ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(Ɛ-CAPROLACTONA) CONTENDO ÁCIDO OLEICO PARA TRATAMENTO DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Ailyn Iank Laroca (PIBIC), Priscileila Colerato Ferrari (Orientador),
e-mail: priscileila@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Farmácia – Farmacotecnia

Palavras-chave: liberação controlada de fármacos, nanopartículas poliméricas, esquistossomose mansônica

Resumo

A esquistossomose mansônica possui alta prevalência no Brasil, porém é uma parasitose negligenciada com limitação de fármacos para tratamento, sendo necessário estudo de alternativas terapêuticas efetivas. Estudos demonstram que alguns ácidos graxos possuem atividade na destruição do tegumento e morte do parasita *Schistosoma mansoni*, e que nanopartículas de poli(ε-caprolactona) com ácido oleico apresentaram tamanho adequado para liberação de fármacos e alta eficiência de encapsulação. As nanopartículas foram obtidas por nanoprecipitação e acondicionadas em condições distintas de temperatura por 60 dias para avaliação da estabilidade. Os resultados obtidos evidenciaram instabilidade nas nanopartículas em relação ao tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta em função do tempo, conforme descrito em literatura, porém não foi observada degradação nem liberação antecipada do fármaco encapsulado. O método para determinação do teor de ácido oleico por UHPLC foi desenvolvido e validado, sendo apropriado para quantificação do fármaco.

Introdução

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária negligenciada, frequente em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento, cuja importância socioeconômica e na saúde ocorre devido à alta morbidade e mortalidade (KING, 2010). Atualmente, o seu tratamento é realizado com praziquantel, único fármaco disponível, causando uma preocupação crescente sobre seu uso extensivo e desenvolvimento de tolerância e resistência as espécies de Schistosoma (FALLON et al., 1995).

Neste sentido, a alta prevalência, ampla distribuição e limitação de fármacos indicam a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Estudos recentes demonstram a atividade de ácidos graxos, como o ácido oleico, contra a penetração do parasita *Schistosoma mansoni* na fase de cercária e também pela inibição de algumas enzimas presentes nas cercárias e vermes adultos, responsáveis pelo desenvolvimento do parasita, assim como a morte do verme por destruição do tegumento (LEE et al., 2013).

Nos últimos anos, sistemas nanoestruturados para a liberação de fármacos têm apresentado vantagens como a liberação precisa de doses mais baixas, direcionando o fármaco para o alvo da ação e, assim, reduzindo a absorção em tecidos que não são considerados alvos (TRAN et al., 2011). Contudo, há limitações

em decorrência da instabilidade, por agregação ou fusão das partículas, hidrólise do polímero e reações químicas (ABDELWAHED et al., 2006).

Desta forma, o objetivo do presente projeto é a incorporação de ácido oleico em nanopartículas poliméricas preparadas com PCL, a caracterização do estado sólido das nanopartículas e a sua estabilidade de armazenamento, visando aumentar a biodisponibilidade do fármaco nas veias mesentéricas, habitat do verme no corpo humano.

Material e Métodos

As nanopartículas poliméricas foram obtidas por nanoprecipitação. A fase orgânica consiste do polímero PCL em duas formulações com 0,05 g e 0,1 g, com acetona (27 mL), Span 80 (0,077 g), sendo uma com ácido oleico (0,1 g) e outra sem fármaco, e a fase aquosa, com Tween 80 (0,077 g) e água destilada (53 mL). A fase orgânica foi gotejada sobre a fase aquosa, mantida sob agitação magnética, e a suspensão foi levada a rotaevaporação a 40º C.

Para a quantificação do fármaco encapsulado foi desenvolvido um método utilizando um Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (UHPLC, modelo Nexera, Shimadzu). A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C18 e duas fases móveis constituídas de (A) metanol:hexano 98:2 e (B) acetonitrila:hexano 98:2, ambas com 0,1% de ácido acético glacial. Os parâmetros utilizados foram: temperatura da coluna de 40 °C, fluxo de 0,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Foi utilizado detector UV em 242 nm. Para validação do método, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e especificidade, conforme a RDC nº 166 de 2017 da ANVISA.

Para o estudo de estabilidade, as amostras foram armazenadas em: (a) temperatura ambiente à 25°C, (b) geladeira à 7 °C, e (c) congelador à -2 °C, todas protegidas da luz. As nanopartículas foram caracterizadas no tempo 0 e em intervalos até 60 dias, através de análises de tamanho de partículas e potencial zeta por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS90) após diluição em água destilada 1:500 (v/v), pH através de potenciômetro digital, e teor de fármaco através do método desenvolvido e validado, após centrifugação e filtração das amostras utilizando membranas filtrantes de 0,22 µm (Amicon Ultra) por 20 minutos para injeção do sobrenadante no UHPLC.

As nanopartículas foram liofilizadas em Liofilizador LD 1500 (Terroni) e examinadas em Difratômetro de Raio-X Ultima IV (Rigaku), scan de 2º/min e 2θ de 5º a 80°, corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV.

Resultados e Discussão

Após a obtenção das amostras, foram realizadas análises no tempo zero e armazenadas nas condições previstas até 60 dias, sendo que as amostras de PCL 0,05 g a 25°C foram descartadas devido a contaminação por fungos no tempo 45.

