

CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI

**ESTUDO DA ESTABILIDADE E PRODUÇÃO  
PILOTO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS  
FURTIVOS DE CISPLATINA**

Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2007

CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI

**ESTUDO DA ESTABILIDADE E PRODUÇÃO  
PILOTO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS  
FURTIVOS DE CISPLATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Cristina de Oliveira

**Co-orientador:** Prof. Dr. Gilson Andrade Ramaldes

Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2007

Dedico este trabalho a minha família,  
as pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais, Jonas e Janir  
Às minhas irmãs, Márcia e Patrícia  
Aos meus irmãos, Jonas e Jardel  
Ao meu cunhado Lucas (*in memoriam*)  
E às minhas sobrinhas Letícia e Luiza.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, agradeço pela minha vida e pela realização deste trabalho.

À minha família, por me apoiar, me aconselhar, me valorizar e por entender minha ausência.

Às minhas amigas de república Danielle, Denise, Paola, Janaína Lübe, Janaína Scaramussa e Grazielle, pela acolhida, enorme amizade e pela convivência.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG, especialmente àqueles do Laboratório de Química Farmacêutica, do Laboratório de Controle de Qualidade e do Laboratório de Radioisótopos.

À Rute, Maria Angélica, Danielle e Paola por me ajudarem no estudo para a seleção do mestrado.

Aos meus amigos do laboratório Álvaro, Elaine, Laís, Talita, Sávia, Berta, Guilherme Diniz, Soninha, José Geraldo, Guilherme Carneiro, Erly, Vanessa, Cristiane Moraes, Délia, Gisele, Martinha, Isabel, Andréa, Daniel, Juliana, Ricardo, Viviane, Laurinha, Diego, Samuel, Érica e Helena, por tudo o que vivenciamos juntos.

Ao Eduardo, técnico responsável do LTF e à Elaine, grande amiga, por toda a colaboração, principalmente pela cumplicidade e pelas horas dispensadas à produção piloto.

Ao Gilson, meu co-orientador, pelo carinho e disponibilidade em sanar minhas dúvidas.

Aos professores, Vildete e Lucas, agradeço por toda contribuição científica.

À minha orientadora, Mônica, por eu ter encontrado nela uma profissional em quem me espelhar, por todo o carinho, acolhida e força doada para a realização e continuação deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Santoro, pela gentileza de disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas (ICB/UFMG) e ao Jamil, pela presteza e disposição em me auxiliar na utilização da ultracentrífuga.

À CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

À FAPEMIG, FINEP e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Cisplatina (CDDP) é um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento de câncer de ovário, testículo, cabeça, pescoço e pulmão. A encapsulação da CDDP em lipossomas é uma alternativa para burlar os efeitos colaterais graves e o desenvolvimento de resistência ao fármaco, que limitam a sua utilização. Contudo, a instabilidade física (agregação/fusão) e química (hidrólise/peroxidação) limitam o uso destes sistemas carreadores como produtos farmacêuticos. O preparo de formas farmacêuticas liofilizadas é uma estratégia empregada para aumentar a estabilidade destas formulações. Além disso, faz-se necessário o desenvolvimento de um processo de produção de lipossomas que seja economicamente viável e reprodutível em larga escala. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o estudo de diferentes parâmetros relacionados à estabilidade química e físico-química de uma formulação de lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina (SpHL-CDDP) assim como estabelecer um processo eficiente para a sua produção em escala piloto. SpHL-CDDP foram produzidos em escala piloto com o emprego de três etapas, a saber: evaporação em fase reversa, homogeneização sob alta pressão e ultrafiltração (REV/HAP/UF). A otimização de parâmetros relacionados a homogeneização sob alta pressão (pressão aplicada e número de ciclos) e ultrafiltração (número de ciclos) foram avaliados nesse processo de produção piloto. A pressão de 500 Bar e número de ciclos igual a 9 foram adotados para a produção de SpHL-CDDP, que apresentaram diâmetro igual a  $99,0 \pm 3,9$  nm e teor de encapsulação de  $12,9 \pm 2,30$  %. Duas substâncias crioprotetoras, sacarose e trealose, foram avaliadas quanto a eficácia sobre o controle do diâmetro das vesículas e retenção do material encapsulado, após o processo de liofilização/rehidratação, sendo a trealose mais eficiente do que a sacarose, mostrando menor aumento do diâmetro das vesículas. A estabilidade de armazenamento de SpHL-CDDP foi avaliada mediante o acompanhamento da variação do diâmetro, potencial zeta e teor de encapsulação. Após 135 dias de armazenamento, os SpHL-CDDP liofilizados e sob a forma líquida não mostraram alteração do diâmetro e potencial zeta das vesículas. Entretanto, os SpHL-CDDP na forma liofilizada mostraram-se mais eficientes quanto a retenção da CDDP encapsulada do que a dispersão lipossomal.

**Palavras-chave:** Cisplatina, Sistema de liberação de fármacos, Lipossomas, Crioprotetores, Escalonamento, Estabilidade

## ABSTRACT

Cisplatin (CDDP) is an antineoplastic drug used for the treatment of ovary, testicle, head, neck and lung carcinoma. The CDDP entrapment into liposomes is an alternative to circumvent severe side effects and the appearance of drug resistance which limit its use. However, the physical (aggregation/fusion) and chemical (hydrolysis/peroxidation) instabilities limit the use of these drug carriers as pharmaceutical products. The preparation of freeze-dried pharmaceuticals is a strategy used to improve the stability of these formulations. Moreover, the development of an economically feasible and reproducible process of liposome production on a large scale becomes necessary. Therefore, the aim of this work was the study of different factors related to the chemical and physico-chemical stability of stealth pH-sensitive liposome containing CDDP (SpHL-CDDP) as well as the establishment of an efficient process for its production in a pilot scale. SpHL-CDDP were produced in a pilot scale using three stages, namely: reverse phase evaporation, homogenization under high pressure and ultrafiltration (REV/HAP/UF). The optimization of factors related to the homonogenization under high pressure (pressure and number of cycles) and ultrafiltration (number of cycles) was evaluated in this process of pilot production. The pressure of 500 Bar and number of cycles equal to 9 were adopted for the production of SpHL-CDDP which presented a mean diameter of  $99.0 \pm 3.9$  nm and encapsulation percentage of  $12.9 \pm 2.30$ . Two cryoprotectants, sucrose and trehalose, were investigated about their effectiveness to control the vesicles diameter and retention of encapsulated CDDP after the freeze-drying/rehydration step. The trehalose showed a higher ability to the formation of smaller vesicles than the sucrose. The long-term storage of SpHL-CDDP was evaluated by the alterations of the diameter, zeta potential and encapsulation of CDDP. After 135 days of storage, freeze-dried or diluted SpHL-CDDP did not show any alteration of the vesicle diameter and zeta potential. However, the freeze-dried SpHL-CDDP were superior on the CDDP retention than the liposomal dispersion.

**Key words:** Cisplatin, Drug delivery systems, Liposome, Cryoprotectants, Scale up, Stability

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos complexos de platina.....	21
Figura 2 – Características estruturais dos lipossomas .....	24
Figura 3 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas .....	25
Figura 4 – Estruturas químicas de CHEMS, DOPE e DSPE-PEG 2000.....	27
Figura 5 – Fases de agregação dos lípides em meio aquoso. ....	28
Figura 6 – Comportamento de fases das membranas lipídicas.....	29
Figura 7 – Equação de Henry utilizada no cálculo do potencial zeta das partículas.....	31
Figura 8 – Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE .....	33
Figura 9 – CDDP e seus produtos de hidrólise.....	34
Figura 10 – Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar .....	36
Figura 11 – Organograma da produção de lipossomas pH-sensíveis furtivos .....	46
Figura 12 – Homogeneizador de alta pressão de estágio único.....	49
Figura 13 – Dispositivo de ultrafiltração Millipore Pellicon XL <sup>®</sup> acoplado a bomba peristáltica.....	49
Figura 14 – Curva de calibração para o doseamento da CDDP obtida pelo método de CLAE .....	55
Figura 15 – Variação do diâmetro das vesículas e do índice de polidispersão de SpHL-CDDP durante um período de 60 dias de armazenamento. ....	70
Figura 16 – Variação do potencial zeta de SpHL-CDDP durante um período de 60 dias de armazenamento.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das áreas dos picos atribuídos à CDDP obtidos pelo emprego de CLAE..	56
Tabela 2 - Teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos pelo método <b>1a</b> .....	58
Tabela 3 - Teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos pelo método <b>1b</b> .....	59
Tabela 4 - Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos segundo método <b>1a</b> após o processo de liofilização .....	60
Tabela 5 - Influência da presença de crioprotetores, presentes na fase interna e externa, sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos segundo método <b>1a</b> após o processo de liofilização .....	60
Tabela 6 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL .....	61
Tabela 7 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 1000 bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL .....	62
Tabela 8 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP .....	63
Tabela 9 - Influência do número de ciclos de ultrafiltração sobre a purificação dos SpHL-CDDP .....	63
Tabela 10 - Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP obtidos pelo método 2 .....	64
Tabela 11 - Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos pelo método 2 .....	65
Tabela 12 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na ausência de crioprotetores.....	67
Tabela 13 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na presença de sacarose .....	68
Tabela 14 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na presença de trealose .....	69
Tabela 15 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP armazenados na forma líquida.....	70

Tabela 16 - Avaliação do teor de liberação de CDDP a partir de SpHL-CDDP após 135 dias de armazenamento .....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AL	antes da liofilização
A/O	água em óleo
CDDP	cisplatina
CHEMS	hemisuccinato de colesterila
CHOL	colesterol
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
dp	desvio padrão
DAD	detector de arranjo de diodos
DL	depois da liofilização
DOPE	dioleilfosfatidiletanolamina
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG <sub>2000</sub>	diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol <sub>2000</sub>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
fc	fator de correção
HEPES	N-[2-hidroxietil] piperazina N'-[2-ácido etanosulfônico]
i.p.	índice de polidispersão
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	intravenoso
kDa	quilodáltons
L.D.	limite de detecção
Lip-Dispersão	lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina sob a forma líquida
Lip-S/ Criop	lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina sem crioprotetores
Lip-Sacarose	lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina com sacarose
Lip-Trealose	lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina com trealose
LUV	lipossomas unilamelares grandes
MLV	lipossomas multilamelares
N.D.	não determinado
p/p	relação peso por peso
p/v	relação peso por volume
PC	fosfatidilcolina
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
PEG	polietilenoglicol
REV	evaporação em fase reversa
SFM	sistema fagocitário mononuclear
SpHL	lipossomas pH-sensíveis furtivos brancos (sem cisplatina)
SpHL-CDDP	lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina
SUV	lipossomas unilamelares pequenos
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de transição de fase
USP	Farmacopéia Americana

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1 Câncer.....	16
2 Tratamento do câncer.....	17
2.1 Cisplatina.....	17
2.1.1 Vias de administração da cisplatina.....	18
2.1.1.1 Administração intravenosa.....	18
2.1.1.2 Administração intraperitoneal.....	18
2.1.2 Inconvenientes da utilização da cisplatina.....	19
2.2 Novas propostas para a quimioterapia dos compostos de platina.....	20
3 Sistemas nanoestruturados para vetorização de fármacos.....	21
4 Cisplatina em sistemas nanoestruturados.....	22
5 Lipossomas.....	24
5.1 Definição.....	24
5.2 Classificação.....	25
5.2.1 Lipossomas unilamelares e multilamelares.....	25
5.2.2 Lipossomas convencionais e furtivos.....	25
5.2.3 Lipossomas pH-sensíveis.....	26
6 Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas.....	28
6.1 Transição de fase dos lípides.....	28
6.2 Diâmetro das vesículas.....	29
6.3 Potencial zeta.....	30
6.4 Teor e eficiência de encapsulação.....	31
7 Estabilidade química e físico-química dos lipossomas e do fármaco encapsulado.....	32
7.1 Estabilidade física.....	32
7.2 Estabilidade química.....	33

7.3 Hidrólise da cisplatina.....	33
8 Liofilização.....	34
9 Crioproteção.....	35
10 Produção em escala piloto.....	38
11 Proposta de estudo da estabilidade e produção em escala piloto de SpHL-CDDP sob a forma liofilizada.....	41
 OBJETIVOS.....	 43
 MATERIAL E MÉTODOS.....	 44
1 Material.....	44
2 Métodos gerais.....	44
3 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP.....	45
3.1 Linearidade.....	45
4 Preparação dos lipossomas pH-sensíveis furtivos de CDDP.....	46
4.1 Método 1 – Preparação de SpHL-CDDP em pequena escala pelo método REV.....	46
4.1.1 Obtenção de uma emulsão A/O.....	46
4.1.2 Obtenção de SpHL-CDDP.....	47
4.1.3 Purificação dos SpHL-CDDP por ultracentrifugação.....	47
4.1.4 Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL-CDDP.....	47
5 Método 2 – Preparação de SpHL-CDDP em escala piloto pelo método REV.....	48
5.1 Avaliação da influência do número de ciclos de homogeneização e da pressão sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL.....	48
5.2 Avaliação do número de ciclos de ultrafiltração necessários para a separação da CDDP não encapsulada.....	49
5.3 Preparação de SpHL-CDDP pelo método de evaporação em fase reversa.....	50
5.3.1 Obtenção de uma emulsão A/O.....	50
5.3.2 Obtenção de SpHL-CDDP.....	51
5.3.3 Purificação dos SpHL-CDDP por ultrafiltração.....	51
6 Preparação das soluções de crioprotetores.....	51
7 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP.....	53
8 Determinação do diâmetro e do potencial zeta dos SpHL e SpHL-CDDP.....	54
9 Liofilização dos SpHL-CDDP.....	54
10 Ressuspensão dos SpHL-CDDP.....	54

11 Estudo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP.....	55
12 Análise estatística.....	55
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
1 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP.....	56
1.1 Linearidade.....	56
2 Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos segundo método 1.....	57
2.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta.....	57
2.1.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a.....	57
2.1.2 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1b.....	57
2.2 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos segundo método 1.....	57
2.2.1 Determinação do teor de encapsulação em SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a.....	57
2.2.2 Determinação do teor de encapsulação e diâmetro em SpHL-CDDP obtidos segundo método 1b.....	58
3 Influência da presença de crioprotetores sobre as características físico-químicas dos SpHL-CDDP liofilizados obtidos pelo método 1.....	59
3.1 Influência dos crioprotetores, presentes somente na fase externa, sobre o diâmetro e potencial zeta das vesículas após a reconstituição do pó dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a.....	59
3.2 Influência dos crioprotetores sobre o diâmetro e potencial zeta das vesículas após a reconstituição do pó dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a, utilizando crioprotetores na fase interna e externa dos lipossomas.....	61
4 Avaliação dos parâmetros de produção dos SpHL segundo método 2 (escala piloto).....	61
4.1 Influência do número de ciclos de homogeneização e da pressão sobre o diâmetro das vesículas de SpHL.....	61
4.2 Avaliação do número de ciclos de ultrafiltração necessários para a separação da CDDP não encapsulada.....	64
5 Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos segundo método 2.....	65
6 Influência da presença de crioprotetores sobre as características físico-químicas dos SpHL-CDDP liofilizados obtidos pelo método 2.....	65
7 Estudo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP.....	66
7.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta de SpHL-CDDP durante o	

armazenamento.....	66
8 Por que a trealose é mais eficiente do que a sacarose no controle do diâmetro dos SpHL-CDDP? .....	73
9 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## INTRODUÇÃO

A CDDP é um dos fármacos mais efetivos e potentes da terapia antitumoral. Essa é utilizada frequentemente como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos (KONDAGUNTA *et al.*, 2005), porém apresenta alguns inconvenientes, tais como: os efeitos adversos graves, o desenvolvimento de resistência ao fármaco, a rápida inativação, além de incompatibilidades farmacotécnicas durante sua administração (MONTI *et al.*, 2005). O desenvolvimento de fármacos análogos e de novas formulações são estratégias atualmente utilizadas para aumentar a eficácia e segurança de utilização da CDDP. Uma forma de reduzir os efeitos colaterais e tóxicos, assim como aumentar o índice terapêutico da CDDP, é a sua encapsulação em lipossomas (VELINOVA *et al.*, 2004).

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos freqüentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas (LASIC, 1998). O extenso interesse no uso de lipossomas como carreadores de fármacos exige procedimentos que atendam aos padrões farmacêuticos quanto à preparação e caracterização das vesículas. Procedimentos tecnológicos aceitáveis devem ser reprodutíveis em larga escala e economicamente viáveis (VEMURI;RHODES, 1995). Além disso, para serem empregados como carreadores de fármacos, também é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável. Esses podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante a estocagem. A estabilidade dos lipossomas sob a forma líquida é reduzida devido aos fenômenos de agregação e/ou fusão e devido ao fato dos fosfolípides, constituintes das vesículas, sofrerem hidrólise e oxidação em meio aquoso. Esses fenômenos de instabilidade das vesículas podem ocasionar a perda do material encapsulado. A liofilização na presença de agentes crioprotetores é uma alternativa à obtenção de um sistema de liberação de fármacos mais estável (CHOW *et al.*, 1995; VEMURI *et al.*, 1995; MOHAMMED *et al.*, 2006).

Assim, nesta dissertação de mestrado, foi realizado o estudo de preparo de SpHL-CDDP sob a forma liofilizada, seguido de avaliação de um processo para a sua produção em escala piloto e do estudo de sua estabilidade química e físico-química .

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 Câncer

O câncer é uma doença que pode acometer diversos órgãos e tecidos de diferentes origens histológicas. Pode se manifestar com diferentes comportamentos biológicos que têm em comum o crescimento desordenado das células do organismo. As características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si variam de acordo com o tipo de célula acometida, sua velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecido e órgãos distantes, originando as metástases. O surgimento do câncer ocorre através da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido a alteração do seu DNA. As causas do câncer são variadas e estão associadas à participação de vírus, à ação de substâncias químicas do meio ambiente ou da alimentação, ou ainda à influência de agentes físicos, tal como a radiação. A célula cancerosa prolifera-se desordenadamente, perde a capacidade de aderência, invade os tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos e espalha-se pelo organismo, estabelecendo-se em locais distantes de sua origem, onde produz os tumores secundários (JUNQUEIRA;CARNEIRO, 2000).

O câncer é a segunda maior causa de morte nos países industrializados depois das doenças cardiovasculares, onde uma em cada quatro pessoas adquire a doença e uma em cada cinco morre (FONTES *et al.*, 2005). É objeto de estudo de vários centros de pesquisa em todo o mundo, sendo o responsável por 12% das mortes, cerca de seis milhões de pessoas a cada ano. Também no Brasil, as neoplasias constituem a segunda maior causa de morte. Além disso, cerca de 500.000 novos casos de câncer são diagnosticados por ano (INCA, 2006).

Os genes que participam na formação de tumores são principalmente os que, nas células normais, estão envolvidos com o controle do ciclo celular, o reparo do DNA danificado ou a apoptose. O ciclo celular é o processo básico de gênese de novas células e compreende os fenômenos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas. A intérfase representa o período compreendido entre duas divisões e ocorre em três fases consecutivas denominadas G1, S e G2: (i) em G1 as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA e de proteínas, com marcante aumento do citoplasma; (ii) no período S a célula duplica o seu conteúdo de DNA e (iii) em G2 ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas que são essenciais para mitose. Tendo passado pelas fases da intérfase, o núcleo entra em processo de divisão ou mitose. O período onde não ocorre a proliferação das células é denominado G0. Não se conhece o mecanismo de ação de

todos os genes supressores de tumores, porém alguns codificam proteínas que mantêm as células em G<sub>0</sub>, portanto fora do ciclo mitótico. Um gene supressor muito estudado é o p53, e aproximadamente 50% de todos os tumores malignos humanos apresentam mutação ou deleção deste gene. O gene p53 normal suprime a formação do câncer através de diversos mecanismos, impedindo que as células com DNA danificado entrem na fase S do ciclo mitótico, até que o DNA seja reparado, ou desencadeado o mecanismo de apoptose da célula danificada (JUNQUEIRA;CARNEIRO, 2000).

Uma característica marcante dos tecidos tumorais é o fato do pH extracelular (pH<sub>e</sub>) ser mais ácido que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular (pH<sub>i</sub>) de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o pH<sub>e</sub> substancialmente reduzido no tumor quando comparado com o tecido normal, promove um gradiente de pH celular diferente nestes dois tecidos. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar o baixo pH<sub>e</sub> nos tecidos tumorais é o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da célula cancerosa (STUBBS *et al.*, 1999).

## 2 Tratamento do câncer

Existem três principais tipos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, nos casos em que não apresentam metástase. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficácia do tratamento. Entretanto, na ocorrência de metástase, faz-se necessária uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70 % dos casos, com a quimioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

### 2.1 Cisplatina

A cis-diaminodicloroplatina (II) (CDDP) é um complexo inorgânico divalente hidrossolúvel que contém platina. CDDP e outros fármacos relacionados, como a carboplatina, formam fortes intermediários eletrofílicos que atuam via substituição nucleofílica na formação de ligações cruzadas no DNA (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003). O mecanismo de ação da CDDP envolve a entrada na célula, onde o íon cloreto se dissocia e

gera um complexo que reage com a água. A substituição do cloreto por água fornece uma molécula carregada positivamente, a espécie ativada da droga, a qual, a seguir, reage com ácidos nucleicos, formando ligações cruzadas intrafilamentares, provavelmente entre N7 e O6 das moléculas de guaninas adjacentes, o que resulta em uma desnaturação local da cadeia do DNA (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003).

