d'Adenosine Triphosphate dans l'Ischémie Cérébrale Expérimentale, *S.T.P. PHARMA*, 5:2 (1989) 103-106.
- Dousset, N., Douste-Blazy, L.** - Méthodes de Préparation des Liposomes. In Puisieux, F.; Delattre - *Les Liposomes, Applications Thérapeutiques*. Paris: Technique et Documentation (Lavoisier), 1985. p. 41-72.
- Engel, L. W.; Prendergast, F. G.** - Values for and Significance of Order Parameters and "Cone Angles" of Fluorophore Rotation in Lipid Bilayers, *Biochem.*, 20:26 (1981) 7338-7345.
- Fichtner, I.; Reszka, R.; Schütt, M.; Rudolph, M.; Becker, M.; Lemm, M.; Richter, J.; Berger, I.** - Carboplatin Liposomes as Activators of Hematopoiesis, *Oncol. Res.*, 5:2 (1993) 65-74.

- Freise, J.; Mueller, W. H.; Magerstedt P.; Schmoll, H. J.** - Pharmacokinetics of Liposome Encapsulated Cisplatin in Rats, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 258 (1982) 180-192.
- Garret, J.** - Generalidades. In Garret, J.; Osswald, W. - *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto: Porto Editora, 1986. p. 16.
- Gennis, R. B.** - Membrane Fluidity and the Application of Membrane Probes. In Cantor, C. R. - *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York: Springer Verlag, 1989. p. 176-179.
- Gil, V. M. S.; Geraldés, C. F. G. C.** - *Ressonância Magnética Nuclear*. 1ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. p. 3-35, 81-90.
- Gonçalves, M. L. S. S.** - *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções: Análise Quantitativa*. 1ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983 a. p. 1-12.
- Gonçalves, M. L. S. S.** - *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções: Análise Quantitativa*. 1ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983 b. p. 83-137
- Gregoriadis, G.** - *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques*. 2ª ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1993. Vol. I.
- Gregoriadis, G.** - The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine (First of Two Parts), *New Eng. J. Med.*, 295:14 (1976 a) 704-710.
- Gregoriadis, G.** - The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine (Second of Two Parts), *New Eng. J. Med.*, 295:14 (1976 b) 765-770.
- Gregoriadis, G.; Florence, A. T.** - Liposomes in Drug Delivery: Clinical, Diagnostic and Ophthalmic Potential, *Drugs*, 45:1 (1993) 15-28.
- Huang, C.-H.** - Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics, *Biochem.*, 8:1 (1969) 344-352.
- Ibrahim, A.; Couvreur, P.; Roland, M.; Speiser, P.** - New Magnetic Drug Carrier, *J. Pharm. Pharmacol.*, 35 (1983) 59-61.

Iga, K.; Hamaguchi, N.; Igari, Y.; Ogawa, Y.; Toguchi, H.; Shimamoto, T. - Increased Tumor Cisplatin Levels in Heated Tumors in Mice After Administration of Thermosensitive, Large Unilamellar Vesicles Encapsulating Cisplatin, *J. Pharm. Sci.*, 80:6 (1991) 522-525.

Iwamoto, K.; Sunamoto, J. - Liposomal Membranes. IX. Fluorescence Depolarization Studies on N-Dansylhexadecylamine in Liposomal Bilayers, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54 (1981) 399-403.

Jaminet, F. - Sixièmes Journées Scientifiques de la Pharmacie d'Officine, *J. Pharm. Belg.*, 35:3 (1980) 200-222.

Jones, G. R.; Cossins, A. R. - Physical Methods of Study. In New, R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990. p. 183-220.

Kim, S. - Liposomes as Carriers of Cancer Chemotherapy: Current Status and Future Prospects, *Drugs*, 46:4 (1993) 618-638.

Kirk, D. N.; Hartshorn, M. P.; Phil, D. - *Steroid Reaction Mechanisms*. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company, 1968. p. 26.

Kobayashi, K.; Sumitomo, H.; Ichikawa, H. - Regioselectively Modified Stereoregular Polysaccharides. 8. Synthesis and Functions of Partially 3-O-Octadecylated (1->6)- α -D-Glucopyranans, *Macromolecules*, 19 (1986) 529-535.