Os resultados do tamanho de partícula e índice de polidispersão (Tabela 1) evidenciam a instabilidade das suspensões por formação de agregados com perda da uniformidade dos tamanhos das partículas em função do tempo, o que pode ser influenciado pela concentração do polímero, viscosidade da fase orgânica e também alterações nas forças repulsivas das partículas, mensuradas pelo potencial zeta, considerando que valores altos, independente da carga, são fundamentais para evitar a agregação das partículas (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004). Além destes, baixas temperaturas de armazenamento realizam controle cinético no

crescimento das nanopartículas em função do tempo, enquanto que o congelamento desestabiliza as suspensões ao promover separação das fases (ABDELWAHED et al., 2006).

Tabela 1 – Resultados obtidos das análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Amostra		Tamanho partícula (nm) *Tempo*			Índice de polidispersão *Tempo*			Potencial zeta (mV) *Tempo*		
		0	*30*	*60*	*0*	*30*	*60*	*0*	*30*	*60*
PCL	A		217,2	-		0,527	-		-41,6	-
0,05	G	240,5	384,6	449,9	0,383	0,605	0,711	-19,2	-21,9	-46,8
SF	C		387,6	188,3		0,630	0,348		-22,7	-34,3
PCL	A		306,5	-		0,526	-		-41,6	-
0,05	G	342,1	423,5	264,0	0,468	0,687	0,538	-32	-37,7	-36,4
AO	C		513,3	253,0		0,592	0,216		-22,8	-34,0
PCL	A		515,6	348,5		0,584	0,579	-33,8	-19,1	-31,5
0,1	G	387,3	492,9	288,5	0,468	0,625	0,512		-26,0	-30,6
SF	C		456,3	205,2		0,555	0,164		-24,4	-25,5
PCL	A		435,5	255,0		0,538	0,331	-29,5	-29,8	-36,9
0,1	G	234,9	443,9	323,6	0,258	0,542	0,375		-29,8	-34,0
AO	C		403,6	178,4		0,691	0,129		-38,4	-43,0

A: Ambiente; G: Geladeira; C: Congelador

Em relação ao pH, é um parâmetro fundamental para avaliar a estabilidade pois sua redução indica degradação do polímero devido a hidrólise. No entanto, houve aumento do pH na maioria das amostras com o tempo, o que não indica degradação do polímero.

As amostras liofilizadas foram caracterizadas por Difração de Raio-X e o difratograma exibiu dois picos característicos do polímero PCL, sendo que na amostra com ácido oleico as nanopartículas apresentaram perfil mais amorfo, porém mantendo a característica semicristalina do polímero.

Quanto ao método desenvolvido para quantificação do ácido oleico encapsulado por UHPLC, a curva de calibração obtida apresentou equação da reta y= 3,011800x – 36203,0794 e coeficiente de relação r^2=0,9945. Para validação, a linearidade foi observada entre 0,25 e 1,0 mg/mL, com limite de detecção e quantificação de 0,0810 mg/mL e 0,2455 mg/mL, respectivamente. O desvio padrão relativo foi de 2,45%, indicando que o método é preciso. O método se mostrou específico ao demonstrar ausência de sobreposição de picos no tempo de retenção do ácido oleico, evidenciando que não há interferência dos componentes da formulação no pico do fármaco.

A partir deste método foi realizado o estudo do teor do fármaco encapsulado nas nanopartículas pelo método de centrifugação e filtração. A análise do filtrado indicou que todo o ácido oleico incorporado na formulação foi encapsulado, pois este não foi detectado, apresentando eficiência de encapsulação de 100 %. O estudo de estabilidade também mostrou que não houve liberação do ácido oleico das nanopartículas após armazenamento em temperatura ambiente, refrigerador e

congelador durante 15 dias, pois o fármaco também não foi detectado no filtrado. As análises nos dias 30 e 60 não foram possíveis de serem realizadas, por problemas com o UHPLC que esteve em manutenção.

Conclusão/ões

O estudo evidenciou a instabilidade das suspensões de nanopartículas em função do tempo, mas não foi detectada degradação das nanopartículas nem liberação precoce do ácido oleico em nenhuma das amostras durante o período de tempo estudado. As amostras de geladeira e temperatura ambiente apresentaram resultados mais uniformes em relação as amostras congeladas que sofreram variações abruptas, porém, a falta de refrigeração aumentou a susceptibilidade à contaminação microbiológica. Sendo assim, pode-se concluir que armazenamento de suspensões aquosas de nanopartículas poliméricas deve ser preferencialmente realizado em refrigeração.

Agradecimentos

Agradeço à professora orientadora, Priscileila Colerato Ferrari, pelo auxílio, confiança e disponibilidade. À técnica do laboratório, Aparecida, à Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao c-LABMU e seus colaboradores.

Referências

Abdelwahed, W.; Degobert, G.; et al. Freezedrying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos, 2017.

Fallon, P.G.; Smith, P.; Nicholls, T.; et al. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. **Parasite Immunol**. oct;16(10):529-35, 1995.

Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharm. Res**. 21,1428, 2004.

King, C.H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 113, p. 95–104, 2010.

Lee, V.S.T.; Burgess. J.L.; Sterling, C.R.; Lutz, E.A. *Schistosoma mansoni*: Assessment of effects of oleic acid, cercarial age and water temperature on parasite-host attraction. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p.837–842, 2013.

Tran, V.-T., Benoît, J.-P., Venier-Julienne, M. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p.1-11, 2011.