Considerado um dos fármacos mais efetivos e potentes na terapia antitumoral, a CDDP é freqüentemente utilizada como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (KONDAGUNTA *et al.*, 2005; MUGGIA;FOJO, 2004; SHIRAZI *et al.*, 1996; LE CHEVALIER *et al.*, 1994; GUILLOT *et al.*, 1992).

## **2.1.1 Vias de administração da CDDP**

### **2.1.1.1 Administração intravenosa**

A CDDP é geralmente administrada por via intravenosa (IV) e é disponibilizada comercialmente como solução injetável na concentração de 1 mg/mL. Os esquemas típicos de administração intravenosa de CDDP, como agente único a adultos ou crianças, são: 50-100 mg/m<sup>2</sup> como infusão IV a cada 3 ou 4 semanas; ou infusão IV de 15-20 mg/m<sup>2</sup> por dia durante 5 dias consecutivos, a ser repetido a cada 3 ou 4 semanas (MARTINDALE, 2005).

### **2.1.1.2 Administração intraperitoneal**

A CDDP também tem sido administrada por via intraperitoneal com a finalidade de se atingir níveis tumorocidas do fármaco localmente, ao mesmo tempo em que os efeitos colaterais sistêmicos são minimizados (TAMURA *et al.*, 2002). Grande parte dos estudos da eficácia da administração intraperitoneal têm administrado agentes quimioterápicos para o tratamento da carcinomatose peritoneal e do câncer ovariano. Como 50 % dos pacientes com doenças malignas gastrointestinais e ginecológicas, apresentam carcinomatose peritoneal logo após cirurgia local, há um grande interesse em utilizar essa “nova” via de administração (PHILLIPS *et al.*, 2002). A razão para a terapia intraperitoneal em câncer ovariano é porque o peritônio recebe exposição sustentada a altas concentrações dos agentes antitumorais enquanto tecidos saudáveis, como a medula óssea, são relativamente poupados (ARMSTRONG

*et al.*, 2006).

Hrinbaschek e colaboradores (2001) relataram que a administração intraperitoneal de CDDP e mitomicina evitou a carcinomatose peritoneal em modelo animal (ratos). Armstrong e colaboradores (2006) conduziram um estudo no qual foi realizada a administração loco-regional de CDDP na cavidade abdominal de pacientes com carcinoma ovariano estágio III ou carcinomatose peritoneal primária, que levou a uma redução de 25% de mortalidade se comparada à administração intravenosa. Embora grande parte dos fármacos administrados por essa via sejam rapidamente depurados do fluido peritoneal, essa forma de administração pode atingir picos de concentrações mais elevadas nesse fluido quando comparadas com o mesmo fármaco administrado por via intravenosa (PHILLIPS *et al.*, 2002). Goel e colaboradores (1989) demonstraram que a administração de CDDP por via intraperitoneal resultou em uma concentração de 12 a 15 vezes maior na cavidade peritoneal que a concentração plasmática.

A maioria dos fármacos antitumorais são moléculas hidrossolúveis pequenas, como a CDDP, que são absorvidas rapidamente através dos capilares e atingem a circulação sanguínea. Isto dificulta a manutenção de uma concentração adequada do fármaco na cavidade intraperitoneal por longos períodos. Como as partículas corpusculares são absorvidas lentamente pelo sistema linfático sem serem absorvidas pelos capilares, ficando retidas na cavidade peritoneal, a profilaxia da carcinomatose peritoneal é uma aplicação potencial dos lipossomas contendo agentes antitumorais (KUMAGAI *et al.*, 1996).

### **2.1.2 Inconvenientes da utilização da CDDP**

A CDDP apresenta como inconvenientes da sua utilização: os efeitos adversos graves, o desenvolvimento de resistência ao fármaco e sua rápida inativação devido a complexação com o plasma e proteínas teciduais, além de incompatibilidades farmacotécnicas durante sua administração. Os efeitos tóxicos deste fármaco, em animais e humanos, incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e mielosupressão. Contudo seu principal efeito adverso dose-limitante é a nefrotoxicidade (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003). Os efeitos nefrotóxicos da CDDP são cumulativos e aumentam com a dose e duração do tratamento (MARTINDALE, 2005).

A resistência à CDDP parece envolver uma combinação de mecanismos incluindo diminuição do transporte do fármaco, aumento da detoxificação celular devido a glutathione e metalotioneínas, e aumento na capacidade de reparo celular, bem como alterações nas vias de

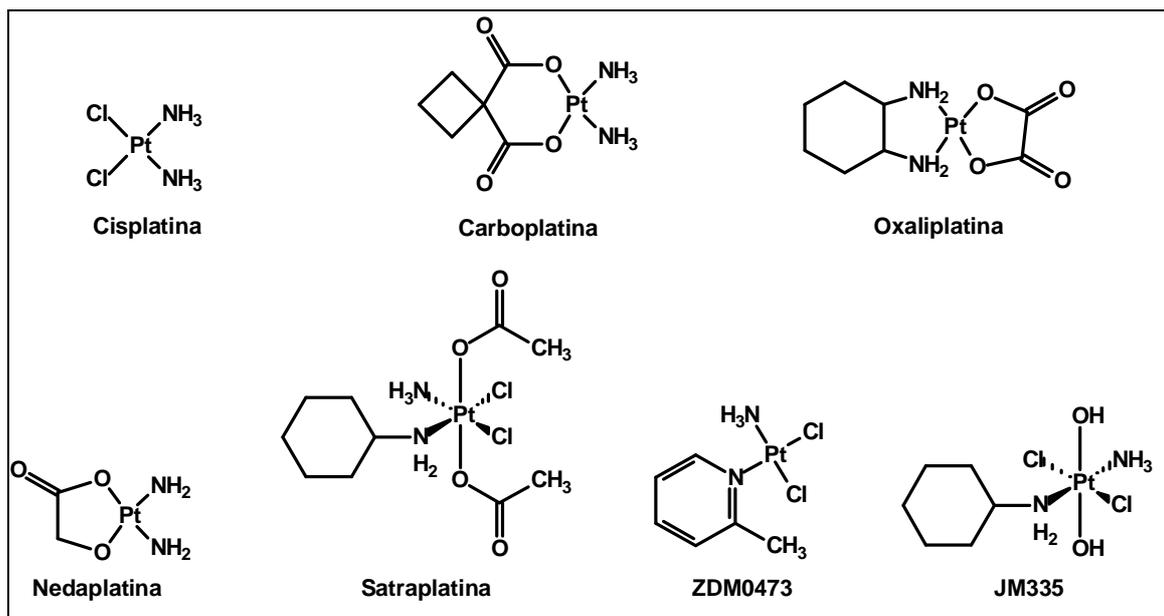
apoptose celular (MONTI *et al.*, 2005). Como exemplos de incompatibilidades da CDDP com outros fármacos ou constituintes da formulação podemos citar: (i) sua precipitação em presença de etoposídeo dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,9 %; (ii) precipitação em presença de tiotepa dissolvida em solução de glicose a 5 % e (iii) degradação da CDDP decorrente de sua interação com trometamol, um excipiente utilizado na formulação de 5-Fluouracila (TRISSEL *et al.*, 1996; FOURNIER *et al.*, 1992).

Existem duas estratégias para aumentar a segurança da utilização deste fármaco: 1) o desenvolvimento de fármacos análogos, como a carboplatina e a oxaliplatina e 2) o desenvolvimento de formulações alvo-específicas.

## 2.2 Novas propostas para a quimioterapia dos compostos de platina

Após a introdução da CDDP e demonstração de sua importância no tratamento de câncer ovariano e testicular, houve a necessidade do desenvolvimento de análogos menos tóxicos. CDDP se tornou o protótipo de uma classe de agentes antineoplásicos, muitos dos quais foram abandonados em estudos pré-clínicos ou em estágios clínicos de desenvolvimento, enquanto poucos foram inseridos na rotina clínica (JAKUPEC *et al.*, 2003). Estudos anteriores levaram ao desenvolvimento dos análogos, carboplatina, oxaliplatina e satraplatina, o primeiro complexo de coordenação da platina administrado por via oral, representados na Figura 1. Nos estudos mais recentes, o principal foco é o desenvolvimento de complexos que superem os principais mecanismos de resistência do tumor à CDDP, denominados *cis*-aminodicloro(2-metilpiridina)platina(II) (ZD0473) e *trans*-amino(diclorociclohexilamina)dihidroxiplatina (IV) (JM335).

A carboplatina [*cis*-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina II] é menos tóxica aos rins e sistema nervoso, e causa menos náusea e vômito do que a CDDP. Entretanto, efeitos adversos hematológicos são mais frequentes com a utilização da carboplatina (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003). Outro fármaco de segunda geração, a nedaplatina (*cis*-diaminoglicolato)platina II), desenvolvida e utilizada no Japão, apresenta propriedades toxicológicas melhores que a CDDP. A mielosupressão é dose-limitante e toxicidades não-hematológicas são geralmente leves (JAKUPEC *et al.*, 2003).



**Figura 1 – Estrutura química dos complexos de platina.**

A ocorrência de resistência cruzada entre a CDDP, carboplatina e nedaplatina torna os dois últimos fármacos inefetivos no tratamento de pacientes que não responderam ao tratamento prévio com CDDP.

Oxaliplatina apresenta como efeitos colaterais a neurotoxicidade, toxicidade hematológica e gastrointestinal. Possui vasto efeito antitumoricida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, melhor perfil de segurança que a CDDP e ausência de resistência cruzada à CDDP e carboplatina. Sua ação antineoplásica é otimizada quando administrada em combinação com outros agentes como o 5-fluorouracil e gencitabina (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003).

### 3 Sistemas nanoestruturados para vetorização de fármacos

A associação de fármacos já em uso a um sistema transportador, visando direcionar o fármaco para a célula alvo e evitar os locais indesejáveis onde o fármaco exerce toxicidade, oferece um ganho de tempo na fase de desenvolvimento de um produto porque usa um fármaco já caracterizado do ponto de vista farmacológico (FRÉZARD *et al.*, 2005). O direcionamento de fármacos por meio de sistemas carreadores tem sido amplamente estudado. A nanotecnologia, uma área do conhecimento científico de caráter multidisciplinar, que envolve a criação e utilização de materiais, instrumentos e sistemas em uma escala

nanométrica, está associada à tecnologia farmacêutica no desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos.

#### 4 CDDP em sistemas nanoestruturados

Inúmeras pesquisas científicas têm utilizado nanossistemas para a veiculação da CDDP, entre as quais são destacadas as nanopartículas (XU *et al.*, 2006); microesferas (KUMAGAI *et al.*, 1996), nanocápsulas (VELINOVA *et al.*, 2004, BURGER *et al.*, 2002), micelas poliméricas (NISHIYAMA *et al.*, 2003) e lipossomas (STATHOPOULOS *et al.*, 2006; RAMACHANDRAN, 2006; JÚNIOR *et al.*, 2007a,b).

Microesferas constituídas de copolímeros de ácido lático-ácido glicólico foram desenvolvidas para a encapsulação de CDDP (CDDP-PLGA), apresentando diâmetro de aproximadamente 100 µm e teor de encapsulação de 5 % (KUMAGAI *et al.*, 1996). CDDP-PLGA foram administradas por via intraperitoneal em ratas com carcinomatose peritoneal e mostraram ser mais efetivas quanto a sobrevida dos animais do que a solução de CDDP. Além disso, a preparação liberou o fármaco lentamente por um longo período na cavidade peritoneal.

Xu e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas de CDDP constituídas de caprolactona/polietilenoglicol ou caprolactona/polimetacrilato, com eficiência de encapsulação de aproximadamente 90 %. Estas nanopartículas foram testadas em células de adenocarcinoma de ovário SKOV-3, as quais são células resistentes à CDDP, dentre outros fármacos. As nanopartículas de CDDP foram capazes de ser internalizadas pelas células e mostraram uma elevada eficácia antitumoral.

Burger e colaboradores (2002) desenvolveram um sistema lipossomal de CDDP, constituído por razões equimolares de dioleilfosfatidilserina e dioleilfosfatidilcolina, e produzido por hidratação do filme lipídico seguida de congelamento-descongelamento. A citotoxicidade dos lipossomas de CDDP foi aproximadamente 1000 vezes maior do que a CDDP livre e nesta formulação, o fármaco apresenta-se sob a forma de agregados.

Micelas poliméricas constituídas por polietilenoglicol-ácido poliglutâmico e CDDP foram investigadas quanto a capacidade de constituírem um sistema de liberação de fármacos tumor-específico. A concentração de CDDP nas micelas foi de 39 %. As micelas contendo CDDP apresentaram elevada estabilidade em água, mesmo em soluções muito diluídas. Entretanto, em soluções ricas em íons cloreto, estas se dissociam acompanhadas de liberação da CDDP (NISHIYAMA *et al.*, 2003).

Uma formulação de lipossomas de CDDP, Lipoplatin®, foi desenvolvida com a finalidade de reduzir a toxicidade sistêmica da CDDP e direcioná-la aos sítios tumorais. Essa formulação é constituída por dipalmitoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, colesterol e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000, com diâmetro vesicular médio de 110 nm. Lipoplatin® é menos tóxica que a CDDP livre em ratos. Lipoplatin® 3 mg/mL (concentração referente à CDDP) deve ser armazenada ao abrigo da luz, devido a fotossensibilidade (BOULIKAS, 2004). Estudos clínicos de fase I-II, associaram gencitabina com CDDP lipossomal, para avaliação de eficácia e toxicidade, em pacientes refratários a tratamentos anteriores utilizando somente gencitabina. O avanço detectado foi a menor toxicidade observada, atribuída ao uso de Lipoplatin® (STATHOPOULOS *et al.*, 2006).

Outra formulação de CDDP lipossomal, denominada SPI-077, foi delineada a fim “direcionar a CDDP” às células tumorais através do retardo da excreção renal e aumento do tempo de circulação, para reduzir a toxicidade ocasionada pela CDDP na sua forma livre (não-encapsulada) e evitar os procedimentos profiláticos como hidratação e utilização de anti-eméticos. Entretanto, reações graves de hipersensibilidade aos componentes da formulação fizeram necessária a profilaxia com corticosteróides e anti-histamínicos. (JAKUPEC *et al.*, 2003). Resultados dos estudos pré-clínicos são conflitantes já que enquanto um estudo indica que SPI-077 exibiu atividade superior à CDDP livre em modelos tumorais de camundongos (NEWMAN *et al.*, 1999), outro sugere que a CDDP não é liberada a partir dos lipossomas de maneira suficiente (ZAMBONI *et al.*, 2000 apud JAKUPEC *et al.*, 2003).

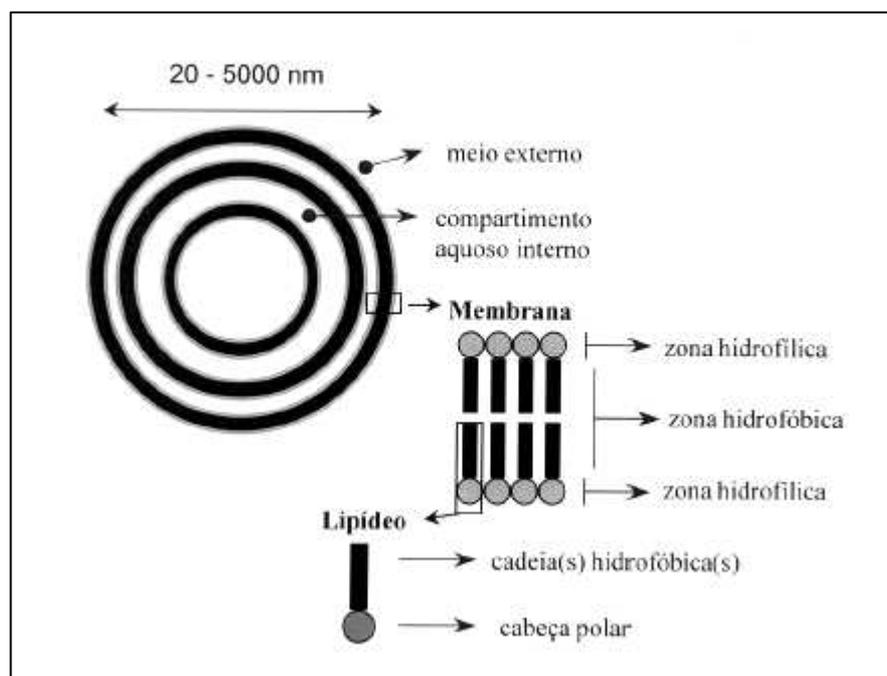
Estudos realizados por Júnior e colaboradores (2007a) demonstraram que os SpHL-CDDP apresentam uma maior atividade citotóxica sobre a linhagem celular A549 (células cancerosas de pulmão humano) do que a CDDP livre. Além disso, essa formulação exibiu a mesma eficiência em células sensíveis e em células resistentes à CDDP, o que sugere que essa pode burlar os mecanismos de resistência oferecidos pelas células à penetração do fármaco.

Estudos de difração de raios-X foram efetuados em amostras de lipossomas de CDDP estericamente estabilizados SPI-077 sob as formas líquida, congelada e liofilizada. As moléculas de CDDP encapsuladas mantiveram-se quimicamente estáveis e não sofreram hidrólise. Os dados obtidos mostraram ainda que a CDDP formou uma solução supersaturada. As amostras congeladas e/ou liofilizadas foram similares às amostras no estado líquido, demonstrando que nem o congelamento nem a liofilização induzem à cristalização do fármaco (ARCON *et al.*, 2004).

## 5 Lipossomas

### 5.1 Definição

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso (Figura 2). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípides. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar. Esses sistemas lipídicos foram descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas. A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70. Entretanto, as primeiras formulações de lipossomas estudadas não produziram os resultados esperados, devido à instabilidade das vesículas, à baixa taxa de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração (LASIC, 1998).



**Figura 2 – Características estruturais dos lipossomas (Adaptado de FRÉZARD *et al*, 2005).**

## 5.2 Classificação

As propriedades químicas e físico-químicas dos lipossomas variam de acordo com sua composição lipídica, diâmetro vesicular, lamelaridade, carga superficial e método de preparação.

### 5.2.1 Lipossomas unilamelares e multilamelares

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV) e (iii) vesículas multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares, formadas por uma bicamada única, são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-50 nm e em LUV, quando são maiores que 100 nm (Figura 3). Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro compreendido entre 100-1000 nm (NEW, 1990; SAHOO, 2003).

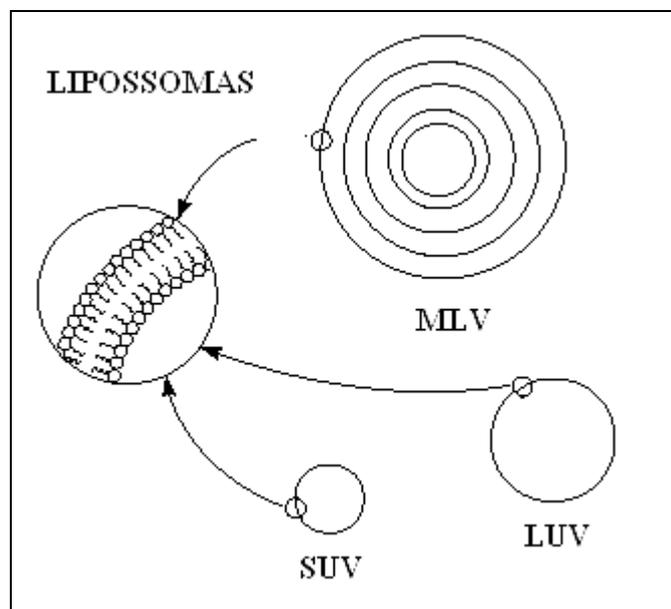


Figura 3 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).