Koch, H. - Carboplatin: Novel Platinum Anticancer Drug, *Pharm. Int.*, 7:6 (1986) 133-134.

Lasic, D. - Liposomes: Synthetic Lipid Microspheres Serve as Multipurpose Vehicles for the Delivery of Drugs, Genetic Materials and Cosmetics, *Am. Sci.*, 80 (1992) 20-31.

Lasic, D. D. - *Liposomes from Physics to Applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1993 a. p. 9-42.

Lasic, D. D. - *Liposomes from Physics to Applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1993 b. p. 63-107.

Lelkes, P. I. - Methodological Aspects Dealing With Stability Measurements of Liposomes *In Vitro* Using the Carboxyfluoresceine Assay. In Gregoriadis, G. - *Liposome Technology*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1984. Vol III, p. 225-246.

Lelkes, P. I.; Friedmann, P. - Stabilization of Large Multilamellar Liposomes by Human Serum *In Vitro*, *Biochim. Biophys. Acta*, 775 (1984) 395-401.

Lelkes, P. I.; Tandeter, H. B. - Studies on the Methodology of the Carboxyfluoresceine Assay and the Mechanism of Liposome Stabilization by Red Blood Cells *In Vitro*, *Biochim. Biophys. Acta*, 716 (1982) 410-419.

Li, V. H. K.; Robinson, J. R.; Lee, V. H. L. - Influence of Drug Properties and Routes of Drug Administration on the Design of Sustained and Controlled Release Systems. In Robinson, J. R.; Lee, V. H. L. - *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications*. 2nded. New York: Marcel Dekker, Inc, 1987. p. 4-8.

Losa, C.; Alonso, M. J.; Vila, J. L.; Orallo, F.; Martinez, J.; Saavedra, J. A.; Pastor, J. C. - Reduction of Cardiovascular Side Effects Associated with Ocular Administration of Metipranolol by Inclusion in Polimeric Nanocapsules, *J. Ocul. Pharmacol.*, 8:3 (1992) 191-198.

Magalhães, A. M.; Tomás, T. L. - *Compêndio de Química*. Lisboa: Depositário Livro Franco, 1957. p. 223-224.

Metzler, D. E. - *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. London: Academic Press, 1977. p. 85.

Monteiro, J. G. - Alguns Parâmetros Farmacocinéticos. In Garret, J.; Osswald, W. - *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto: Porto Editora, 1986. p. 48-55.

Morrison, R.; Boyd, R. - *Química Orgânica*, 7^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1973. p.1329-1331.

Müller, R. H. - Characterization of Carriers. In *Colloid Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting - Modification, Characterization and In Vivo Distribution*, Boca Raton, Ann Arbor Boston: CRC Press. 1991. p. 45.

- New, R.R.C. - Introduction. In New, R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990 a. p. 1-32.
- New, R.R.C. - Preparation of Liposomes. In New, R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990 b. p. 33-104.
- New, R.R.C. - Characterization of Liposomes. In New, R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990 c. p. 105-161.
- Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; Papahadjopoulos, D. - Preparation of Liposomes of Defined Size Distribution by Extrusion Through Polycarbonate Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 557 (1979) 9-23.
- Papahadjopoulos, D.; Watkins, J. C. - Phospholipid Model Membranes: II. Permeability Properties of Hydrated Liquid Crystals, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 639-652.
- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. - *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1979. p. 13-15.
- Pharmachemie B. V. - *Carboplatin Composition*. Nijker, A. J.; Vermeer, J. M. P.. European Patent Application 0 401 896 A1. 12 Dec. 1990. 6 p.
- Pinto, O. P. R. - *Estudo da Enzima de Cynara Cardunculus L. por Cromatografia em Gel*. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 1972. Tese de Doutoramento.
- Pita, J. R. - *Farmácia e Medicamento, Noções Gerais*. Coimbra: Livraria Minerva, 1993. p. 58.
- Poznansky, M. J.; Juliano, R. L. - Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review, *Pharmacol. Rev.*, 36:4 (1984) 277-336.
- Puisieux, F. - Les Liposomes: Classification et Obtention, *Labo-Pharma-Problèmes et Techniques*, 281 (1978) 899-904.
- Puisieux, F., Roblot-Treupel, L., Vectorization et Vecteurs de Médicaments, *S.T.P. PHARMA*, 5:2 (1989) 107-113.