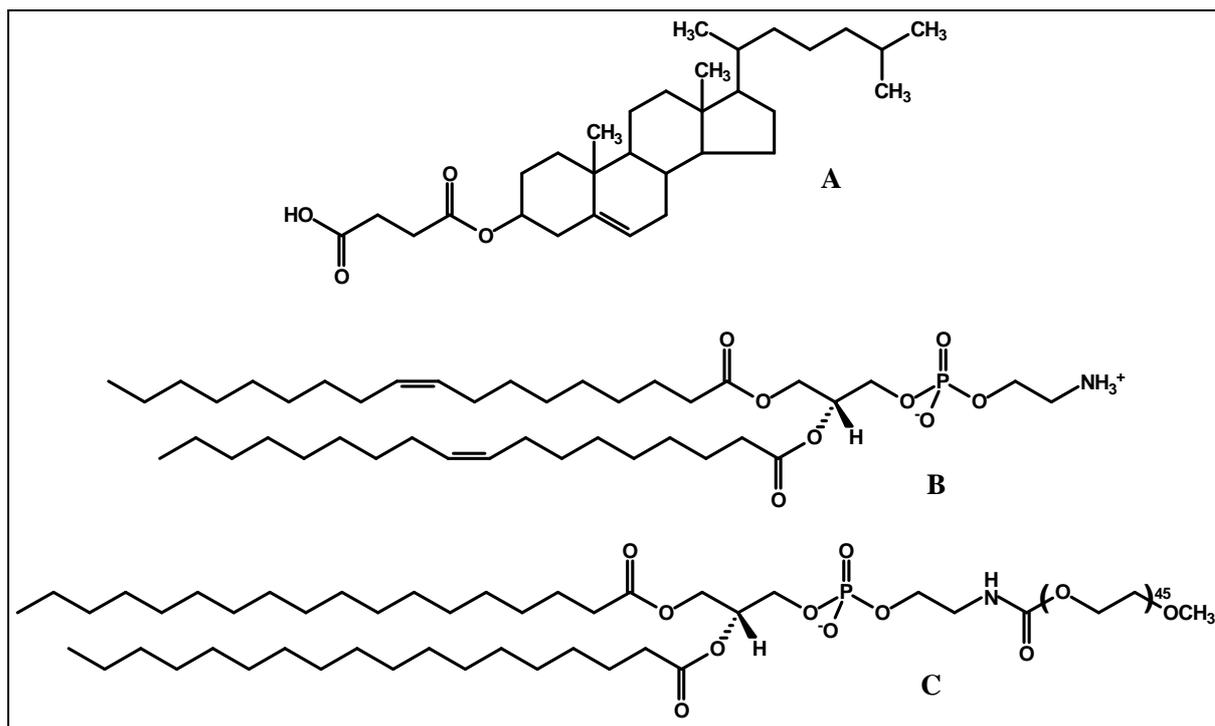
### 5.2.2 Lipossomas convencionais e furtivos

Os lipossomas convencionais, quando administrados por via endovenosa, sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo no fígado, baço e medula óssea. Foi observado que a incorporação, na membrana dos lipossomas, de lipídeos acoplados a polímeros de etilenoglicol (PEGs), altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante o impedimento da captura pelos macrófagos e a prolongação de sua presença na corrente sanguínea. Esses lipossomas, denominados lipossomas furtivos, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daquele do SFM (FONTES *et al.*, 2005). Concentrações de 5-10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de massa molecular 1000-2000 Da conferem excelente estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

Antes do advento das formulações com polímeros hidrofílicos acoplados aos fosfolípidos, foram utilizados lipossomas pequenos, com membrana rígida e neutros, como tentativas de redução da ação do SFM sobre os lipossomas. Entretanto, esse tipo de lipossoma têm sérias desvantagens como sistema de liberação de fármacos, que incluem: pequeno volume interno de encapsulação, aumento do diâmetro das vesículas durante armazenamento, poucas substâncias disponíveis para esse tipo de formulação e perfil farmacocinético dose-dependente (PAPAHADJOPOULOS;GABIZON, 1995).

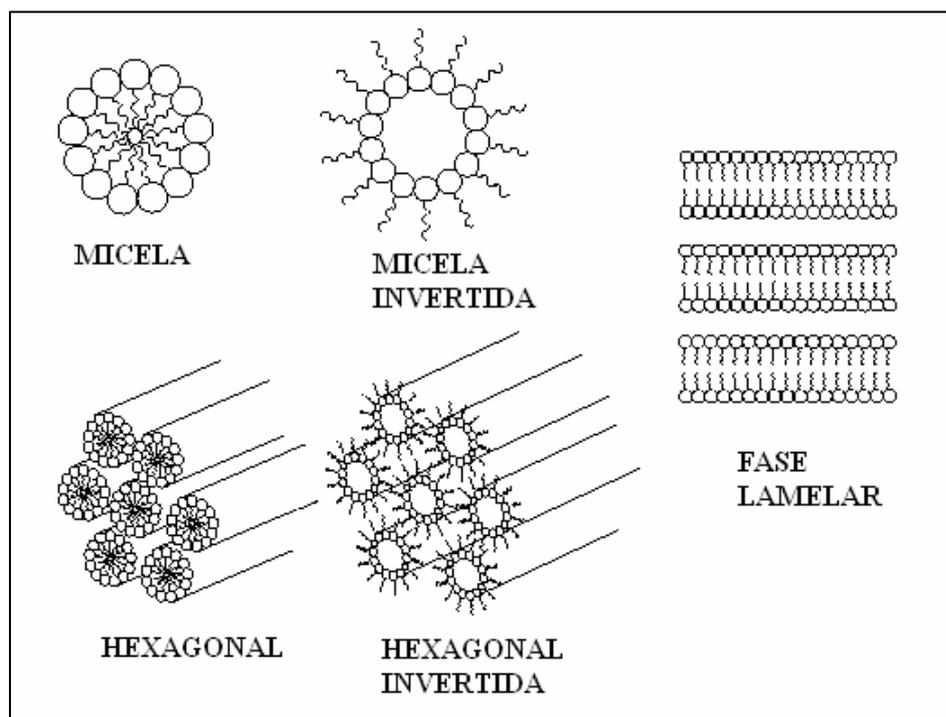
### **5.2.3 Lipossomas pH-sensíveis**

O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos enfermos (tumores, metástases, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967), além do fato de que alguns tipos de vírus desenvolveram estratégias para aproveitar-se da acidificação do meio do lúmen endossomal para infectar células (SIMÕES *et al.*, 2004). Esses lipossomas exibem transições de fases, características dos seus constituintes fosfolipídicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido e são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4).



**Figura 4 – Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-PEG<sub>2000</sub> (C).**

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, a temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas (SIEGEL, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada (Figura 4). Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar (Figura 5), possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000).



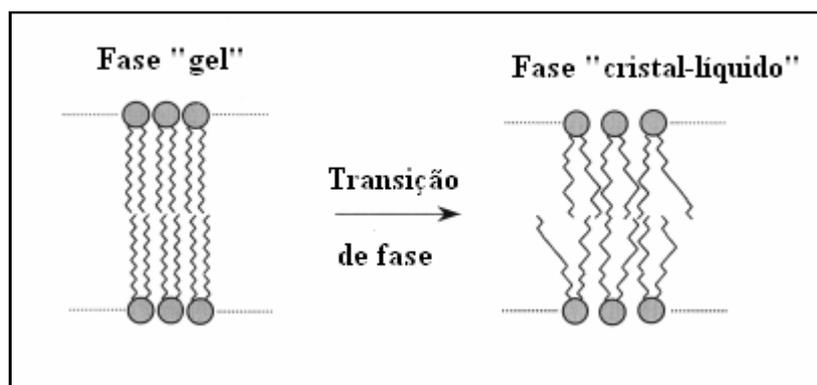
**Figura 5 – Fases de agregação dos lípides em meio aquoso (Adaptado de LASIC, 1998).**

## 6 Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas

As propriedades e aplicações dos lipossomas dependem das características físicas e físico-químicas de suas membranas.

### 6.1 Transição de fase dos lipídes

A fluidez da bicamada, quando constituída de um único tipo de lípide, depende da temperatura de transição de fase do estado gel (sólido) para o estado líquido-cristalino (fluido) ( $T_m$ ) (Figura 6). Quando a temperatura do meio é igual a  $T_m$ , as cadeias carbônicas dos lípídes passam do estado ordenado (sólido) para o estado fluido no qual as cadeias carbônicas encontram-se desordenadas e têm grande liberdade de movimento. Portanto, de acordo com a  $T_m$ , as membranas lipossomais de diferentes composições podem exibir diferentes níveis de fluidez sob as mesmas condições de temperatura. A permeabilidade da bicamada depende da fluidez da membrana e da natureza do soluto encapsulado. A taxa de permeabilidade mais elevada ocorre na  $T_m$  e é menor no estado “gel” em comparação com o estado fluido (FRÉZARD *et al.*, 1999).



**Figura 6 - Comportamento de fases das membranas lipídicas (Adaptado de FRÉZARD *et al.*, 2005).**

Um componente lipídico importante, muito utilizado na composição dos lipossomas, é o colesterol. Este aumenta a rigidez das membranas no estado “cristal-líquido” e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel”.

## 6.2 Diâmetro das vesículas

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para garantia da estabilidade dessa forma farmacêutica. Muitos estudos utilizam lipossomas unilamelares homogêneos com diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm. Essa faixa é um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro), a estabilidade do lipossoma (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200 nm) e capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro) (LASIC, 1998).

No presente trabalho, foi estudada uma formulação farmacêutica destinada à administração parenteral. A Farmacopéia americana 29<sup>a</sup> edição (USP 29), classifica as emulsões injetáveis lipídicas de acordo com o diâmetro médio vesicular (DMV) e inclui os lipossomas na classe das microemulsões, isto é, formulações lipídicas cujo DMV seja menor que 0,1  $\mu\text{m}$ . Os limites farmacopéicos para a garantia da estabilidade de armazenamento destas formulações preconizam que estas apresentem pH entre 6-9, DMV menor ou igual a 500 nm, concentração de ácidos graxos livres menor que 0,07 mEq/g e que a concentração percentual peso/volume de glóbulos maiores que 5  $\mu\text{m}$  seja menor que 0,05 % do total da fase dispersa (DRISCOLL, 2006). Como os capilares sanguíneos possuem diâmetro interno

entre 4 e 9  $\mu\text{m}$ , o limite de 5  $\mu\text{m}$  apresenta relevância fisiológica, por ser um preventivo da oclusão da microvasculatura.

São utilizadas diferentes técnicas para análise do diâmetro e distribuição dos lipossomas. Dentre estas estão compreendidas técnicas de espalhamento da luz (BERGER, N. *et al.*, 2001; CASALS *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006) e microscopia, como microscopia de criofratura (BERGER *et al.*, 2001) e microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). Neste trabalho foi empregada a técnica denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento dinâmico da luz (*Quasielastic Light Scattering*) na análise do diâmetro das vesículas lipossomais.

A técnica de PCS consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes espalhem a luz. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento browniano das partículas de modo que a intensidade da luz espalhada por estas forme um padrão de movimento. Por meio da dispersão da luz, torna-se possível determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de movimentarem mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (HASKELL *et al.*, 1998). Esta técnica permite a medida de partículas cujos diâmetros estejam compreendidos na faixa de 1 a 5000 nm (MALVERN INSTRUMENTS, 1996a).

### 6.3 Potencial zeta

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a estabilidade dos colóides (CASALS *et al.*, 2003).

O potencial zeta pode ser definido como a carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Para a determinação do potencial zeta dos lipossomas foi utilizado um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força

conhecida através da amostra. Neste método, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências. As frequências são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas. Através da aplicação da equação de Henry (Figura 7) pode-se então determinar o potencial zeta das partículas. Nesta equação, a função de Henry,  $f(Ka)$ , pode ser representada pela aproximação de Huckel, igual a 1, quando o diâmetro da partícula é muito menor que a espessura da dupla camada de cargas ao redor da partícula. Utiliza-se a aproximação de Smoluchowsky, igual a 1,5, quando o diâmetro da partícula é maior que a espessura da dupla camada de cargas (MALVERN INSTRUMENTS, 1996b).

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta}$$

na qual,  $U_e$  é a mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica da amostra,  $\zeta$  é o potencial zeta,  $f(Ka)$  é a função de Henry e  $\eta$  é a viscosidade do solvente.

**Figura 7 – Equação de Henry utilizada no cálculo do potencial zeta das partículas.**

#### 6.4 Teor e eficiência de encapsulação

O teor e a eficiência de encapsulação de uma substância em lipossomas são dois parâmetros importantes que devem ser considerados na escolha do método de preparação, sobretudo quando se procura desenvolver uma composição farmacêutica. Esses parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana. É importante a obtenção de altas taxas de encapsulação, particularmente quando o fármaco possui doses elevadas ou quando não é possível o reaproveitamento do fármaco não-encapsulado. A relação fármaco/lípide também deverá ser maximizada, visto que determina a quantidade de lipíde a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lipíde veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (FRÉZARD *et al.*, 2005; SWARBRICK;BOYLAN, 1994).

## 7 Estabilidade química e físico-química dos lipossomas e do fármaco encapsulado

Para funcionar efetivamente como um vetor de fármacos, é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável. Esses podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante a estocagem. As mudanças físicas podem ocorrer nas vesículas fosfolípídicas, incluindo agregação e fusão. Já as mudanças químicas incluem hidrólise das ligações éster dos fosfolípides em dispersões aquosas de lipossomas e oxidação dos fosfolípides que contêm ácidos graxos insaturados, bem como a oxidação do colesterol. Todas essas transformações podem causar a perda do material encapsulado (CHOW *et al.*, 1995). As instabilidades físicas também podem ser provocadas durante as transições de fase dos lípides; entretanto, a inclusão de colesterol ou derivados nas bicamadas podem reduzir ou erradicar esses fenômenos de transição (McMULLEN *et al.*, 1993).

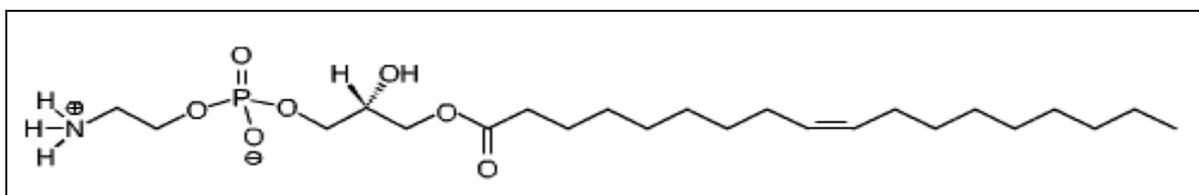
### 7.1 Estabilidade física

A estabilidade física de lipossomas pode ser entendida como um tipo de estabilidade coloidal. Um dos aspectos mais importantes dessa estabilidade é a mudança do tamanho das partículas e de sua distribuição. As mudanças no sistema coloidal podem ocorrer principalmente por dois mecanismos: (i) a nível molecular, pela troca molecular assimétrica (conhecido como maturação de Ostwald), (ii) a nível de partículas ocorre na maioria das vezes agregação, fusão, coacervação ou flutuação/precipitação. No caso de lipossomas, agregação e fusão são as principais fontes de instabilidade. Agregação de lipossomas neutros é causada por interações de Van der Waals, e tende a ser mais pronunciada em vesículas grandes. Embora fatores como resíduos de solventes e traços de elementos possam potencializar esse processo, a formação de agregados de lipossomas é um fenômeno natural e inevitável para membranas sem carga. A maneira mais simples de contornar essa situação é utilizar lípides carregados na formulação (NEW, 1990). Casals e colaboradores (2003) afirmam que a presença de 25 % de lípides carregados confere uma suficiente estabilidade eletrostática que evita a agregação e fusão de vesículas por um período de 3 meses, a 4° C. Outra forma de aumentar a estabilidade dos lipossomas é revesti-los com polímeros hidrofílicos não-iônicos, como PEG, o que leva ao aparecimento da repulsão de hidratação caracterizada pela presença de uma barreira estérica que impede a aproximação das vesículas (ULRICH, 2002).

## 7.2 Estabilidade química

Muitas dispersões de fosfolípides contêm lípides insaturados (cadeias acila) como parte de sua cadeia molecular. Os lípides insaturados sofrem degradação oxidativa ou peroxidação lipídica. Essas reações podem ocorrer durante a preparação, o armazenamento ou no momento do uso. A peroxidação é um processo complexo envolvendo reações radiculares que resultam na formação de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos. Essa degradação oxidativa acontece rapidamente se os lípides insaturados não forem protegidos durante a preparação e o armazenamento. Devem ser protegidos pela manutenção em atmosfera de gás inerte, como nitrogênio ou argônio; pela remoção de metais pesados (adição de EDTA) ou pela adição de antioxidantes, como alfa-tocoferol ou butilhidroxitolueno.

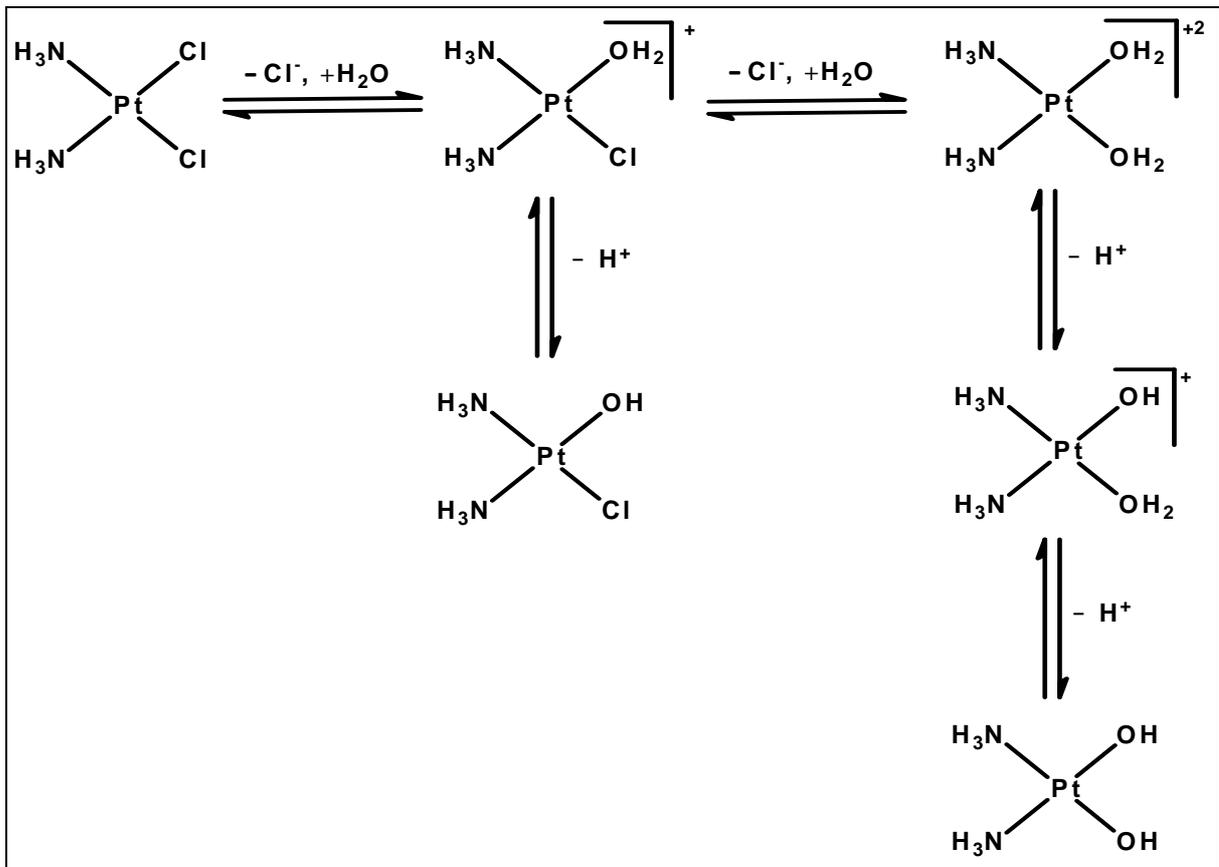
A hidrólise dos lípides leva a formação de lisofosfolípides (Figura 8) e ácidos graxos livres. Os lisofosfolípides podem ser posteriormente hidrolisados em glicerofosfocompostos e ácidos graxos. Esses produtos de reação podem alterar a rigidez da bicamada lipossomal, a retenção do material encapsulado e o diâmetro das vesículas e, portanto, devem ser mantidos em níveis mínimos (VEMURI *et al.*, 1995).



**Figura 8 – Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE (1-oleil 2-hidroxi glicero-3-fosfoetanolamina).**

## 7.3 Hidrólise da CDDP

Em solução aquosa, os átomos de cloro da CDDP são facilmente substituídos por ligantes “aquo” (Figura 9), originando espécies mais reativas. Parte destes ligantes podem ser desprotonados a “hidroxo” ligantes, que ocasiona uma diminuição da reatividade do complexo (JAKUPEC *et al.*, 2003). Visando a manutenção da integridade da molécula do fármaco, a solução de CDDP deve conter, no mínimo, cloreto de sódio 0,2 % p/v (THOMPSON, 1998).



**Figura 9 – CDDP e seus produtos de hidrólise.**

## 8 Liofilização

Com o objetivo de aumentar a estabilidade física e química dos lipossomas, o processo de liofilização têm sido utilizado, aumentando dessa forma a vida de prateleira das formulações lipossomais (YANG *et al.*, 2006). Em relação à estabilidade desta forma farmacêutica, a utilização de uma suspensão aquosa como um produto comercial é questionável. Em contraste, uma preparação “seca” para ser hidratada imediatamente antes da sua utilização pode evitar muitos problemas associados com as dispersões aquosas de lipossomas. O processo pode ser aplicado sobre os lípides ou sobre os lipossomas propriamente ditos (PAYNE *et al.*, 1986). Tem sido relatado que lipossomas contendo moléculas encapsuladas podem ser liofilizados e reconstituídos com significativa retenção da taxa de encapsulação e sem alterações significativas no tamanho das vesículas (VEMURI *et al.*, 1995).

Liofilização é o processo empregado na desidratação de substâncias extremamente sensíveis ao calor. Nesse processo, a solução ou suspensão líquida é inicialmente congelada; em seguida, a pressão sobre a matéria congelada é reduzida e, por fim, a água é removida por sublimação (AULTON, 2005). O processo de liofilização envolve 3 estágios: (i) congelamento da suspensão lipossomal; (ii) secagem primária (perda de água por sublimação até 0,5 %) e (iii) secagem secundária (remoção da água residual e obtenção de pó seco poroso) (MOHAMMED *et al.*, 2006; AULTON, 2005).

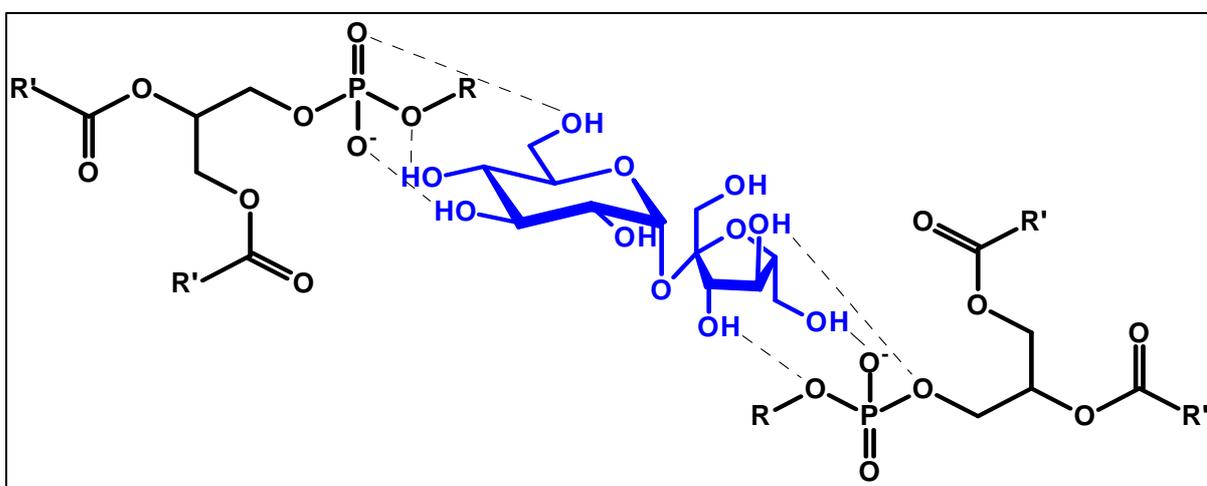
O programa de liofilização empregado influencia as características do produto. Lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol (PC:CHOL, razão molar 4:1, respectivamente) foram submetidos à diferentes ciclos de liofilização. Seguindo as etapas de liofilização, constituídas do congelamento, secagem primária e secundária sob temperaturas de - 70 °C, - 50 °C e - 30 °C, respectivamente (programa 1); - 50 °C, - 40 °C e - 25 °C (programa 2) e - 30 °C, - 20 °C e - 10 °C (programa 3), as formulações do programa 1 e 2 mantiveram-se com diâmetro vesicular médio menores que 200 nm quando acrescidos de crioprotetores; enquanto que a formulação submetida ao programa 3 sofreu significativa agregação e fusão das vesículas (MOHAMMED *et al.*, 2007).

## 9 Crioproteção

Como dito anteriormene, a liofilização é bastante utilizado para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. Entretanto, tanto o congelamento quanto a secagem podem induzir a danos, resultando no aparecimento de fenômenos relacionados à agregação e/ou fusão das vesículas. Os lipossomas podem ter seu diâmetro alterado durante a liofilização e/ou durante a subsequente rehidratação se estabilizantes apropriados não forem empregados (MOHAMMED *et al.*, 2006). Assim sendo, para promover estabilidade física durante o processo de liofilização, agentes crioprotetores como açúcares (por exemplo: sacarose, trealose e lactose) e seus derivados são utilizados. Aminoácidos também têm sido estudados quanto a sua capacidade crioprotetora (MOHAMMED *et al.*, 2007).

A partir da observação da capacidade de muitos organismos sobreviverem à completa desidratação, em estado de anidrobiose, os pesquisadores chegaram à descoberta de que essa sobrevivência é possibilitada pela presença de grande quantidade de dissacarídeos (particularmente sacarose e trealose) sintetizados durante o processo de perda de água. Os açúcares inserem-se entre as porções polares do fosfolípide no estado seco, levando à

formação de ligações de hidrogênio. Essas interações entre os açúcares e os fosfolípides permitem a manutenção do estado físico das membranas no estado seco de forma similar à existente no estado hidratado. Tem sido proposto que essas interações açúcares/fosfolípides resultam na diminuição da temperatura de transição gel/líquido-cristalino do fosfolípide ( $T_m$ ) no seu estado desidratado. Dessa forma, essa transição de fase não ocorre durante o processo de desidratação/rehidratação, evitando a perda do material encapsulado (van WINDEN *et al.*, 1997).



**Figura 10 – Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar.**

Análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) demonstraram que a redução da temperatura da transição de fase gel/líquido-cristalino depende da razão de massa de açúcar:lípide. Além disso, a manutenção da integridade da membrana lipídica na presença de açúcares está associada com a formação de uma matriz vítrea dos açúcares à temperatura ambiente. Esta é amorfa, termodinamicamente instável e caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade molecular. A formação dessa matriz vítrea evita a fusão da membrana lipídica, sendo isto importante para a manutenção do diâmetro das vesículas e a retenção do conteúdo encapsulado (CACELA;HINCHA, 2006; van WINDEN *et al.*, 1997; RICKER *et al.*, 2003). Em misturas de trealose e lípidos no estado seco, duas populações distintas de açúcar estão presentes: uma interage diretamente com porções polares do fosfolípide (ocupando o lugar da água) e a outra população forma a matriz vítrea (CROWE *et al.*, 1987).

A crioproteção oferecida pelos solutos é influenciada pela temperatura de transição dos lípidos e pela temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos carboidratos. A utilização de

crioprotetores durante a liofilização deve observar a Tg do soluto empregado como tal, a fim de preservar a natureza porosa do liofilizado. A secagem primária deve ser feita a aproximadamente 4 °C abaixo da Tg dos carboidratos. Em uma mistura de lipossomas de PC:CHOL e trealose, este açúcar apresentou Tg de - 30 °C e quando a temperatura da secagem primária foi mantida abaixo desta, produtos estáveis foram obtidos nos programas de liofilização 1 e 2, citados no item 9. Entretanto, sob temperatura em torno da Tg (programa 3) ocorreu fusão da vesícula, possivelmente devido à falta de formação da matriz vítrea (MOHAMMED *et al.*, 2006).

De acordo com métodos calorimétricos e de difração de raio-X, cerca de 18-24 moléculas de água, dependendo se os lípides estão estabilizados em vesículas grandes ou pequenas, contribuem para a espessura da bicamada e, portanto, para a barreira de permeabilidade. Luzardo e colaboradores (2000) descreveram a estrutura de hidratação da interface da bicamada lipídica, como sendo composta por 3 ou 4 moléculas de água, que são deslocadas por sacarose ou trealose de forma coligativa (isto é, por efeito osmótico); 7 moléculas de água fortemente ligadas às carbonilas que são deslocadas apenas por trealose; 7 moléculas de água muito fortemente ligadas aos fosfatos que podem ser substituídos por sacarose ou trealose se a desidratação for extremamente drástica, como no caso da liofilização. Os mecanismos de ação da sacarose e da trealose são diferentes, provavelmente devido à estereoquímica do grupos hidroxila nas posições equatorial e axial. Entretanto, sob condições drásticas, nas quais a água é completamente removida, os dois açúcares atuam de maneira semelhante.

Zadi e Gregoriadis (2000) utilizaram a sacarose como agente crioprotetor em razões de massa lípide:açúcar variando de 1:1 até 1:15, na produção de lipossomas pelo método de congelamento/descongelamento, seguido de liofilização. O emprego de relação sacarose:lípide igual a 1:1 resultou em aumento considerável do teor de encapsulação de diferentes solutos, porém com a formação de vesículas maiores (213-687 nm). Para razão sacarose:lípide igual a 5:1 foi observada redução do diâmetro das vesículas lipossomais (93-116 nm), sem apresentar variação significativa sobre o teor de fármaco encapsulado. Entretanto, em razões sacarose:lípide muito maiores (10:1 a 15:1), o teor de fármaco encapsulado diminuiu e o diâmetro das vesículas permaneceu inalterado, em virtude da proteção efetiva proporcionada pela sacarose contra a desestabilização das estruturas lipossomais. Portanto, a escolha da razão crioprotetor:lípide ideal para a encapsulação de substâncias e manutenção do diâmetro das partículas depende do balanço dessas avaliações.

Hincha e Hagemann (2004) investigaram a habilidade da sacarose, trealose, 2-O-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)glicerol (GG), derivados do aminoácido betaína (glicinobetaína e glutamatobetaína) e sorbitol em estabilizar lipossomas durante a desidratação e a rehidratação. Na ausência de qualquer soluto protetor, os lipossomas perdem completamente seu material encapsulado e sofrem o fenômeno de fusão. Sacarose e trealose foram aproximadamente iguais quanto à capacidade de estabilizar lipossomas, sorbitol foi superior aos últimos, enquanto GG mostrou-se menos eficaz e os derivados da betaína não apresentaram nenhuma proteção. Estudos feitos por Glavas-Dodov e colaboradores (2005) demonstraram que o processo de congelamento/descongelamento não alterou o tamanho das partículas de lipossomas rehidratados contendo sacarose como crioprotetor e, apenas uma pequena diminuição na taxa de encapsulação foi observada, com taxas superiores a 76 %.

## **10 Produção em escala piloto**

O escalonamento de lipossomas depende dos seguintes fatores críticos: o desenvolvimento de um processo eficiente e adequado para a produção de lipossomas estéreis e livres de pirogênios em escala industrial; altos e reprodutíveis níveis de encapsulação do fármaco, com uma quantidade mínima de fármaco livre (não-encapsulado) presente no produto final; e ainda, que a formulação do lipossoma seja estável durante o armazenamento (AMSELEM *et al.*, 1990). O extenso interesse no uso de lipossomas como carreadores de fármacos exige procedimentos que atendam aos padrões farmacêuticos quanto à preparação e caracterização das vesículas. Procedimentos tecnológicos aceitáveis devem ser reprodutíveis em larga escala e economicamente viáveis. VEMURI e RHODES (1995) também consideram que para a produção em larga escala de lipossomas, deve-se garantir a remoção de todo o solvente orgânico, a proteção dos fosfolípidos contra a oxidação, a remoção das endotoxinas, a remoção da droga livre (não-encapsulada), o controle do tamanho das vesículas e a esterilização dos lipossomas.

Quando um sistema solvente for selecionado para um dado procedimento devem-se levar em consideração os limites de segurança, solubilidade e pureza do mesmo. Os resíduos de solventes na preparação acabada podem causar danos à saúde do paciente. Solventes como etanol e hidrocarbonetos podem levar à desestabilização dos lipossomas por interferirem nas interações cooperativas hidrofóbicas entre os grupos metileno dos fosfolípidos que mantêm a estrutura unida. Estudos de VEMURI e RHODES (1995) demonstraram que quanto menor o

lote e maior a temperatura do banho, menor será a quantidade de resíduo de clorofórmio no filme fosfolipídico. Estes estudos ainda sugerem que o tamanho do lote influencia mais na quantidade de resíduo de clorofórmio do que a temperatura do banho.

A melhor maneira de controlar os níveis de endotoxinas das preparações de lipossomas é a utilização de matéria-prima de alta qualidade com baixos níveis de endotoxinas e a condução do processo em condições assépticas com utensílios despirogenizados. Para a utilização dos lipossomas como um sistema controlador da liberação de drogas, é necessária a completa remoção da droga livre. Para isso são utilizadas várias técnicas como cromatografia de troca iônica (AMSELEM *et al.*, 1990), ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho (VEMURI;RHODES, 1994).

Lipossomas não podem ser esterilizados pela exposição a altas temperaturas, e também são sensíveis aos vários tipos de irradiação, bem como esterilização por agentes químicos. Logo, o único método disponível para a esterilização é a filtração em membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ , para lipossomas pequenos. Para lipossomas maiores, o processo deve ser conduzido em condições assépticas (NEW, 1990).

Métodos comumente utilizados para a preparação de lipossomas que podem ser utilizados no escalonamento incluem hidratação do filme lipídico, homogeneização sob alta pressão, injeção de solvente orgânico e uso de gradiente de pH. Amselem e colaboradores (1990) compararam cinco métodos de preparação de lipossomas por hidratação do filme lipídico. Para o escalonamento de lipossomas de doxorubicina, um fármaco lipofílico, foi escolhido o processo chamado hidratação lenta do filme lipídico delgado, constituído de fosfatidilcolina:fosfatidilglicerol:colesterol (concentração lipídica 35 mM, razão molar 7:3:4). Após a hidratação do filme, foi realizada a extrusão em membranas de policarbonato de 0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ . Lipossomas oligolamelares foram obtidos, de diâmetro compreendido entre 300-500 nm, com taxa de encapsulação de 97 % .O diâmetro dos lipossomas não sofreu alteração por um período de 5 meses, a 4° C. Este método mostrou-se o mais eficiente em termos de encapsulação do fármaco.

Um outro método utilizado para o escalonamento de lipossomas foi a homogeneização sob alta pressão. Mesoporfirina de estanho, um inibidor competitivo da hemeoxigenase, foi dissolvido em metanol. A esta solução foi adicionada fosfatidilcolina de ovo previamente dissolvida em uma mistura metanol:clorofórmio (9:1). O solvente foi evaporado em rotavapor sob pressão reduzida. Ao filme lipídico formado foi adicionada uma solução de lactose 0,05 M/tampão fosfato 0,004 M. Essa mistura foi então homogeneizada por 2 horas e após esse

período, submetida à microfluidização, a 60-80 psi. As vesículas obtidas apresentaram diâmetros menores de 200 nm e taxa de encapsulação acima de 90 %. Os lipossomas de mesoporfirina de estanho foram esterilizados por filtração e liofilizados em um ciclo de um dia, com retenção do diâmetro das vesículas e manutenção da taxa de encapsulação. A lactose foi utilizada por suas propriedades crioprotetoras e por sua aceitabilidade em formulações para uso parenteral (CANNON *et al.*, 1993).

Jeffs e colaboradores (2005) utilizaram o método da injeção de solvente seguida de ultrafiltração da preparação de lipossomas constituídos de colesterol: diestearoilfosfatidilcolina:dióleiloxidimetilaminopropano:diestearoilglicerometoxipoliétil enoglicol 2000 (concentração lipídica 20 mM, razão molar 55:20:15:10, respectivamente) para a encapsulação de plasmídeo de DNA em larga escala. Com esse método foram obtidas vesículas de diâmetro inferior a 200 nm e taxa de encapsulação acima de 80 %.

VEMURI e RHODES (1994) sugeriram a utilização do método de encapsulação por gradiente de pH seguido de diafiltração para o escalonamento de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de ovo:fosfatidilglicerol de ovo:colesterol contendo sulfato de orciprenalina (100 mg/mL). O filme lipídico foi hidratado com tampão fosfato contendo 5 % lactose, pH 4,5, e o fármaco foi dissolvido em tampão fosfato contendo 5 % de lactose, pH 9,5. Por esse método, foram obtidos lipossomas unilamelares e oligolamelares, de diâmetro inferior a 200 nm e com taxa de encapsulação de 80-85 %. O processo de liofilização não alterou o diâmetro das vesículas, porém reduziu a porcentagem de encapsulação em 15 %. O extravasamento do fármaco foi associado ao aumento do tamanho das vesículas, durante o armazenamento.

Para a produção em larga escala de lipossomas unilamelares grandes (LUV) pode-se utilizar o método da microfluidização, no qual a suspensão lipídica é forçada repetidamente sob alta pressão através de um pequeno orifício para colidir contra uma parede ou um fluido que venha em sua direção contrária. As desvantagens são a relativa alta polidispersibilidade da dispersão lipossomal, dificuldades em refinar o diâmetro das vesículas e algum risco de degradação da amostra (ULRICH, 2002).

BARNADAS-RODRÍGUEZ e SABÉS (2001) estudaram uma variedade de fatores a fim de avaliar as características de lipossomas obtidos em um microfluidizador. Fatores tais como a pressão, tempo que as amostras são processadas (ciclos), a força iônica, a concentração de fosfolípide e a quantidade de solvente orgânico (etanol) foram relacionados com o diâmetro médio dos lipossomas e sua heterogeneidade. Para minimizar o número de experimentos foi aplicado o *design* fatorial, como estratégia estatística de otimização. Como

as características das suspensões lipossomais determinam sua eficiência de encapsulação e aplicação, um conhecimento detalhado do processo de homogeneização pode facilitar a escolha das condições de trabalho para a obtenção de um tipo de lipossoma pré-determinado. Através da variação do número de ciclos (0-9) e da pressão empregada (1273-5092 Bar), os resultados mostram que o diâmetro sempre diminui com o aumento do número de ciclos e com o aumento da pressão. Entretanto, há um limite no número de ciclos empregado para um valor de pressão constante, a partir do qual, não ocorre mais a diminuição do diâmetro. Esse valor constante foi atingido em todos os valores de pressão em aproximadamente sete ciclos. Em amostras homogeneizadas a aproximadamente 3000 Bar, por 9 ciclos, foram obtidos lipossomas de diâmetro igual a 134 nm.

### **11 Proposta de estudo da estabilidade e produção em escala piloto de SpHL-CDDP sob a forma liofilizada**

Uma formulação de SpHL-CDDP foi desenvolvida em escala laboratorial, pelo nosso grupo de pesquisa, mediante o emprego do método de evaporação em fase reversa (REV) seguida de extrusão e ultracentrifugação. Estudos de biodistribuição mostraram que após a administração de SpHL-CDDP, por via endovenosa, a CDDP atingiu uma concentração aproximadamente 2 vezes maior em tumores sólidos de camundongos do que após a administração de CDDP livre (JUNIOR *et al.*, 2007a,b). Diante desses resultados, teve início a pesquisa da viabilidade da transposição de escala e da produção desta formulação sob as formas líquida e liofilizada para futura avaliação em testes clínicos. O processo deve ser reprodutível e levar à produção de lipossomas estéreis e livres de pirogênios (WAGNER *et al.*, 2002). Outro fator a ser considerado é a estabilidade do produto, que no caso dos lipossomas pode ser limitada pelo extravasamento do fármaco a partir das vesículas, mudanças no tamanho das partículas durante a estocagem e pela estabilidade química do fármaco e dos componentes lipídicos (CANNON *et al.*, 1993). A liofilização na presença de dissacarídeos, como sacarose e trealose, permite a manutenção da estabilidade de uma formulação, impedindo o extravasamento do material encapsulado e a alteração do diâmetro vesicular (CROWE *et al.*, 1998). Desse modo, nessa dissertação de mestrado foram avaliados o uso de crioprotetores na preparação de SpHL-CDDP na forma liofilizada, um método de preparo dessa formulação em escala piloto e a estabilidade de armazenamento da mesma.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O presente trabalho de dissertação de mestrado teve como objetivos estudar diferentes parâmetros relacionados à estabilidade química e físico-química de uma formulação de SpHL-CDDP, assim como estabelecer um processo eficiente para a sua produção em escala piloto.

### **Objetivos específicos**

- Desenvolver uma formulação farmacêutica de SpHL-CDDP sob a forma liofilizada e avaliar o teor de encapsulação, diâmetro e potencial zeta das partículas;
- Avaliar a estabilidade físico-química da formulação de SpHL-CDDP líquida e liofilizada ao longo do tempo de armazenamento;
- Avaliar a eficiência de um processo de preparo de uma formulação de SpHL-CDDP em escala piloto constituído pelas etapas de evaporação sob vácuo/homogeneização sob alta pressão/ultrafiltração.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 Material

Dióleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemisuccinato de colesterila (CHEMS) foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A CDDP foi adquirida da Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). A sacarose e a trealose dihidratada, N-[2-hidroxietil] piperazina N'-[2-ácido etanosulfônico] (HEPES) e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil).

O metanol, acetato de etila e a N, N- dimetilformamida (DMF), todos solventes grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Ohio, Estados Unidos). Os solventes clorofórmio P.A. e éter etílico P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio P.A. e o isopropanol foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e destilada.

### 2 Métodos gerais

Os lipossomas foram preparados utilizando um rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). A calibração dos lipossomas produzidos em pequena escala foi feita através de um extrusor Lipex Biomembranes, modelo T 001 (Vancouver, Canadá). Para a calibração dos lipossomas produzidos em larga escala foi utilizado um homogeneizador de alta pressão de estágio único, modelo APV 2000 (Albertslund, Dinamarca). A purificação dos lipossomas foi realizada por ultracentrifugação, utilizando uma ultracentrífuga Sorvall Ultra 80 (Albertville, Estados Unidos) ou por ultrafiltração em um dispositivo Millipore Pellicon XL com membrana de poliétersulfona Biomax<sup>®</sup> de 300 kDa (Massachusetts, Estados Unidos) acoplada a uma bomba peristáltica Watson-Marlow 313S (Inglaterra). Os lipossomas obtidos foram caracterizados quanto ao diâmetro das partículas e potencial zeta utilizando o Zetasizer Malvern Instruments, modelo 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). A liofilização foi realizada em liofilizador E-C Modulyo, acoplado a uma bomba Edwards, modelo E2M18FF (Inglaterra). O teor de encapsulação foi determinado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Instruments, composto por uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um

detector DAD modelo 2996 (Milford, Estados Unidos), conectado a um computador apresentando o software Empower, versão 2.0. As amostras foram vortexadas em Mini-shaker Ika, modelo MS1 (Wilmington, Estados Unidos).