Puisieux, F.; Benita, S. - Les Lipossomes: Problèmes Technologiques Posés par leur Utilisation Comme Vecteurs de Substances Médicamenteuses: Encapsulation, Stérilisation, Conservation, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 123 (1984) 111-126.

Reig, F.; Busquets, M. A.; Haro, I.; Rabanal, F.; Alsina, M. A. - Interaction of Opiate Molecules with Lipid Monolayers and Liposomes, *J. Pharm. Sci.*, 81:6 (1992) 546-550.

Roblot-Treupel, L.; Puisieux, F. - Les Nouvelles Formes d'Administration des Médicaments, *L' Mondiale Paris*, 94 (1986) 11-18.

Sato, T. - *Characterization of Polysaccharide-Coated Liposomes and Their Applications*. Nagasaki: Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, 1990. Tese de Doutorado.

Sato, T.; Kojima, K.; Ihda, T.; Sunamoto, J. - Macrophage Activation by Poly(maleicacid-alt-2-cyclohexyl-1,3-dioxap-5-ene) Encapsulated in Polysaccharide-Coated Liposomes, *J. Bioactive Compatible Polym.*, 1 (1986) 448-460.

Sato, T.; Sunamoto, J. - Recent Aspects in the Use of Liposomes in Biotechnology and Medicine, *Prog. Lipid Res.*, 31:4 (1992) 345-372.

Scopes, R. K. - *Protein Purification: Principles and Practice*. New York, Heidelberg, Berlin: Springer Verlag, 1982. p. 151-183.

Sheetz, M. P.; Chan, S. I. - Effect of Sonication on the Structure of Lecithin Bilayers, *Biochem.*, 11:24 (1972) 4573-4581.

Shinitzky, M.; Barenholz, Y. - Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomielin Containing Dicytylphosphate, *J. Biol. Chem.*, 249:8 (1974) 2652-2657.

Shinitzky, M.; Barenholz, Y. - Fluidity Parameters of Lipids Regions Determined by Fluorescence Polarization, *Biochim. Biophys. Acta*, 515 (1978) 367-394.

Shinitzky, M.; Inbar, M. - Difference in Microviscosity Induced by Different Cholesterol Levels in the Surface Membrane Lipid Layer of Normal Lymphocytes and Malignant Lymphoma Cells, *J. Mol. Biol.*, 85 (1974) 603-615.

- Simpkins, H.;** Pearlman, L. F. - Interaction of Two Second Generation Platinum Antitumor Drugs with Mouse Thymocytes, *Cancer Res.*, 46 (1986) 1433-1439.
- Skalko, N.;** Cajkovac, M.; Jalsenjak, I. - Liposomes with Clindamycin Hydrochloride in the Therapy of *Acne vulgaris*, *Int. J. Pharm.*, 85 (1992) 97-101.
- Slavin, M.** - Atomic Absorption Spectroscopy. In Elving, P. J.; Winefordner, J. D. - *Chemical Analysis*. 2^{ed}. New York, Chichester, Brisbane, Toronto: Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1978. Vol 25, p. 125.
- Smith, J. G.;** Walzem, R. L.; German, J. B. - Liposomes as Agents of DNA Transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1154 (1993) 327-340.
- Steenberg, P. A.;** Storm, G.; de Groot, G.; Bergers, J. J.; Claessen, A.; Jong, W. H. - Liposomes as a Drug Carrier System for Cis-diamminedichloroplatinum (II). I. Binding Capacity, Stability and Tumor Cell Growth Inhibition *In Vitro*, *Int. J. Pharm.*, 40 (1987) 51-62.
- Sunamoto, J.;** Iwamoto, K. - Protein-Coated and Polysaccharide-Coated Liposomes as Drug Carriers, *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.*, 2:2 (1986) 117-136.
- Sunamoto, J.;** Iwamoto, K.; Takada, M.; Yuzuriha, T.; Katayama; K. - Improved Drug Delivery to Target Specific Organs Using Liposomes as Coated with Polysaccharides. In Chiellini, E.; Giusti, P. - *Polymers in Medicine: Biomedical and Pharmacological Applications*. New York: Plenum Publishing Co., 1984 a. p. 157-168.
- Sunamoto, J.;** Iwamoto, K.; Takada, M.; Yuzuriha, T.; Katayama, K. - Polymer Coated Liposomes for Drug Delivery to Target Specific Organs. In Anderson, J. M.; Kim, S. W. - *Recent Advances in Drug Delivery Systems*. New York: Plenum Publishing Corporation, 1984 b. p. 153-162.
- Sunamoto, J.;** Sato, T.; Hirota, M.; Fukushima, K.; Hiratani, K.; Hara, K. - A Newly Developed Immunoliposome - an Egg Phosphatidylcholine Liposome Coated with Pullulan Bearing Both a Cholesterol Moiety and an IgMs Fragment, *Biochim. Biophys. Acta*, 898 (1987) 323-330.
- Sunamoto, J.;** Sato, T.; Taguchi, T.; Hamazaki, H. - Naturally Occuring Polysaccharide Derivatives Which Behave as an Artificial Cell Wall on an Artificial Cell Liposome, *Macromolecules*, 25 (1992) 5665-5670.