### **3 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP**

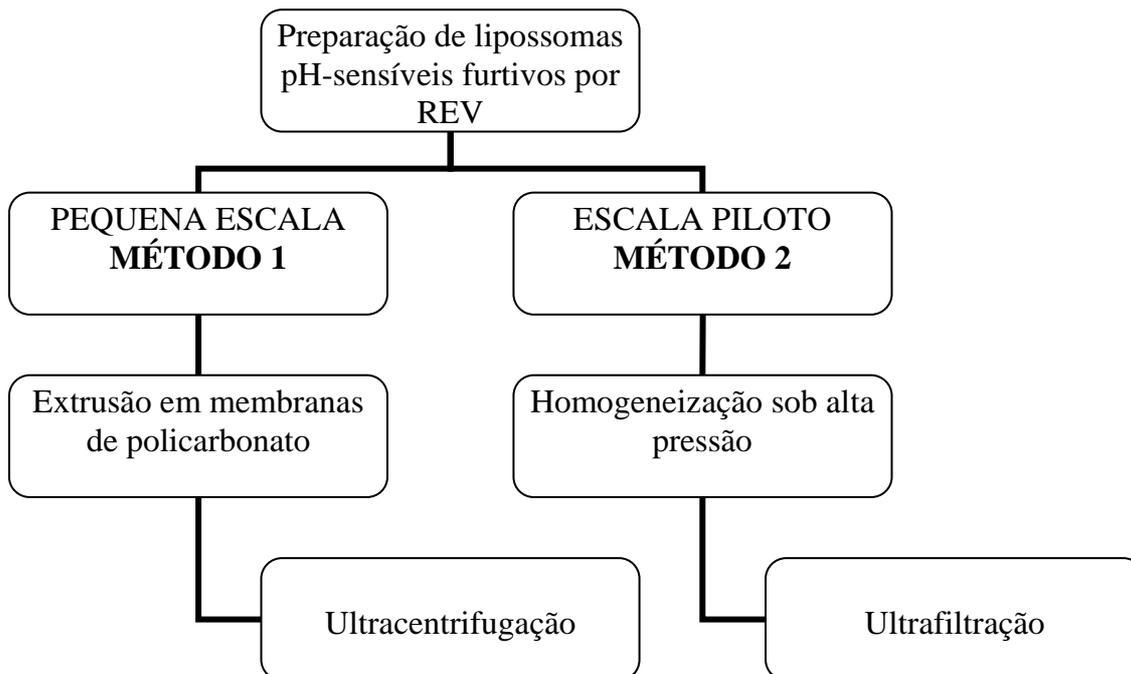
A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada como método de doseamento da CDDP, segundo método analítico descrito na Farmacopéia Americana 24<sup>a</sup> edição (USP 24), com modificações no eluente empregado. O eluente descrito na USP 24 é constituído por acetato de etila, metanol, dimetilformamida e água, na proporção de 25:16:5:5, respectivamente; enquanto o eluente utilizado neste trabalho é constituído por acetato de etila, metanol, dimetilformamida e água, na proporção 4:4:1:1, respectivamente. A cisplatina foi separada utilizando como fase estacionária a coluna Lichrosper<sup>®</sup> 100 NH<sub>2</sub>, 25 cm x 4 mm, 10 µm (Darmstadt, Alemanha). O volume de injeção foi de 20 µL, em fluxo igual a 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e o material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 310 nm.

#### **3.1 Linearidade**

Para a determinação da linearidade do método de CLAE empregado no doseamento da CDDP foi construída uma curva de calibração apresentando 6 pontos relativos a diferentes concentrações de solução padrão de CDDP, preparadas em triplicatas. Inicialmente, uma solução concentrada de CDDP 2 mg/mL foi preparada pela solubilização de 50 mg de CDDP em 20 mL de solução de cloreto de sódio 0,9 g% (p/v), sob aquecimento em temperatura inferior a 45 °C, seguida de agitação em vórtex. A solução de CDDP obtida foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução de NaCl 0,9 g% (p/v). A partir desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 mL para balões volumétricos de 10 mL. O volume de cada balão foi completado com fase móvel para a obtenção das respectivas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80 e 1,60 mg/mL de CDDP. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz, seguido de sua injeção no cromatógrafo líquido utilizando as condições cromatográficas descritas acima. A partir das áreas dos picos obtidos, a curva de calibração foi construída e a linearidade do método foi avaliada mediante o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4 Preparação de lipossomas pH-sensíveis furtivos de CDDP (SpHL-CDDP)

A preparação de SpHL-CDDP foi realizada mediante o emprego do método de evaporação em fase reversa (REV). Após a obtenção das vesículas lipídicas, a produção foi efetuada por dois métodos distintos, que foram denominados como **Método 1**, a produção de lipossomas em pequena escala; e **Método 2**, a produção em escala piloto (Figura 11).



**Figura 11 – Organograma da produção de lipossomas pH-sensíveis furtivos.**

#### 4.1 Método 1 – Preparação de SpHL-CDDP em pequena escala pelo método REV

##### 4.1.1 Obtenção de uma emulsão água em óleo (A/O)

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG<sub>2000</sub> (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5; respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o solvente, em seguida, evaporado sob vácuo. O filme lipídico obtido foi dissolvido em 3,0 mL de éter etílico, previamente tratado com solução de tampão HEPES 10mM para eliminação de peróxidos e em uma quantidade de solução de hidróxido de sódio necessária para ionizar completamente o CHEMS. Posteriormente, para a obtenção de lipossomas de CDDP, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de NaCl 0,9 g%

(p/v) contendo CDDP 2,0 mg/mL, à solução lipídica. A mistura obtida foi, então, submetida ao vórtex durante 5 minutos, produzindo uma emulsão do tipo A/O.

#### **4.1.2 Obtenção de SpHL-CDDP**

Posteriormente, a emulsão A/O foi submetida à evaporação sob vácuo a fim de se eliminar o solvente orgânico, permitindo a formação das vesículas lipídicas. Em seguida, os lipossomas foram submetidos à calibração mediante sua passagem através de membranas de policarbonato da marca Millipore (Bedford, Estados Unidos). Pelo **método 1a**, os lipossomas foram calibrados pela passagem por membranas de 0,4  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$  e 0,1  $\mu\text{m}$  (5 vezes cada ciclo), respectivamente, para a obtenção de lipossomas com diâmetro das vesículas em torno de 100 nm, visando uma administração intravenosa. Pelo **método 1b**, os lipossomas foram calibrados em membranas de policarbonato de 0,4  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$  e 0,05  $\mu\text{m}$  (por 5 vezes), respectivamente, objetivando também a administração intravenosa.

#### **4.1.3 Purificação dos SpHL-CDDP por ultracentrifugação**

O material não encapsulado nos SpHL-CDDP obtidos em pequena escala foi separado dos lipossomas mediante ultracentrifugação, a 150000 x g, a 4 °C, durante 90 minutos. Após a ultracentrifugação, o pellet foi reconstituído adicionando-se uma das seguintes soluções: a) solução isotônica de sacarose (relação p/p de crioprotetor:fosfolípide igual a 1:1, 2:1 ou 3:1), b) solução isotônica de trealose (relação p/p de crioprotetor:fosfolípide igual a 1:1, 2:1 ou 3:1) e c) solução de cloreto de sódio 0,9 g% (p/v). Os SpHL-CDDP foram caracterizados quanto ao teor de encapsulação, diâmetro e potencial zeta das vesículas.

#### **4.1.4 Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL-CDDP**

Os SpHL-CDDP descritos acima, preparados na ausência e presença dos crioprotetores foram submetidos ao processo de liofilização durante 24 horas. Em seguida, os SpHL-CDDP liofilizados foram reconstituídos em água destilada e foram submetidos à ultracentrifugação (150000 x g, 4 °C, 90 minutos) para separação de CDDP liberada no

processo de liofilização. Os SpHL-CDDP ressuspensos foram também caracterizados quanto ao diâmetro e potencial zeta das vesículas.

Com o intuito de se avaliar também a ação dos crioprotetores sobre a estabilidade da formulação liofilizada, lipossomas contendo crioprotetores tanto na fase interna quanto na fase externa das vesículas lipossomais foram produzidos. Nesse caso, a adição dos crioprotetores sacarose e trealose na razão crioprotetor/fosfolípide p/p igual a 1:1 e 2:1, respectivamente, na cavidade interna dos SpHL-CDDP foi executada pela sua encapsulação juntamente com a CDDP, utilizando o método **1a**.

## **5 Método 2 – Preparação de SpHL-CDDP em escala piloto pelo método REV**

Para a produção de SpHL-CDDP em escala piloto, o método utilizado diferenciou-se da produção em pequena escala quanto ao volume do lote e aos métodos de calibração das vesículas e de purificação dos lipossomas. A preparação de lipossomas pH-sensíveis furtivos brancos (sem CDDP, SpHL) e de SpHL-CDDP foi realizada mediante o emprego do método REV. Foram preparados lotes de 50 mL, sob pressão e rotação controladas. Os lipossomas foram submetidos à calibração mediante sua passagem através de um homogeneizador de alta pressão de estágio único (HAP) e a separação do material não encapsulado foi realizada por ultrafiltração.

### **5.1 Avaliação da influência do número de ciclos de homogeneização e da pressão sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL**

A fim de se definir as condições para a produção dos SpHL em escala piloto, foram analisadas 2 variáveis no processo de homogeneização da amostra: a pressão aplicada no HAP e o número de ciclos empregados. Os valores de pressão testados foram 500 e 1000 Bar, e a passagem através do HAP (Figura 12) foi realizada por até 12 ciclos. SpHL foram acrescentados ao recipiente alimentador do HAP e a homogeneização foi realizada sob fluxo contínuo. Ao atingir a pressão desejada, iniciou-se a cronometragem de cada ciclo. Cada ciclo representa o tempo necessário para que toda a amostra seja homogeneizada, sob pressão constante. O diâmetro das vesículas foi analisado por espectroscopia de correlação de fótons, conforme descrito no item 8, em alíquotas retiradas antes do processo de homogeneização (0 ciclo) e nos tempos correspondentes a 3, 6, 9 e 12 ciclos.



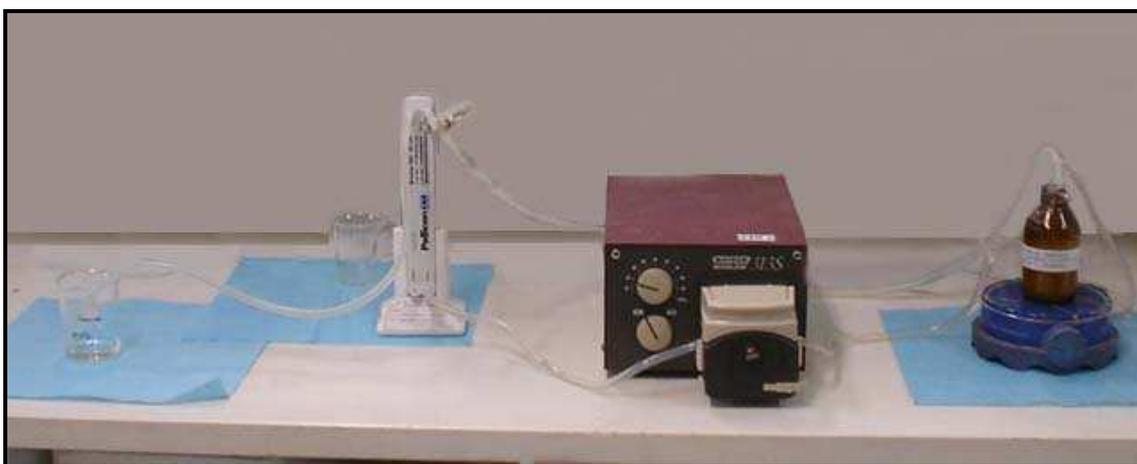
**Figura 12 - Homogeneizador de alta pressão de estágio único.**

## **5.2 Avaliação do número de ciclos de ultrafiltração necessários para a separação da CDDP não encapsulada**

Após a passagem da amostra pelo homogeneizador de alta pressão, os SpHL-CDDP foram ultrafiltrados em um dispositivo Pellicon XL com membrana de polietersulfona Biomax<sup>®</sup> de 300 kDa (50 cm<sup>2</sup>) acoplada a uma bomba peristáltica, sob fluxo de 40 mL/min (Figura 13). Os lipossomas foram permeados durante 1 a 6 ciclos, sendo que cada ciclo corresponde à redução do volume da amostra até o volume mínimo necessário à recirculação pelo dispositivo de ultrafiltração.

Inicialmente, um volume de 100 mL da dispersão lipossomal foi acondicionada em um recipiente alimentador, no qual era mantida sob agitação constante. Sua passagem foi impulsionada pela bomba peristáltica até a membrana, a qual separava a amostra em duas “fases”, sendo elas: 1) o **permeado**, composto principalmente por solução de CDDP e cloreto de sódio e 2) o **retido**, composto pelos SpHL-CDDP. A amostra retida retornava ao recipiente alimentador e recirculava até sua concentração a um volume de aproximadamente 20 mL. Ao atingir esse volume, cessava-se o bombeamento e a amostra era diluída com solução de NaCl 0,9 g% (p/v) em quantidade suficiente para 100 mL. Este procedimento foi

repetido por até 6 ciclos. Ao final de 6 ciclos, a amostra retida foi reservada. Um volume de 5 mL de solução de NaCl 0,9 g% (p/v) foi injetado na membrana para recuperar o volume “morto” de SpHL-CDDP restante no dispositivo de ultrafiltração e adicionado à amostra retida, totalizando assim 25 mL de lipossomas purificados. Após cada ciclo, a solução permeada foi reservada, para subsequente análise da concentração de CDDP por CLAE. Os permeados obtidos após o quarto, quinto e sexto ciclo de permeação foram liofilizados, a fim de concentrar as amostras para se atingir um nível de CDDP detectável.



**Figura 13 - Dispositivo de ultrafiltração Millipore Pellicon XL<sup>®</sup> acoplado a bomba peristáltica.**

### **5.3 Preparação de SpHL-CDDP pelo método de evaporação em fase reversa**

#### **5.3.1 Obtenção de uma emulsão A/O**

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG<sub>2000</sub> (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5; respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo, sendo o solvente, em seguida, evaporado sob pressão reduzida e rotação de 100 rpm. O filme lipídico obtido foi dissolvido em 150 mL de éter etílico, previamente tratado com solução tampão de HEPES 10 mM, para eliminação de peróxidos e contendo quantidade de NaOH necessária para ionizar completamente o CHEMS. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de solução de NaCl 0,9 g% (p/v), contendo CDDP 2,0 mg/mL, à solução lipídica. Em seguida, a mistura obtida foi submetida ao vórtex durante 5 minutos, produzindo uma emulsão do tipo A/O.

### 5.3.2 Obtenção de SpHL-CDDP

Posteriormente, a emulsão foi submetida à evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida, levando à formação de vesículas lipídicas. A rotação foi mantida em 100 rpm. Em seguida, a dispersão de lipossomas foi diluída para um volume final igual a 110 mL com uma solução de NaCl 0,9% (p/v), a fim de se obter o volume mínimo necessário para a calibração do diâmetro dos lipossomas em um homogeneizador de alta pressão. A calibração foi realizada mediante a passagem da dispersão de SpHL-CDDP no HAP, sob pressão de 500 Bar, por 9 ciclos. O diâmetro das vesículas foi analisado por espectroscopia de correlação de fótons, conforme descrito no item 8.

### 5.3.3 Purificação dos SpHL-CDDP por ultrafiltração

O material não encapsulado foi separado dos lipossomas produzidos pelo método 2 mediante a ultrafiltração em um dispositivo Pellicon XL com membrana de polietersulfona Biomax® de 300 kDa (Millipore) acoplada a uma bomba peristáltica Watson-Marlow 313S, sob fluxo de 40 mL/min. Os lipossomas foram permeados por 6 ciclos. Após cada ciclo, a solução permeada foi reservada para posterior análise por CLAE. A suspensão retida pela membrana (SpHL-CDDP concentrado) foi reconstituída adicionando-se uma das seguintes soluções: 1) solução isotônica de sacarose (relação p/p de crioprotetor:fosfolípide igual a 1:1); 2) solução isotônica de trealose (relação p/p de crioprotetor:fosfolípide igual a 2:1) ou 3) solução de cloreto de sódio 0,9 g% (p/v).

## 6 Preparação das soluções de crioprotetores

Foram testadas soluções crioprotetoras de sacarose e trealose para a avaliação da sua influência sobre o teor de encapsulação, o diâmetro e o potencial zeta das vesículas, antes e após a liofilização dos SpHL-CDDP. As concentrações escolhidas para os testes basearam-se na relação p/p entre os fosfolípidos e crioprotetores presentes na formulação, variando desde uma relação 1:1 até 1:3, conforme trabalho executado por Zadi e Gregoriadis (2000). As soluções de crioprotetores eram isotônicas em relação à solução encapsulada. Foram preparadas e acrescentadas à formulação no momento da reconstituição do pellet, obtido após ultracentrifugação (método 1), ou para a reconstituição dos lipossomas concentrados por ultrafiltração (método 2). As quantidades necessárias de sacarose, trealose e cloreto de sódio

para cada formulação foram pesadas em balança analítica (Sartorius BP221S, Alemanha), dissolvidas em quantidade suficiente de água destilada e transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. As soluções **g** e **h**, contendo CDDP, foram aquecidas em temperatura inferior a 45 °C a fim de promover a solubilização desse fármaco.

*a) Solução isotônica de sacarose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 1:1)*

Sacarose.....	2,25 %
Cloreto de sódio.....	0,69 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*b) Solução isotônica de sacarose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 2:1)*

Sacarose.....	4,50 %
Cloreto de sódio.....	0,48 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*c) Solução isotônica de sacarose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 3:1)*

Sacarose.....	6,75 %
Cloreto de sódio.....	0,30 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*d) Solução isotônica de trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 1:1)*

Trealose dihidratada (fc: 1,1052)*.....	2,25 %
Cloreto de sódio.....	0,69 %
Água destilada qsp.....	100 mL

\*fc significa fator de correção relativo ao peso da trealose hidratada sobre sua forma anidra

*e) Solução isotônica de trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 2:1)*

Trealose dihidratada (fc: 1,1052).....	4,50 %
Cloreto de sódio.....	0,48 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*f) Solução isotônica de trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 3:1)*

Trealose dihidratada (fc: 1,1052).....	6,75 %
Cloreto de sódio.....	0,30 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*g) Solução isotônica de CDDP e sacarose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 1:1)*

CDDP.....	0,20 %
Sacarose.....	2,25 %
Cloreto de sódio.....	0,69 %
Água destilada qsp.....	100 mL

*h) Solução isotônica de CDDP e trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 2:1)*

CDDP.....	0,20 %
Trealose dihidratada (fc: 1,1052).....	4,50 %
Cloreto de sódio.....	0,48 %
Água destilada qsp.....	100 mL

**7 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP**

A determinação da porcentagem de CDDP encapsulada foi realizada por CLAE, como descrito no item 3. Os SpHL-CDDP foram previamente abertos com o emprego de álcool isopropílico na proporção 1:2, seguida de diluição em fase móvel (1,5 vezes) para injeção no cromatógrafo. O teor de encapsulação (TE) da CDDP em SpHL-CDDP foi calculado mediante a determinação da porcentagem da concentração de CDDP presente nos lipossomas purificados (Lip Purificado) e a concentração de CDDP presente nos lipossomas antes da purificação (Lip Total), como indicado na equação discriminada abaixo:

$$TE = \frac{[CDDP]_{Lip\ Purificado} \times 100}{[CDDP]_{Lip\ Total}}$$

## **8 Determinação do diâmetro e do potencial zeta dos SpHL e SpHL-CDDP**

A análise do diâmetro das partículas foi efetuada por meio de espectroscopia de correlação de fótons utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra). Para a realização das medidas foram utilizados aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  de lipossomas diluídos em 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,9 g% (p/v), até que se obtivesse a contagem adequada de partículas. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. Os resultados são apresentados como a média de dez medidas.

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas 250 vezes, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°.

## **9 Liofilização dos SpHL-CDDP**

Amostras de aproximadamente 1,5 mL de SpHL-CDDP foram pesadas em frascos de vidro âmbar, congeladas em nitrogênio líquido e colocadas na câmara do liofilizador. Os lipossomas foram submetidos à liofilização durante 24 horas. Após este período, os frascos foram vedados e os SpHL-CDDP liofilizados foram armazenados sob proteção da luz, em atmosfera de nitrogênio, a 4 °C.

## **10 Ressuspensão dos SpHL-CDDP**

Os lipossomas pH-sensíveis furtivos liofilizados foram reconstituídos com quantidade suficiente de água destilada para a recuperação do volume inicial de lipossomas, em temperatura ambiente. Em seguida, a dispersão lipossomal foi submetida à agitação, com auxílio do vórtex, por 3 minutos. O diâmetro e o potencial zeta destas amostras foram determinados conforme descrito no item 8, a fim de se avaliar o efeito crioprotetor da sacarose e da trealose. Imediatamente após a ressuspensão, estes lipossomas foram novamente submetidos à ultracentrifugação visando avaliar o efeito da liofilização/reconstituição sobre a retenção da cisplatina encapsulada nos lipossomas pH-sensíveis furtivos. Após a ultracentrifugação, a quantidade de cisplatina presente no sobrenadante foi analisada por CLAE. O pellet foi reconstituído com solução de NaCl 0,9 g% (p/v) e os lipossomas foram armazenados sob atmosfera de nitrogênio, a 4° C, protegidos da luz.

## 11 Estudo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP

Foi realizado um estudo comparativo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP, obtidos pelo método 2, sob a forma líquida e liofilizada quanto ao diâmetro das vesículas, potencial zeta e teor de encapsulação. Foram preparados 7 lotes de SpHL-CDDP, sendo que 3 lotes foram armazenados sob a forma líquida, isto é, como dispersões lipossomais, a 4 °C, protegidos da luz e sob atmosfera de nitrogênio. Cada um dos 4 lotes restantes foi dividido em 3 “sublotes”, aos quais foram adicionadas solução isotônica de sacarose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 1:1), solução isotônica de trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 2:1) ou solução de cloreto de sódio 0,9 g% (p/v). Os sublotes foram divididos em frascos de vidro âmbar, liofilizados (conforme descrito no item 9) e armazenados sob atmosfera de nitrogênio, a 4°C, protegidos da luz. As dispersões lipossomais e os lipossomas liofilizados foram caracterizados nos períodos de tempo iguais a 0, 7, 15, 30, 60 e 135 dias. Em cada um dos tempos pré-determinados, as amostras liofilizadas foram ressuspensas, como descrito no item 10, e caracterizadas quanto ao diâmetro das vesículas e potencial zeta. O teor de encapsulação de CDDP em SpHL-CDDP preparados com trealose (relação p/p crioprotetor:fosfolípide 2:1) foi determinado, conforme item 7, após 135 dias de armazenamento.

## 12 Análise estatística

Os valores médios  $\pm$  os desvios padrão (dp) foram calculados para todos os experimentos descritos acima. A análise estatística foi feita através da análise de variância de uma via (ANOVA). Um nível de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

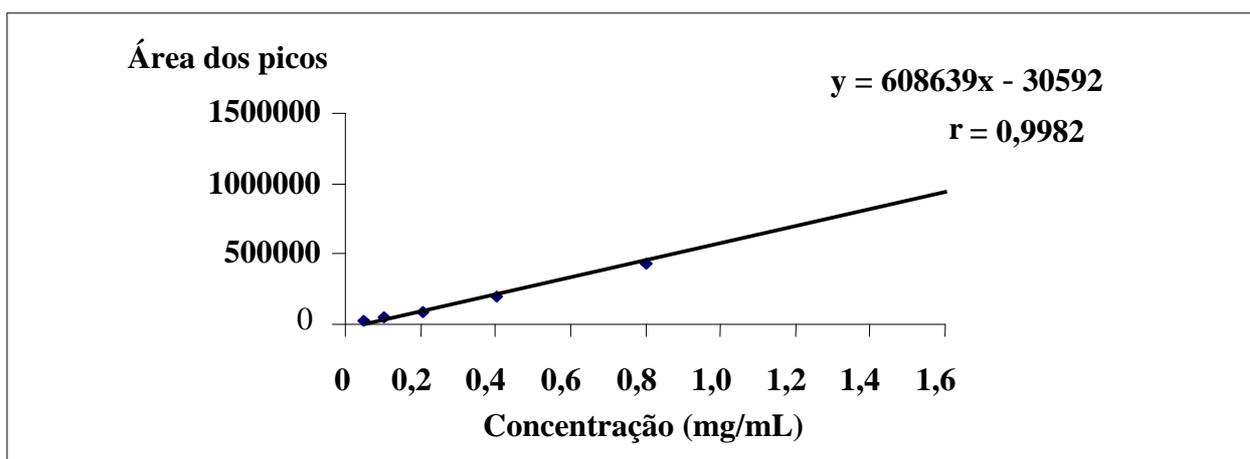
### 1 Obtenção da curva de calibração para doseamento da CDDP

#### 1.1 Linearidade

Na tabela 1 são apresentados os valores das áreas dos picos das diferentes concentrações da solução de CDDP empregadas para a construção da curva de calibração. A curva de calibração (Figura 14) apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,9982, indicando adequada linearidade para a faixa de concentração utilizada (0,05 a 1,6 mg de CDDP/mL).

**Tabela 1 - Valores das áreas dos picos atribuídos à CDDP obtidos pelo emprego de CLAE**

	Concentração da solução padrão de CDDP (mg/mL)					
	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60
Área 1	22666	43500	94886	197462	378854	1042353
Área 2	22956	46234	80659	173879	377042	960837
Área 3	21392	43621	93070	218429	459945	938130



**Figura 14 – Curva de calibração para o doseamento da CDDP obtida pelo método de CLAE**

## **2 Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos segundo método 1**

### **2.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta**

#### **2.1.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a**

A produção de lipossomas pelo método REV leva preferencialmente à obtenção de lipossomas unilamelares grandes (LUV). As vesículas obtidas apresentaram um diâmetro médio igual a  $131,0 \pm 19,4$  nm e um índice de polidispersão de 0,15. As vesículas de SpHL-CDDP mostraram valores de potencial zeta próximos a neutralidade ( $1,9 \pm 1,2$  mV).

#### **2.1.2 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1b**

Com a finalidade de obtenção de vesículas com diâmetro médio abaixo de 100 nm, foi realizada a calibração dos lipossomas pela passagem através de membranas de 50 nm, segundo método 1b. Contudo com a utilização dessas membranas, obteve-se vesículas de diâmetro médio igual a  $109,0 \pm 3,3$  nm. O objetivo de uma maior redução do diâmetro não foi atingido. O valor do potencial zeta das vesículas foi de  $1,7 \pm 0,28$  mV.

### **2.2 Determinação do teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos segundo método 1**

#### **2.2.1 Determinação do teor de encapsulação dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a**

A encapsulação da CDDP em lipossomas pH-sensíveis furtivos, mediante o emprego do método REV, resultou em um teor de encapsulação que variou de 17 a 23 % (0,28 a 0,40 mg de CDDP/mL) na ausência ou presença de trealose e sacarose, empregados como crioprotetores, antes do processo de liofilização dos SpHL-CDDP (Tabela 2). Convém ressaltar, que após o processo de liofilização/reconstituição, na presença ou ausência dos

diferentes crioprotetores, não foi observado nenhum pico no cromatograma do sobrenadante obtido após a centrifugação das diferentes amostras. Isto indica que a CDDP se manteve encapsulada durante as etapas de liofilização/reconstituição, mostrando a estabilidade do sistema frente às condições de preparo de sua forma liofilizada.

**Tabela 2 - Teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos pelo método 1a**

<b>Amostra*</b>	<b>Razão Crioprotetor: Fosfolípide (p/p)</b>	<b>Teor de encapsulação (%)</b>	<b>[CDDP] (mg/mL)</b>
Lip-S/ Criop	-	19,6 ± 3,0	0,32 ± 0,04
Lip-Sacarose	1:1	16,7	0,30
	2:1	18,2 ± 1,9	0,28 ± 0,04
	3:1	22,7 ± 4,4	0,27 ± 0,01
Lip-Trealose	1:1	19,0	0,34
	2:1	20,7 ± 1,6	0,40 ± 0,04
	3:1	N.D.	N.D.

\*As denominações Lip-S/ Criop, Lip-Sacarose, Lip-Trealose referem-se aos SpHL-CDDP preparados na ausência de crioprotetor, na presença de sacarose e de trealose, respectivamente. N.D. significa valores não determinados. Os valores são expressos como média ± dp (n = 3, para as amostras Lip-Sacarose e Lip-Trealose 2:1; n = 2, para a amostra Lip-Sacarose 3:1 e n = 1 para as amostras Lip-Sacarose 1:1, Lip-Trealose 1:1 e 3:1).

### **2.2.2 Determinação do teor de encapsulação e diâmetro dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1b**

Na tabela 3, estão apresentados os valores de teor de encapsulação da CDDP nos SpHL-CDDP produzidos segundo método 1b. Os SpHL-CDDP preparados tanto com sacarose ou trealose apresentaram teor de encapsulação em torno de 10 % (0,2 mg de CDDP/mL), com a adição de mais uma etapa de extrusão (membrana de 0,05 µm). Isto revela perda do material encapsulado em relação ao processo de extrusão empregado no método 1a.

Como observado no método 1a, após o processo de liofilização/reconstituição desses lipossomas não ocorreu liberação da CDDP encapsulada e o diâmetro médio das vesículas foi igual a 232 e 347 nm para as preparações Lip-Sacarose 3:1 e Lip-Trealose 2:1,

respectivamente. Ambas formulações mostraram-se heterogêneas com valores de i.p. iguais a 0,401 e 0,550, respectivamente.

**Tabela 3 - Teor de encapsulação da CDDP em SpHL-CDDP obtidos pelo método 1b**

<b>Amostra</b>	<b>Razão Crioprotetor: Fosfolípide (p/p)</b>	<b>Teor de encapsulação (%)</b>	<b>[CDDP] (mg/mL)</b>
Lip-Sacarose	3:1	10,2	0,19
Lip-Trealose	2:1	10,9	0,20

### **3 Influência da presença de crioprotetores sobre as características físico-químicas dos SpHL-CDDP liofilizados obtidos pelo método 1**

#### **3.1 Influência dos crioprotetores, presentes somente na fase externa, sobre o diâmetro e potencial zeta das vesículas após a reconstituição do pó dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a**

A fim de se obter uma preparação de SpHL-CDDP na forma liofilizada foi avaliada a influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas, após a reconstituição do pó, para administração intravenosa (Tabela 4).

Na ausência de crioprotetor, os SpHL-CDDP apresentaram um diâmetro médio igual a 391 nm após reconstituição, com uma distribuição de tamanho heterogênea (i.p. = 0,682). Considerando, que se tem por objetivo o preparo de SpHL-CDDP para administração intravenosa, é sabido que quanto menor o diâmetro das vesículas, maior é o seu raio de curvatura, e conseqüentemente, menor é a opsonização. Têm sido demonstrado que lipossomas podem atingir diferentes tumores devido a sua propriedade de circulação por um tempo prolongado e devido ao tamanho reduzido ( $\leq 500$  nm) que permite o extravasamento em tecidos com permeabilidade vascular aumentada, condição frequentemente presente no caso de tumores (LASIC, 1998; YUAN *et al.*, 1995).

Avaliando-se a população de vesículas de diâmetro inferior a 200 nm, pode-se observar que a mesma, na ausência de crioprotetor, representa somente 28%. Com o uso dos crioprotetores sacarose e trealose, nas razões crioprotetor:fosfolípide iguais a 1:1 e 2:1 (p/p), respectivamente, o diâmetro médio das vesículas não aumentou de maneira tão acentuada, estando compreendido entre 213 e 257 nm. No entanto, as formulações são ainda

heterogêneas com índice de polidispersão superior a 0,2. Em relação à distribuição percentual do diâmetro médio, foi observada uma maior quantidade de vesículas de diâmetro médio inferior a 200 nm (40 a 50 %). O aumento na razão de crioprotetor:fosfolípide para 3:1 da trealose resultou em um aumento do diâmetro das vesículas (372 nm) e uma menor quantidade de partículas inferiores a 200 nm (16%). O aumento da razão crioprotetor:fosfolípide para a sacarose não levou a melhora significativa no controle do diâmetro das vesículas após liofilização. Ambas as formulações apresentaram-se heterogêneas com valores de i.p. superiores a 0,2. A partir dos resultados obtidos, optou-se pelo prosseguimento do trabalho utilizando sacarose na razão crioprotetor:fosfolípide igual a 1:1 (p/p), e de trealose, na razão crioprotetor:fosfolípide igual a 2:1 (p/p).

**Tabela 4 - Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a após o processo de liofilização**

Amostra*	Razão Crioprotetor: Fosfolípide (p/p)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)	Distribuição de vesículas de diâmetro ≤ 200 nm (%)	Potencial zeta (mV)
Lip-S/Crio-AL	-	131,1 ± 19,4	0,150	80,4 ± 13,3	1,9 ± 1,2
Lip-S/Crio-PL	-	390,7 ± 139,5	0,682	28,2 ± 12,2	0,5 ± 0,5
Lip-Sacarose-AL	1:1	128,8	0,165	89,1	2,5
	2:1	154,0 ± 14,1	0,254	73,0 ± 6,7	-2,3 ± 3,5
	3:1	111,8 ± 16,6	0,080	96,0 ± 6,2	-1,3 ± 1,0
Lip-Sacarose-PL	1:1	251,6	0,396	40,7	1,0
	2:1	256,7 ± 13,6	0,479	40,9 ± 0,1	0,6 ± 3,4
	3:1	263,3 ± 50,0	0,569	36,4 ± 7,7	1,6 ± 2,9
Lip-Trealose-AL	1:1	126,9	0,193	80,6	-
	2:1	153,4 ± 18,69	0,231	75,8 ± 11,2	-1,5 ± 1,8
	3:1	129,9	0,148	89,0	5,3
Lip-Trealose-PL	1:1	242,5	0,601	40,9	-
	2:1	213,4 ± 37,4	0,386	50,5 ± 8,3	-2,8 ± 2,8
	3:1	372,1	0,446	16,3	2,7

\*As abreviaturas AL e PL significam antes e após a liofilização, respectivamente. Os valores são expressos como média ± dp (n = 3), exceto para as amostras Lip-Sacarose e Lip-Trealose 1:1 assim como Lip-Trealose 3:1 (n = 1).

Em relação à medida de potencial zeta, as vesículas de SpHL-CDDP apresentaram valores próximos à neutralidade na ausência e presença dos crioprotetores (Tabela 4).

### 3.2 Influência dos crioprotetores sobre o diâmetro e potencial zeta das vesículas após a reconstituição do pó dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a, utilizando crioprotetores na fase interna e externa dos lipossomas

A adição de crioprotetores, na fase interna e externa das vesículas lipossomais, não levou à melhora da eficiência de manutenção do tamanho, resultando em valores de diâmetro médio superiores ao método 1a, no qual os crioprotetores foram adicionados somente à fase externa da formulação. Em relação a distribuição percentual de vesículas menores que 200 nm houve diminuição para valores abaixo de 18% (Tabela 5).

**Tabela 5 - Influência da presença de crioprotetores, presentes na fase interna e externa, sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 1a após o processo de liofilização**

Amostra*	Razão Crioprotetor: Fosfolípide (p/p)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)	Distribuição de vesículas de diâmetro ≤ 200 nm (%)	Potencial zeta (mV)
Lip-Sacarose-AL	1:1	108,6 ± 5,9	0,04 ± 0,02	99,7 ± 0,1	- 4,45 ± 0,8
Lip-Sacarose-PL	1:1	423,1 ± 8,6	0,65 ± 0,24	16,5 ± 0,3	1,60 ± 3,7
Lip-Trealose-AL	2:1	104,85 ± 8,4	0,05 ± 0,01	99,7 ± 0,5	- 2,50 ± 1,6
Lip-Trealose-PL	2:1	384,7 ± 123,7	0,42 ± 0,02	18,0 ± 13,1	0,10 ± 1,8

\* Os valores são expressos como média ± dp (n = 2).

## 4 Avaliação dos parâmetros de produção dos SpHL segundo método 2 (escala piloto)

### 4.1 Influência do número de ciclos de homogeneização e da pressão sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL

Os SpHL produzidos pelo método 2 apresentaram um diâmetro médio de aproximadamente 380 nm (i.p. = 0,66) logo após a hidratação do filme lipídico. A diluição da dispersão de SpHL não levou à alteração do diâmetro e distribuição da população das vesículas (Tabela 6). Quando submetidos à homogeneização sob pressão igual a 500 Bar após 3 ciclos, observou-se uma redução significativa no diâmetro das vesículas (115 nm) e a obtenção de uma dispersão lipossomal de maior homogeneidade (i.p. = 0,24). A distribuição do diâmetro das vesículas mostra que a totalidade da amostra possui tamanho inferior a 500 nm, sendo que 40 % possui diâmetro inferior a 100 nm. Com o acréscimo do número de ciclos para 9, observa-se um diâmetro médio igual a 94,5 nm, um ganho na homogeneidade da dispersão de lipossomas (i.p. = 0,19) e no valor absoluto da porcentagem da população de vesículas de diâmetro inferior a 100 nm (54,3 %). No entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre a distribuição de vesículas de diâmetro  $\leq 100$  nm com o emprego de 3, 6 e 9 ciclos ( $p > 0,05$ ). Ao se aumentar o número de ciclos para 12, não foram observadas alterações nestes resultados, sugerindo que foi alcançado o limite de redução do diâmetro das vesículas nas condições de pressão empregadas.

**Tabela 6 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 Bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL**

Número de ciclos*	Diâmetro médio (nm)	Índice de poli-dispersão (i.p.)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)			
			$\leq 100$ nm	$\leq 200$ nm	200-500	$\geq 500$ nm
0	381,8 $\pm$ 37,8	0,66 $\pm$ 0,01	4,10 $\pm$ 0,0	21,8 $\pm$ 7,8	41,2 $\pm$ 2,2	37,1 $\pm$ 9,9
3	115,0 $\pm$ 5,5	0,24 $\pm$ 0,05	40,2 $\pm$ 0,4	89,4 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
6	104,3 $\pm$ 6,4	0,23 $\pm$ 0,01	47,4 $\pm$ 10,4	92,0 $\pm$ 3,8	7,9 $\pm$ 3,8	0,1 $\pm$ 0,1
9	94,5 $\pm$ 15,8	0,19 $\pm$ 0,00	54,3 $\pm$ 20,5	96,1 $\pm$ 2,1	3,8 $\pm$ 2,1	0,0 $\pm$ 0,0
12	81,3	0,2	68,7	98,5	2,3	0,0

\*Os valores de 0 a 9 ciclos correspondem a média  $\pm$  dp (n = 2), enquanto que o 12º ciclo apresenta valores de n = 1.

Ao serem homogeneizados sob pressão igual a 1000 Bar (Tabela 7), após 3 ciclos, observou-se uma redução significativa no diâmetro das vesículas (87 nm) e a obtenção de uma dispersão lipossomal de maior homogeneidade (i.p. 0,2). A distribuição do diâmetro das vesículas mostra que a totalidade da amostra possui tamanho inferior a 500 nm, sendo que 55

% possui diâmetro inferior a 100 nm. Com o acréscimo do número de ciclos para 6, observa-se um diâmetro médio igual a 80,3 nm, uma dispersão lipossomal homogênea (i.p. = 0,2) e uma porcentagem de população de vesículas de diâmetro inferior a 100 nm igual a 69%, sendo estatisticamente diferente daquela obtida com o emprego de 3 ciclos ( $p < 0,001$ ). Ao se aumentar o número de ciclos para 12, não foram observadas alterações nestes resultados, sugerindo que foi alcançado o limite de redução do diâmetro das vesículas nas condições de pressão empregada. Entretanto, a utilização desta pressão levou a um aquecimento da amostra, atingindo a temperatura de 55 °C. Portanto, optou-se em empregar a homogeneização sob pressão a 500 Bar, por 9 ciclos, no preparo de SpHL-CDDP. Além disso, foi adicionado à essa formulação um agente antioxidante, o butilhidroxitolueno (BHT), em concentração igual a 0,01 % (p/p).

**Tabela 7 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 1000 Bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL**

Número de ciclos*	Diâmetro médio (nm)	Índice de poli-dispersão (i.p.)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)			
			≤ 100 nm	≤ 200 nm	200-500	≥ 500 nm
0	280,1 ± 7,1	0,4 ± 0,05	5,6 ± 2,7	27,0 ± 0,17	54,2 ± 0,06	18,8 ± 0,17
3	86,9 ± 1,3	0,2 ± 0,03	54,8 ± 0,2	95,7 ± 1,67	4,2 ± 1,67	0,0 ± 0,00
6	80,3 ± 1,1	0,2 ± 0,01	69,0 ± 0,1	97,5 ± 0,1	2,3 ± 0,00	0,0 ± 0,00
9	79,7	0,2	69,0	97,6	2,3	0,0
12	79,0	0,2	69,0	97,5	2,3	0,0

\* Os valores de 0 a 6 ciclos correspondem a média ± dp (n = 3), enquanto que os ciclos 9 e 12 apresentam valores de n = 1.

SpHL-CDDP foram submetidos a 9 ciclos de homogeneização sob pressão de 500 Bar, sendo obtidos lipossomas com diâmetro vesicular médio de 99 nm, monodispersos, com 52,6 % das vesículas menores que 100 nm e 100 % compreendidas abaixo de 500 nm, diâmetro limitante à administração parenteral (Tabela 8). A porcentagem de vesículas de diâmetro ≤ 100 nm foi significativamente maior com o emprego de 9 ciclos ao invés de 3 ciclos ( $p < 0,01$ ). Diante desses resultados, utilizou-se a pressão de 500 Bar e 9 ciclos para a produção de SpHL-CDDP, segundo o método 2, para proceder o teste de estabilidade.

**Tabela 8 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 Bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP**

Número de ciclos*	Diâmetro médio (nm)	Índice de poli-dispersão (i.p.)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)			
			≤ 100 nm	≤ 200 nm	200-500	≥ 500 nm
0	364,7 ± 51,0	0,7 ± 0,18	6,2 ± 2,5	22,7 ± 5,9	45,3 ± 5,7	31,9 ± 5,2
3	112,7 ± 4,1	0,2 ± 0,01	40,1 ± 0,1	89,3 ± 0,1	10,4 ± 0,0	0,1 ± 0,1
6	104,2 ± 2,9	0,2 ± 0,02	46,3 ± 7,9	90,0 ± 2,0	9,7 ± 2,0	0,1 ± 0,1
9	98,8 ± 3,6	0,2 ± 0,01	52,6 ± 5,6	93,8 ± 2,0	6,0 ± 2,0	0,0 ± 0,0

\*Os valores de 0 a 9 ciclos correspondem a média ± dp (n = 7).