Szoka, F.; Olson, F.; Heath, T.; Vail, W.; Mayhew, E.; Papahadjopoulos, 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*, 601 (1980) 559-571.

Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. - Procedure for Preparation of Liposomes With Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:9 (1978) 4194-4198.

Takada, M.; Yuzuriha, T.; Katayama, K.; Iwamoto, K.; Sunamoto, J. - Increased Lung Uptake of Liposomes Coated With Polysaccharides, *Biochim. Biophys. Acta*, 802 (1984) 237-244.

Talsma, H. - *Preparation, Characterization and Stabilization of Liposomes*. Utrecht: Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, 1991. Tese de Doutoramento.

Taylor, K. M. G.; Farr, S. J. - Liposomes for Drug Delivery to the Respiratory Tract, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 19:1,2 (1993) 123-142.

Teixeira Dias, J. J. C. - *Espectroscopia Molecular: Fundamentos, Métodos e Aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. p. 14-19.

Trotter, P. J.; Storch, J. - 3-[p-(6-Phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]phenylpropionic acid (PA-DPH): Characterization as a Fluorescent Membrane Probe and Binding to Fatty Acid Binding Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 982 (1989) 131-139.

Veiga, F. J. B. - *Estudo da Cinética de Dissolução In Vitro de Matrizes Hidrófilas: Influência de Alguns Parâmetros Tecnológicos*. Coimbra: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, 1989. Relatório de uma Aula Teórico-Prática Apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para Prestação de Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica.

Veiga, F. J. B. - Medicamentos Orais de Libertação Controlada, Comprimidos Matriciais Hidrófilos, *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, 12:2 (1988) 17-87.

Wagstaff, A. J.; Ward, A.; Benfield, P.; Heel, R. C. - Carboplatin: A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Cancer, *Drugs*, 37 (1989) 162-190.

Weast, R. C. - *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Weast, R. C.. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1980. p. 229-276.

Weiner, N.; Martin, F.; Riaz, M. - Liposomes as Drug Delivery System, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15:10 (1989) 1523-1554.

Weinstein, J. N. Ralston, E.; Leserman, L. D.; Klausner, R. D.; Dragsten, P.; Henkart, P.; Blumenthal, R. - Self-Quenching of Carboxyfluoresceine Fluorescence: Uses in Studying Liposome Stability and Liposome Cell-Interaction. In Gregoriadis, G. - *Liposome Technology*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1984. Vol III, p. 183-204.

Weinstein, J. N.; Yoshikami, S.; Henkart, P.; Blumenthal, R.; Hagins, W. A. - Liposomes-Cell Interaction: Transfer and Intracellular Release of a Trapped Fluorescent Marker, *Science*, 195 (1977) 489-492.

Wenfu, F.; Zhenhuan, Q.; Yiku, Y. - Substitution Kinetics of Carboplatin in Sodium Chloride or Glucose Aqueous Solution. *Guijinshu*, 13:1 (1992) 1-9. Resumo de Chemical Abstracts, 118 (1993), nº 87552 h.

Yasui, T., [et al.] - Antitumor Effect of Liposome-Entrapped Carboplatin After Intraperitoneal Administration in Rats. *Gan To Kagaku Ryoho*, 19:10 (1992) 1753-1755. Resumo de Medline, Silver Platter 3.11, 1992.