#### 4.2 Avaliação do número de ciclos de ultrafiltração necessários para a separação da CDDP não encapsulada

A avaliação do número de ciclos necessários para a eliminação da CDDP não encapsulada com o uso da ultrafiltração está demonstrada na Tabela 9. Após 5 ciclos de ultrafiltração, a cisplatina não encapsulada, contida no permeado, não foi mais detectada. O processo de ultrafiltração foi eficiente na separação do material encapsulado do não encapsulado e foi utilizado na produção piloto para a purificação dos SpHL-CDDP obtidos segundo método 2.

**Tabela 9 - Influência do número de ciclos de ultrafiltração sobre a purificação dos SpHL-CDDP**

Número de ciclos	Concentração de CDDP no permeado (mg/mL)*
1	0,70 ± 0,10
2	0,30 ± 0,04
3	0,17 ± 0,03
4	0,08 ± 0,01
5	< L.D.**
6	< L.D.

\* Os valores de 1 a 6 ciclos correspondem a média ± dp (n = 7).

\*\* A concentração de CDDP foi menor que o limite de detecção (L.D.).

## 5 Caracterização físico-química de SpHL-CDDP obtidos segundo método 2

Para que os lipossomas sejam utilizados como carreadores de fármacos, estes devem apresentar diâmetro de vesícula definido e distribuição homogênea, pois esses parâmetros influenciam no seu comportamento biológico e na sua estabilidade. Os SpHL-CDDP, obtidos pelo método 2, foram monodispersos, com diâmetro médio vesicular menor que 100 nm e potencial zeta próximo a neutralidade. O teor de encapsulação ficou em torno de 13 % (Tabela 10). Esse teor de encapsulação foi menor do que aquele observado para os SpHL-CDDP calibrados por uso do método de extrusão (método 1). Considerando que a distribuição percentual de vesículas de diâmetro  $\leq 200$  nm é igual com o emprego de 3 e 6 ciclos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8), seria interessante avaliar num estudo futuro, a possibilidade de se obter um aumento do teor de encapsulação de CDDP em SpHL-CDDP mediante a redução do número de ciclos de homogeneização a 500 Bar (3 ciclos).

**Tabela 10 - Caracterização físico-química dos SpHL-CDDP obtidos pelo método 2\***

Teor de encapsulação (%)	Diâmetro das vesículas (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Potencial Zeta(mV)
12,9 ± 2,30	99,0 ± 3,9	0,20 ± 0,01	2,1 ± 2,9

\*Os valores apresentados correspondem a média ± dp (n = 7).

## 6 Influência da presença de crioprotetores sobre as características físico-químicas dos SpHL-CDDP liofilizados obtidos pelo método 2

Para a avaliação da influência dos crioprotetores nos SpHL-CDDP, preparados em escala piloto, foram utilizadas a relação crioprotetor:fosfolípide de 1:1 (p/p) para a sacarose e de 2:1 (p/p), para a trealose. Na ausência de uma substância crioprotetora, o diâmetro médio das vesículas após a ressuspensão do pó foi de aproximadamente 470 nm, com índice de polidispersão de 0,50 (Tabela 11). Na presença dos crioprotetores, o aumento do tamanho das vesículas após a reconstituição do liofilizado foi significativamente menor com o uso da trealose, nos quais o diâmetro médio das vesículas sofreu um menor aumento, dobrando o valor do diâmetro médio em relação as amostras antes da liofilização.

Para as amostras liofilizadas na ausência de crioprotetores ou utilizando sacarose (razão crioprotetor:fosfolípide 1:1 p/p), ocorreu aumento do diâmetro das vesículas na ordem de 5

vezes. A distribuição percentual de vesículas abaixo de 200 nm foi de 12-14 % e menores de 500 nm variou de 37 a 44 %.

**Tabela 11 - Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-CDDP obtidos pelo método 2**

Amostra*	Razão Crioprotetor: Fosfolípide (p/p)	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Distribuição percentual do diâmetro das vesículas		
				≤ 200	200-500	≥ 500
Lip-S/Crio-AL	-	99 ± 4	0,20 ± 0,01	94 ± 2	6 ± 2	0 ± 0
Lip-S/Crio-PL	-	470 ± 15	0,50 ± 0,18	12 ± 5	43 ± 4	44 ± 0
Lip-Sacarose-PL	1:1	410 ± 39	0,43 ± 0,08	14 ± 4	49 ± 7	37 ± 8
Lip-Trealose-PL	2:1	192 ± 10	0,46 ± 0,06	56 ± 0	37 ± 3	7 ± 3

\*Os valores indicados representam a média ± dp (n = 4), exceto para Lip-S/Crio cujo n = 7.

Os resultados obtidos indicam que SpHL-CDDP para fins de administração intravenosa, em maior volume, podem ser preparados empregando-se as etapas de evaporação sob pressão reduzida da emulsão O/A, seguida de homogeneização sob alta pressão e ultrafiltração nas condições avaliadas. A homogeneização sob alta pressão e a extrusão foram as duas técnicas utilizadas neste trabalho para a calibração e redução do diâmetro das vesículas dos lipossomas. Em comparação com a extrusão, a homogeneização sob alta pressão é mais promissora para a produção em larga escala em função da facilidade de manuseio e rapidez do processo.

## 7 Estudo da estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP

A estabilidade de armazenamento dos SpHL-CDDP, sob as formas líquida (dispersão lipossomal) e liofilizada, obtidos pelo método 2, foi avaliada quanto ao diâmetro das vesículas, potencial zeta e teor de encapsulação.

### 7.1 Determinação do diâmetro das vesículas e potencial zeta de SpHL-CDDP durante o armazenamento

De acordo com os resultados apresentados na tabela 12, observou-se que após o processo de liofilização/rehidratação, ocorreu aumento significativo, da ordem de 5 vezes, do

diâmetro médio das vesículas liofilizadas na ausência de crioprotetores ( $p < 0,001$ ) em relação à dispersão lipossomal. A dispersão lipossomal, cuja distribuição de diâmetro era homogênea antes de ser submetida à liofilização (i.p. = 0,2), apresentou-se heterogênea após a rehidratação (i.p. = 0,5). Pode-se verificar que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diâmetros médios e potencial zeta dos SpHL-CDDP, após o processo de liofilização/rehidratação, das vesículas ressuspensas, ao longo de 60 dias de armazenamento. Na ausência de crioprotetores, os lipossomas sofreram agregação e/ou fusão das vesículas, resultando no aumento do diâmetro médio após a rehidratação do material liofilizado. Em relação aos valores de potencial zeta, não foram observadas alterações ao longo do tempo de armazenamento.

**Tabela 12 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na ausência de crioprotetores**

Amostra*	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão (i.p.)	Distribuição percentual do diâmetro das vesículas			Potencial zeta (mV)
			≤ 200	200-500	≥ 500	
Lip-S/Crio-AL	99 ± 3,6	0,2 ± 0,0	94 ± 2,0	6 ± 2,0	0 ± 0,0	2,8 ± 3,5
Lip-S/Crio-PL d 0	470 ± 14,5	0,5 ± 0,2	12 ± 4,5	43 ± 4,2	44 ± 0,4	1,5 ± 2,0
Lip-S/Crio-PL d 7	501 ± 29,0	0,4 ± 0,1	8 ± 2,3	44 ± 8,3	48 ± 7,2	1,4 ± 1,5
Lip-S/Crio-PL d 15	473 ± 27,5	0,5 ± 0,1	11 ± 3,9	45 ± 3,7	44 ± 0,4	3,0 ± 1,8
Lip-S/Crio-PL d 30	457 ± 48,2	0,5 ± 0,1	13 ± 4,4	39 ± 0,0	44 ± 0,1	1,5 ± 2,4
Lip-S/Crio-PL d 60	490 ± 10,2	0,4 ± 0,1	7 ± 2,3	48 ± 2,2	45 ± 0,2	2,2 ± 1,6

\*As denominações d0, d7, d15, d30 e d60 referem-se aos dias 0, 7, 15, 30 e 60 após o preparo dos SpHL-CDDP liofilizados. Os valores indicados representam a média ± dp (n = 3).

Na tabela 13 estão apresentados os resultados relativos ao estudo de variação do diâmetro dos SpHL-CDDP ao longo do tempo de armazenamento em que foi utilizada a sacarose, na razão crioprotetor:fosfolípide 1:1. A sacarose não exerceu a ação crioprotetora desejada, visto que o diâmetro das vesículas aumentou significativamente ( $p < 0,001$ ) após rehidratação do pó liofilizado, comportando-se de maneira semelhante aos SpHL-CDDP produzidos na ausência de crioprotetores. A distribuição percentual das vesículas de SpHL-CDDP menores que 200 nm, tanto em SpHL-CDDP preparados sem ou com sacarose é menor que 14 %. A concentração de sacarose utilizada não foi efetiva para a crioproteção almejada. Como observado anteriormente na ausência de crioprotetor, o potencial zeta dos SpHL-CDDP

preparados na presença de sacarose também não mostrou alteração ao longo do tempo de armazenamento.

**Tabela 13 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na presença de sacarose**

Amostra*	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Distribuição percentual do diâmetro das vesículas			Potencial zeta (mV)
			≤ 200	200-500	≥ 500	
Lip-Sac-AL	99 ± 3,6	0,2 ± 0,0	94 ± 2,0	6 ± 2,0	0 ± 0,0	3,2 ± 4,7
Lip-Sac-PL d 0	410 ± 38,7	0,4 ± 0,1	14 ± 3,8	48 ± 6,7	37 ± 8,2	0,5 ± 4,5
Lip-Sac-PL d 7	454 ± 45,7	0,3 ± 0,1	8 ± 6,5	52 ± 3,6	41 ± 7,3	1,5 ± 2,4
Lip-Sac-PL d 15	510 ± 53,8	0,5 ± 0,2	9 ± 5,1	39 ± 6,3	52 ± 8,8	0,7 ± 6,4
Lip-Sac-PL d 30	414 ± 16,9	0,5 ± 0,1	14 ± 3,8	43 ± 7,0	41 ± 6,8	0,6 ± 1,2
Lip-Sac-PL d 60	409 ± 24,1	0,4 ± 0,1	14 ± 3,8	48 ± 6,7	37 ± 7,9	2,4 ± 1,2

\*Os valores indicados representam a média ± dp (n = 4).

Entretanto, o uso da trealose como crioprotetor permitiu um maior controle do diâmetro das vesículas de SpHL-CDDP após a liofilização/rehidratação como indicado na Tabela 14. Apesar do aumento significativo, da ordem de 2 vezes, do diâmetro médio das vesículas em relação à dispersão lipossomal ( $p < 0,001$ ), o mesmo é menor do que o observado na presença de sacarose (quatro vezes maior). A dispersão lipossomal de SpHL-CDDP apresentou-se heterogênea (i.p. = 0,5), no entanto a maioria das vesículas apresentaram diâmetro igual ou inferior a 500 nm (93%), o que é importante para a garantia de segurança de uma administração endovenosa e para a eficácia antitumoral. Com o uso da sacarose como crioprotetor, foi observado um percentual elevado de vesículas com diâmetro superior a 500 nm (37 %). Ao longo do tempo de armazenamento, pode-se verificar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diâmetros médios e potencial zeta dos SpHL-CDDP preparados na presença de trealose, após o processo de liofilização/rehidratação.

**Tabela 14 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP liofilizados na presença de trealose**

Amostra*	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Distribuição percentual do diâmetro das vesículas			Potencial zeta (mV)
			≤ 200	200-500	≥ 500	
Lip-Tre-AL	99 ± 3,6	0,2 ± 0,0	94 ± 2,0	6 ± 2,0	0 ± 0,0	2,4 ± 3,8
Lip-Tre-PL d 0	192 ± 10,3	0,5 ± 0,1	56 ± 0,1	37 ± 3,0	7 ± 2,9	3,1 ± 1,9
Lip-Tre-PL d 7	199 ± 17,6	0,5 ± 0,0	52 ± 7,5	39 ± 7,0	8 ± 2,3	2,4 ± 2,3
Lip-Tre-PL d 15	210 ± 32,0	0,5 ± 0,1	45 ± 7,4	42 ± 4,6	10 ± 6,3	2,1 ± 2,4
Lip-Tre-PL d 30	192 ± 10,2	0,5 ± 0,1	56 ± 0,2	33 ± 5,9	8 ± 3,0	2,4 ± 1,3
Lip-Tre-PL d 60	191 ± 11,9	0,4 ± 0,1	56 ± 0,2	38 ± 2,6	6 ± 2,5	3,3 ± 1,6
Lip-Tre-PL d 135	181 ± 9,3	0,5 ± 0,1	56 ± 0,0	37 ± 3,1	8 ± 3,0	N.D.

\*A denominação d135 refere-se ao 135º dia após o preparo dos SpHL-CDDP liofilizados. N.D. significa valores não determinados. Os valores indicados representam a média ± dp (n = 4).

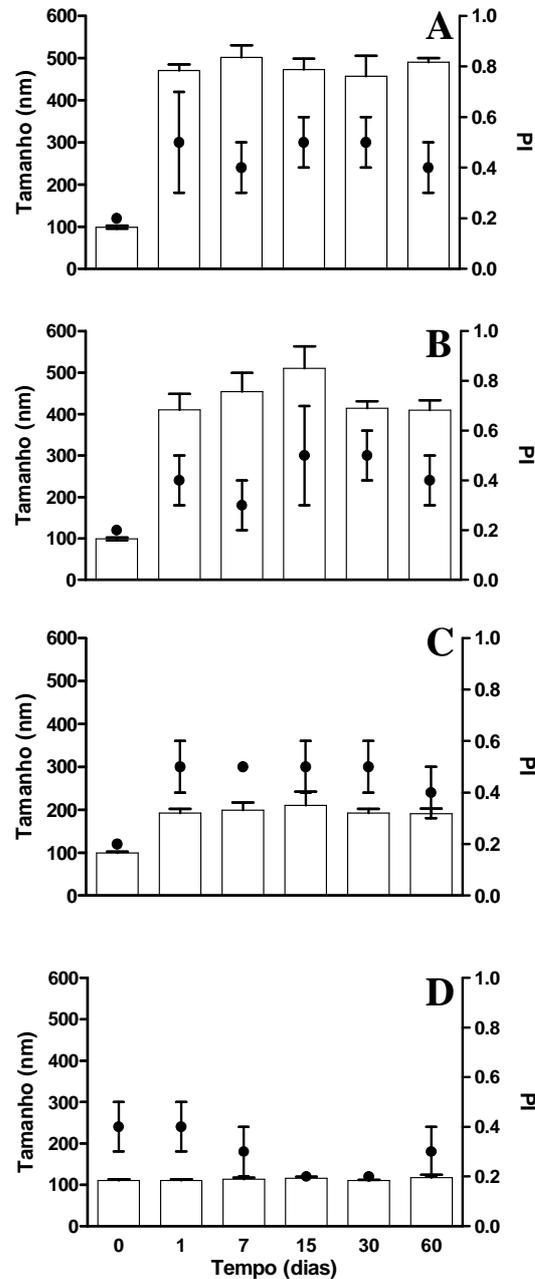
A variação do diâmetro e potencial zeta da preparação líquida de SpHL-CDDP foi também acompanhada ao longo do tempo para fins de comparação com sua forma liofilizada. Conforme descrito na Tabela 15, pode-se observar que a dispersão líquida de SpHL-CDDP não sofreu alteração do diâmetro das vesículas durante o período de armazenamento de 135 dias. O diâmetro médio manteve-se em torno de 110 nm. A distribuição percentual de vesículas menores de 500 nm foi igual a 100 %. O potencial zeta da preparação líquida de SpHL-CDDP também se manteve constante ao longo do tempo de armazenamento. Possivelmente isso se deve à presença de DSPE-PEG<sub>2000</sub> na formulação de SpHL-CDDP contribuindo para a estabilização das vesículas. A mobilidade eletroforética de SpHL-CDDP é muito baixa ( $< 0,5 \mu\text{ms}^{-1}/\text{Vcm}^{-1}$ ), apesar da presença de CHEMS que confere uma carga negativa à superfície dos lipossomas. Os valores da mobilidade eletroforética são coerentes com os valores descritos na literatura quando da utilização de DSPE-PEG<sub>2000</sub> na concentração de 5 % (WOODLE *et al.*, 92). Além disso, convém ressaltar que a inalteração desses dados demonstram que as cadeias de polietilenoglicol não foram afetadas pelo processo de liofilização/rehidratação e no armazenamento de SpHL-CDDP.

**Tabela 15 - Avaliação da estabilidade do diâmetro e potencial zeta de SpHL-CDDP armazenados na forma líquida**

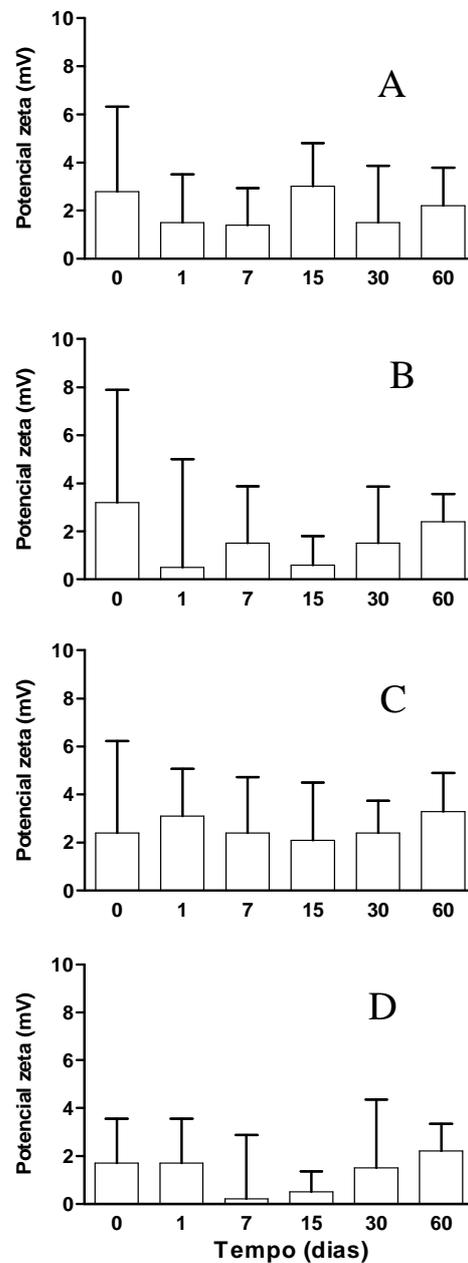
Amostra	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (i.p.)	Distribuição percentual do diâmetro das vesículas			Potencial zeta (mV)
			≤ 200	200-500	≥ 500	
Lip-Dispersão d 0	110 ± 3,9	0,2 ± 0,0	89 ± 0,1	11 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,7 ± 1,9
Lip-Dispersão d 7	113 ± 4,5	0,2 ± 0,0	89 ± 0,1	11 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 2,7
Lip-Dispersão d 15	116 ± 3,9	0,2 ± 0,0	89 ± 0,1	11 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,9
Lip-Dispersão d 30	110 ± 2,0	0,2 ± 0,0	89 ± 0,1	11 ± 0,1	0,0 ± 0,1	1,5 ± 2,9
Lip-Dispersão d 60	117 ± 7,8	0,3 ± 0,1	87 ± 4,8	13 ± 4,3	0,4 ± 0,5	2,2 ± 1,2
Lip-Dispersão d 135	118 ± 4,8	0,3 ± 0,1	84 ± 4,7	16 ± 4,7	0,4 ± 0,5	N.D.

\*Os valores indicados representam a média ± dp (n = 3).

Portanto, em todas as formulações de SpHL-CDDP avaliadas (liofilizada e líquida) não foram observadas modificações do diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta durante o seu armazenamento por até 60 ou 135 dias. As figuras 15 e 16 mostram o sumário desse conjunto de dados.



**Figura 15 – Variação do diâmetro das vesículas e do índice de polidispersão de SpHL-CDDP durante um período de até 60 dias de armazenamento. (A) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na ausência de crioprotetor; (B) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na presença de sacarose (relação sacarose:fosfolípide 1:1 p/p) (C) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na presença de trealose (relação trealose:fosfolípide 2:1 p/p) e (D) SpHL-CDDP na forma líquida. O tempo 0 representa as amostras antes da liofilização (exceto para D) e o tempo 1 representa o dia em que as amostras foram ressuspensas.**



**Figura 16 – Variação do potencial zeta de SpHL-CDDP durante um período de até 60 dias de armazenamento. (A) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na ausência de crioprotetor; (B) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na presença de sacarose (relação sacarose:fosfolípide 1:1 p/p) (C) SpHL-CDDP liofilizados e rehidratados na presença de trealose (relação trealose:fosfolípide 2:1 p/p) e (D) SpHL-CDDP na forma líquida. O tempo 0 representa as amostras antes da liofilização (exceto para D) e o tempo 1 representa o dia em que as amostras foram ressuspensas.**

A partir da observação do melhor efeito crioprotetor, conseguido com o emprego de trealose, foi investigada também a estabilidade relativa à retenção de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP após 135 dias de armazenamento. Os SpHL-CDDP liofilizados na presença de trealose conseguiram manter o fármaco encapsulado de forma mais eficiente do que a formulação líquida ( $p < 0,05$ ) (Tabela 16). Portanto, a prevenção da agregação e/ou fusão das vesículas observada nos estudos de estabilidade do diâmetro das vesículas parece não impedir o extravasamento da CDDP encapsulada nos SpHL-CDDP. No entanto, o processo de preparo de SpHL-CDDP sob a forma liofilizada contribuiu com a otimização desse parâmetro de estabilidade da preparação lipossomal.

**Tabela 16 - Avaliação do teor de liberação de CDDP a partir de SpHL-CDDP após 135 dias de armazenamento**

<b>Amostra*</b>	<b>Teor de liberação (%)</b>
Lip-Trealose	4,0 ± 1,0
Lip-Dispersão	14,3 ± 3,5

\*Os valores indicados representam a média ± dp de dois (Lip-Dispersão) ou três experimentos (Lip-Trealose).

## **8 Por que a trealose é mais eficiente do que a sacarose no controle do diâmetro dos SpHL-CDDP?**

A crioproteção oferecida pelos solutos é influenciada pela temperatura de transição de fase dos lípides ( $T_m$ ) e pela temperatura de transição vítrea dos crioprotetores ( $T_g$ ) (CROWE *et al.*, 1994). A utilização de crioprotetores durante a liofilização deve observar a  $T_g$  do soluto empregado como tal, a fim de preservar a natureza porosa do liofilizado.

A secagem primária do processo de liofilização deve ser feita a aproximadamente 4 °C abaixo da  $T_g$  dos crioprotetores (MOHAMMED *et al.*, 2006). Estudos de Roos e colaboradores (1997) demonstraram que em soluções aquosas crioconcentradas, a sacarose (concentração máxima de soluto igual a 81,7 % p/p) apresentou uma  $T_g$  igual - 46 °C, enquanto que a trealose (concentração máxima de soluto igual a 81,6 % p/p) apresentou  $T_g$  igual a - 40 °C. Em virtude da maior habilidade da trealose em controlar o diâmetro das vesículas de SpHL-CDDP, pode-se sugerir que a trealose apresentava  $T_g$  acima da temperatura empregada na liofilização, mantendo-se como uma matriz vítrea. Por sua vez, a sacarose presente nos SpHL-CDDP deve

apresentar Tg abaixo ou igual a temperatura empregada na secagem primária, já que apresentou propriedades semelhantes às amostras liofilizadas na ausência de uma substância crioprotetora. Crowe e colaboradores (1996) observaram que amostras de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de ovo na presença de sacarose como crioprotetor (razão lípide:açúcar 1:1 p/p) atingiram menor temperatura de transição vítrea e de uma maneira mais rápida durante a hidratação do que com o emprego de trealose (razão lípide:açúcar 1:1 p/p). Portanto a sacarose apresentou menor capacidade de manutenção da matriz vítrea, a qual é importante para o controle do diâmetro das vesículas. Os valores de Tg são inversamente proporcionais ao teor de umidade da amostra, ou seja, a medida que a amostra é hidratada, os valores da temperatura de transição vítrea diminuem (CROWE *et al.*, 1998). Durante o processo de rehidratação do liofilizado, o menor aumento do diâmetro em Lip-trealose (o diâmetro dos lipossomas com trealose aumentou 2 vezes em relação aos SpHL-CDDP antes da liofilização) do que em Lip-sacarose (o diâmetro dos lipossomas com sacarose aumentou 4 vezes em relação aos SpHL-CDDP antes da liofilização) pode ser devido ao fato de que a medida que a trealose é hidratada, grande parte da água absorvida leva à formação da trealose dihidratada, que é responsável pela maior temperatura de transição vítrea deste dissacarídeo. Em oposição, a absorção da água pela sacarose resulta em um decréscimo da Tg, de modo que essa temperatura pode ser mais facilmente atingida durante o processo, desestabilizando a matriz vítrea de sacarose (CROWE *et al.*, 1996).

Deste modo, além da maior Tg apresentada pela trealose, podem ser ressaltadas outras vantagens que são importantes para sua eficácia crioprotetora, como sua baixa higroscopicidade, a ausência de ligações de hidrogênio internas que permite maior flexibilidade para a formação de ligações de hidrogênio durante a liofilização e reatividade química muito baixa (ABDELWAHED, 2006).

Embora a manutenção da matriz vítrea seja necessária para a estabilização dos lipossomas no estado desidratado, isto não é por si só suficiente. A diminuição da Tm dos fosfolípides desidratados também é necessária para a manutenção da estabilidade dos lipossomas. A presença de crioprotetores pode prevenir o aumento na permeabilidade da bicamada e extravasamento do material encapsulado durante a rehidratação. Sabe-se que dissacarídeos, como trealose e sacarose, interagem com os grupos polares dos fosfolípides, deprimindo a Tm e mantendo o fosfolípide em um estado fluido após a desidratação (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Quando a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é desidratada na ausência de crioprotetores, sua Tm aumenta de 42 °C (estado hidratado) para 120 °C. A presença dos dissacarídeos sacarose e trealose impedem essa elevação brusca da Tm do DPPC durante o

processo de liofilização, e ambos atuam diminuindo essa temperatura para 24 °C (CROWE *et al.*, 1998). Dessa forma, sugere-se que no presente trabalho, estes açúcares atuem de maneira semelhante, diminuindo a  $T_m$  dos lípides da formulação (DOPE e DSPE-PEG<sub>2000</sub>) e, portanto, impedindo a perda da CDDP encapsulada nos SpHL-CDDP. Os mecanismos de ação da sacarose e da trealose são diferentes, provavelmente devido à estereoquímica dos grupos hidroxila da sacarose dispostos nas posições equatorial e axial. Entretanto, sob condições drásticas, nas quais a água é completamente removida, os dois açúcares atuam de maneira semelhante (LUZARDO *et al.*, 2000).

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dessa dissertação de mestrado foi proposto um processo de preparação piloto de SpHL-CDDP, o qual é constituído pelas etapas sucessivas de evaporação em fase reversa, homogeneização sob alta pressão e ultrafiltração. Com o emprego de uma pressão de 500 Bar durante nove ciclos na etapa de calibração dos SpHL-CDDP, seguido de ultrafiltração por quatro ciclos, é possível obter uma preparação lipossomal monodispersa com diâmetro médio igual a 99 nm. No entanto, consideramos que é interessante a otimização do teor de encapsulação de CDDP nos SpHL-CDDP, uma vez que o teor encontrado foi igual a 13,0 %. Uma investigação a ser proposta é o emprego de somente 3 ciclos na etapa de homogeneização sob alta pressão a 500 e 1000 Bar. Isto se justifica devido ao fato de se ter observado que não existe diferença da distribuição de tamanho das vesículas de SpHL com o emprego de 3 ou 9 ciclos a 500 Bar. Em relação à obtenção de uma população de SpHL de diâmetro  $\leq 100$  nm foi observada uma diferença estatística com o uso de 500 Bar ( $40,2 \pm 0,4$  %) e 1000 Bar ( $54,8 \pm 0,2$  %) durante 3 ciclos ( $p < 0,001$ ). Isto motiva igualmente a avaliação do emprego da homogeneização sob pressão a 1000 Bar, o que poderá contribuir com uma maior população de vesículas de SpHL-CDDP de diâmetro  $\leq 200$  nm após a liofilização/rehidratação.

O emprego de crioprotetor, em especial a trealose, foi de extrema importância para o controle do diâmetro das vesículas após o processo de liofilização/rehidratação. É importante ressaltar que o processo de liofilização não comprometeu a retenção da CDDP encapsulada nas vesículas, não sendo portanto, observada liberação da mesma após a ressuspensão do liofilizado. Apesar da quase totalidade das vesículas de SpHL-CDDP apresentar diâmetro inferior a 500 nm com o uso da trealose como crioprotetor, convém avaliar a função crioprotetora de outras substâncias para a obtenção exclusiva de uma população de SpHL-CDDP de diâmetro  $\leq 200$  nm para o tratamento de tumores que não permitem o extravasamento vascular de partículas maiores.

Em relação à estabilidade física, os SpHL-CDDP na forma líquida e liofilizada apresentaram manutenção do diâmetro médio e potencial zeta das vesículas durante 135 dias de armazenamento. Entretanto, a forma lipossomal liofilizada foi mais eficiente quanto a retenção da CDDP encapsulada durante o tempo de armazenamento. Para o estudo da estabilidade química, outros parâmetros como a degradação por reações de hidrólise e oxidação, devem ser investigados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMSELEM, S.; GABIZON, A.; BARENHOLZ, Y. Optimatization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 79, n. 12, p. 1045-1052, 1990.
- ARCON, I.; KODRE, A.; ABRA, R.M.; HUANG, A.; VALLNER, J.J.; LASIC, D.D. EXAFS study of liposome-encapsulated cisplatin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, n. 33, p. 199-204, 2004.
- ARMSTRONG, D.K.; BUNDY, B.; WENZEL, L.; HUANG, H.Q.; BAERGEN, R.; LELE, S.; COPELAND, L.J.; WALKER, J.L.; BURGER, R.A. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, n. 354, p. 34-43, 2006.
- AULTON, M.E. Secagem. In: *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre:Editora Artmed, 2005, Cap. 26, p. 384-401.
- BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.
- BARNADAS-RODRIGUÉZ, R., SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 213, p. 175-186, 2001.
- BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 223, p. 55-68, 2001.
- BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). *Oncology Reports*, n. 10, p. 1663-1682, 2003.
- BOULIKAS, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncology reports*, n.12, p. 3-12, 2004.
- BURGER, K.N.J.; STAFFHORST, R.W.H.M.; VIJLDER, H.C.; VELINOVA, M.J.; BOMANS, P.H.; FREDERIK, P.M.; KRUIJFF, B. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity, *Nature Medicine*, v. 8, n. 1, p. 81-84, 2002.

CACELA, C.; HINCHA, D.K. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes, *Biophysical Journal*, v. 90, p. 2831-2842, 2006.

CANNON, J.B.; MARTIN, C.; DRUMMOND, G.S.; KAPPAS, A. Targeted delivery of a heme oxygenase inhibitor with a lyophilized Liposomal tin mesoporphyrin formulation. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 5, p. 715-721, 1993.

CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, n. 125, p. 139-146, 2003.

CHOW, C.; HEATH, T.D. Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1239, p.168-176, 1995.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; WISTROW, C.A. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal*. v. 242, p. 1-10, 1987.

CROWE, J.H.; LESLIE, S.B.; CROWE, L.M. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology*, v. 31, p. 355-366, 1994.

CROWE, L.M.; REID, D.S.; CROWE, J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, v. 71, p. 2087-2093, 1996.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, v. 60, p. 73-103, 1998.

DRISCOLL, D.F. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 9, p. 1959-1969, 2006.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. In: *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, cap. 7, p. 345-411.

FONTES, A.P.S.; CESAR, E.T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 6, p. 13-18, 2005.

FOURNIER, C., HECQUET, B., BASTIAN, G., KHAYAT, D. Modification of the physicochemical and pharmacological properties of anticancer platinum compounds by commercial 5-fluoracil formulations: a comparative study using cisplatin and carboplatin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 29, n. 6, p. 461-466, 1992.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Biological Research*, n. 32, p. 181-189, 1999.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL, A.A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 291, p. 79-86, 2005.

GOEL, R.; CLEARY, S.M.; HORTON, C.; KIRMANI, S.; ABRAMSON, I.; KELLY, C.; HOWELL, S.B. Effect of sodium thiosulfate on the pharmacokinetics and toxicity of cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 81, n. 20, p. 1552-1560, 1989.

GUILLOT, T., SPIELMANN, M., KAC, J. et. al. Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, v. 102, n. 3, p. 311-319, 1992.

GULINO, P.M., GRANTHAM, F.H., SMITH, S.H., HAGGERTY, A. C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 34, p. 857-869, 1967.

HASKELL, R. J.; SHIFFLETT, J. R.; ELZINGA, P. A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: Benita, S. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*. [s. l.]: Harwood academic publishers, p. 8-19, 1998.

HINCHA, D.K., HAGEMANN, M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, n. 383, p. 277-283, 2004.

HRIBASCHEK, A.; KNHN, R.; PROSA, M.; LIPPERT, H.; HALANGK, W.; BOLTZE, C.; RIDWELSKI, K. Prophylaxis of peritoneal carcinomatosis in experimental investigations. *International Journal of colorectal disease*, n. 16, p. 340-345, 2001.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <[www.inca.gov.br/estimativa](http://www.inca.gov.br/estimativa)>. Acesso em 22/09/2006.

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, n. 146, p. 1-53, 2003.

JEFFS, L.B.; AMBEGIA, E.G.; GIESBRECHT, C.; EWANICK, S.; MACLACHLAN, I. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharmaceutical Research*, v. 22, n. 3, 2005.

JÚNIOR, A.D.C.; VIEIRA, F.P.; MELO, V.J.M.; LOPES, M.T.P.; SILVEIRA, J.N.; RAMALDES, G.A.; GARNIER-SUILLEROT, A.; PEREIRA-MAIA, E.C.; OLIVEIRA, M.C. Preparation and cytotoxicity of cisplatin loaded liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 40. p. 1149-1157, 2007a.

JÚNIOR, A.D.C.; MOTA, L.G.; NUNAN, E.A.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; LEAL, A.L.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Erlich tumor-bearing mice. *Life Sciences*, v. 80, p. 659-664, 2007b.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. A célula Cancerosa. In: *A Célula Biologia Celular e Molecular*, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 16, p. 292-303.

KONDAGUNTA, G.V.; BACIK, J.; DONADIO, A.; BAJORIN, D.; MARION, S.; SHEINFELD, J.; BOSL, G. J.; MOTZER, R.J. Combination of paclitaxel, ifosfamide and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, p. 6549-6555, 2005.

KUMAGAI, S.; SUGIYAMA, T.; NISHIDA, T.; USHIJIMA, K.; YAKUSHIJI, M. Improvement of intraperitoneal chemotherapy for rat ovarian cancer using cisplatin-containing microspheres, *Japanese Journal of Cancer Research*, n.87, p. 412-417, 1996.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.

LE CHEVALIER, T., BRISGAND, D., DOULLIARD, J.Y. Randomized trial of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: Results of a European multicenter trial including 612 patients. *Journal of Clinical Oncology*, v. 12, p. 360-367, 1994.

LUZARDO, M.C.; AMALFA, F.; NUÑEZ, A.M.; DÍAZ, S.; LOPEZ, A.C.B.; DISALVO, E.A. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers. *Biophysical Journal*, v. 78, p. 2452-2458, 2000.

MALVERN INSTRUMENTS. PCS theory. In: Zetasizer theory manual. Inglaterra, 1996a, p. 1.1-1.10.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential: Theory of operation. In: Zetasizer theory manual. Inglaterra, 1996b, p. 2.1-2.6.

MARTINDALE: The Extra Pharmacopoeia, London: The Pharmaceutical Press, 34 ed., p. 538-539, 2005.

McMULLEN, T.P.W.; LEWIS, R.N.A.H.; McELHANEY, R.N. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry*, n. 32, p. 516-522, 1993.

MOHAMMED, A.R.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Amino acids as cryoprotectants for Liposomal delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 30, p. 406-413, 2007.

MOHAMMED, A.R.; BRAMWELL, V.W.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilization of Liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods*, n. 40, p. 30-38, 2006.

MONTI, E.; GARIBOLDI, M.; MAIOCCHI, A.; MARENGO, E.; CASSINO, C.; GABANO, E.; OSELLA, D. Citotoxicity of cis-platinum(II) conjugate models. The effect of chelating

arms and leaving groups on cytotoxicity: a quantitative structure-activity relationship approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, n.3, v.48, p.857-866, 2005.

MUGGIA, F.M.; FOJO, T. Platinums: extending their therapeutic spectrum. *J Chem.*, v. 16, p. 77-82, 2004.

NEW, R. R. Introduction. In: *Liposomes a practical approach*. R.R.C. New, England:Oxford University Press, Cap. 1, p. 1-31, 1990.

NEWMAN, M. S., COLBERN, G. T., WORKING, P. K., ENGBERS, C., AMANTEA, M. A. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 43, p. 1-7, 1999.

NISHIYAMA, N.; OKAZADI, S.; CABRAL, H.; MIYAMOTO, M.; KATO, Y.; SUGIYAMA, Y.; NISHIO, K.; MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Novel cisplatin incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer research*, v. 63, p. 8977-8983, 2003.

OLIVEIRA, M. C., BOUTET, V., FATTAL, E., BOQUET, D., GROGNET, J. M., COUVREUR, P., DEVERRE, J. R., Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sciences*, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

PAPAHADJOPOULOS, D.; GABIZON, A.A. Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. In: PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. *Liposomes as tools in basic research and industry*. CRC Press. 1995. Cap. 11, p. 177-188.

PAYNE, N.I.; TIMMINS, P.; AMBROSE, C.V.; WARD, M.D.; RIDGWAY, F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 4, p. 325-329, 1986.

PHILLIPS, W.T.; MEDINA, L.A.; KLIPPER, R.; GOINS, B. A novel approach for the increased delivery of pharmaceutical agents to peritoneum and associated lymph nodes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, n. 1, v. 3, p. 11-16, 2002.

RAMACHANDRAN, S.; QIST, A.P.; KUMAR, S.; LAL, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy : AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir*, n. 22, p. 8156-8162, 2006.

RICKER, J.V.; TSVETKOVA, N.M.; WOLKERS, W.F.; LEIDY, C.; TABLIN, F.; LONGO, M.; CROWE, J.H. Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. *Biophysical Journal*, v. 84, p. 3045-3051, 2003.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M.A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 25, p. 81-89, 2005.

SAHOO, S.K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, n. 24, v. 8, p. 1112-1120, 2003.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 56, p. 947-965, 2004.

SIEGEL, D.P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. *Biophysical Journal*, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SHIRAZI, F. H., MOLEPO, J. M., STEWART, D. J., RAAPHORST, G. P., GOEL, R. Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 140, p. 211-218, 1996.

STATHOPOULOS, G.P.; BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M.; RIGATOS, S.K.; STATHOPOULOS, J.G. Liposomal cisplatin combined with gemcitabine in pretreated advanced pancreatic cancer patients: a phase I-II study. *Oncology Reports*, n. 15, p. 1201-1204, 2006.

STUBBS, M., Mc SHEEHY, P.M.J., GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 39, n. 1, p. 13-30, 1999.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Liposome as Pharmaceutical Dosage Forms. In: DEKKER, M. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. V. 9. New York. 1994. Cap. 1, p. 1-39.

TAMURA, T.; IMAI, J.; MATSUMOTO, A.; TANIMOTO, M.; SUZUKI, A.; HORIKIRI, T.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H.; IKE, O. Organ distribution of cisplatin after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n. 54, p. 1-7, 2002.

THE UNITED States Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1999, 2569 p.

THOMPSON, J.E. In: *A practical guide to contemporary pharmacy practice*, Lippincott, Williams & Wilkins Inc., 1 ed., 1998.

TRISSEL, L. A., MARTINEZ, J. F. Compatibility of thiotepa (lyophilized) with selected drugs during simulated y-site administration. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 53, p. 1041-1051, 1996.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, n. 2, v. 22, p. 129-150, 2002.

VAN WINDEN, E.C.A.; ZHANG, W.; CROMMELIN, D.J.A.; Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration, *Pharmaceutical Research*, v.14, n. 9, p. 1151-1160, 1997.

VELINOVA, M.J.; STAFFHORST, R.W.H.M.; MULDER, W.J.M.; DRIES, A.S.; JANSEN, B.A.J.; KRUIJFF, B.; KROON, A.I.P.M. Preparation and stability of lipid-coated nanocapsules of cisplatin: anionic phospholipid specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1663, p.135-142, 2004.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Development and characterization of a liposome preparation by a pH-gradient method. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n. 46, p. 778-783, 1994.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, n. 70, p. 95-111, 1995.

WAGNER, A.; VORAUER-UHLB, K.; KATINGERB, H.; Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 213-219, 2002.

WOODLE, M.C.; COLLINS, L.R.; SPONSIER, E.; KOSSOVSKY, N.; PAPAHADJOPOULOS, D.; MARTIN, F.J. Sterically stabilized liposomes: Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophysical Journal*, v. 61, p. 902-910, 1992.

XU, P.; VAN KIRK, E.A.; LI, S.; MURDOCH, W.J.; ZHAN, Y.; ISAAK, D.D.; RADOSZ, M.; SHEN, Y. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles, *Biomacromolecules*, n. 7, p. 829-835, 2006.

YANG, D.; ZHU, J.; ZHENG, Y.; GE, L. Preparation, characterization, pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes, *Drug development and industrial pharmacy*, v. 32, p. 219-227, 2006.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. *Cancer research*, v. 55, p. 3752-3756, 1995.

ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. *Journal of liposome research*, n. 10, v. 1, p. 73-80, 2000.

ZAMBONI, W.C.; GERVAIS, A.C.; EGORIN, M.J.; SCHELLENS, J.H.M.; DELAUTER, B.J.; ZUHOWSKI, E.G.; PLUIM, D.; HAMBURGER, D.R.; WORKING, P.K.; COLBERN, G.; EISEMAN, J.L. Disposition of platinum (Pt) in B16 murine melanoma tumours after administration of cisplatin or pegylated liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103). Proc 11th NCI EORTC AACR Symp:abstract n. 32 apud JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; KEPLER, B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, n. 146, p. 1-53, 2003.