ESTUDO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE EUDRAGIT CONTENDO ÁCIDO OLEICO

Thaís Santana Ribasz (PIBIC), Priscileila Colerato Ferrari (Orientador), e-mail: priscileila@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas

Farmácia - Farmacotecnia

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas, sistemas de liberação controlada, Esquistossomose

Resumo
As doenças negligenciadas, são um problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e emergentes, pela sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Estes fatos associados com as poucas opções de tratamento, amplia a busca por novos fármacos efetivos no tratamento dessas doenças, entre eles os sistemas nanoestruturados vêm sendo uma aposta promissora. No entanto, sabe-se que as nanopartículas poliméricas apresentam instabilidades físico-químicas devido a sua composição, o que limitaria seu uso. Com base nisso, foram feitos estudos de estabilidade a partir de nanopartículas de Eudragit contendo ácido oleico, visto que, alguns estudos mostram que os ácidos graxos apresentam ação contra o parasita *Schistosoma mansoni*. Os resultados indicaram que, as nanopartículas não apresentaram mudanças significativas em sua estabilidade físico-química em relação ao tipo de armazenamento, porém em temperatura ambiente são mais susceptíveis a contaminação microbiana. As mudanças de pH influenciaram na estabilidade das partículas, porém estas não tiveram degradação. O método de quantificação do fármaco foi desenvolvido e validado.

Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada, que apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em países subtropicais. Tais fatores associados a poucas opções de tratamento existentes no mercado, amplia a busca por novos fármacos contra esta e outras parasitoses. Nos últimos anos, sistemas nanoestruturados para a liberação de fármacos têm sido estratégias tecnológicas empregadas com sucesso (AMARA et al., 2018, TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2017).
Alguns estudos demonstraram a atividade do ácido oleico em Schistosoma mansoni pela inibição de algumas enzimas presentes nas cercarias e vermes adultos (Ressureição et al., 2015, Lee et al., 2013). Então nanopartículas constituídas de Eudragit L incorporadas com ácido oleico foram desenvolvidas, caracterizadas e estudos in vitro sobre vermes adultos mostraram que a morte do verme foi mais rápida quando em comparação com o ácido oleico livre (resultados não publicados). No entanto, sistemas nanoestruturados apresentam instabilidade, deste modo, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a estabilidade físico-química em diferentes tempos e condições de armazenamento das nanopartículas constituídas de Eudragit L, incorporadas ao ácido oleico, como alternativa para o tratamento de esquistossomose. Durante a pesquisa também foi realizada a validação do método de quantificação do ácido oleico nas nanopartículas por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE), visando a liberação do fármaco.

Material e Métodos

O método utilizado para a obtenção do sistema nanoestruturado, foi a nanoprecipitação, que consiste no gotejamento lento de uma fase orgânica sobre uma fase aquosa sob agitação constante. A fase orgânica continha o polímero Eudragit em duas formulações com 0,05g e 0,1g, com acetona (27mL), Span 80 (0,077g), sendo uma com ácido oleico (0,1g) e outra sem fármaco e a fase aquosa, com TWEEN 80 (0,077g) e água destilada (53 mL). Após o preparo a suspensão passou por rotaevaporação a 40ºC. Foram preparadas quatro formulações com as dispersões de nanopartículas poliméricas diferentes.

Para o desenvolvimento e validação do método de quantificação do ácido oleico, utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance (UHPL) Nexera (Shimadzu). Onde a fase estacionária era composta por coluna C18 e a fase móvel foi subdivida em: fase A (metanol e hexano) e fase B (acetonitrila e hexano), ambas com 0,1% de ácido acético. Os parâmetros utilizados foram: temperatura de 40 °C, fluxo de 0,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em ultravioleta no comprimento de onda em 242 nm. Avaliou-se, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, especificidade, exatidão e robustez, conforme a RDC 166 de 2017 da ANVISA.

No estudo de estabilidade, o tamanho de partícula e o potencial zeta foram medidos por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS90) após a diluição das nanopartículas em água purificada a 1:500. Também foram analisados o pH, com auxílio de potenciômetro digital e difração de Raio X, no difratômetro de Raio- X Ultima IV (Rigaku), scan de 2º/min e 2θ de 5º a 80º, corrente de 40mA e voltagem de 40kV.

Resultados e Discussão

As amostras de nanopartículas foram obtidas e em seguida foram feitas as análises no tempo 0, após, foram armazenadas, nas temperaturas de 25ºC, 10ºC e -2ºC, ao abrigo de luz, por 60 dias.

O índice de polidispersão das suspensões, sugeriram heterogeneidade das amostras, além de variações no PDI ao longo do tempo, que podem ser indicativos de aglomerados ou degradação das partículas. O tamanho de partículas pode ser explicado, devido a heterogeneidade do sistema nanoparticulado, apresentando diversos tamanhos, no entanto o resfriamento pode ter controlado cineticamente o crescimento das partículas. Quanto ao potencial zeta, os resultados obtidos indicaram partículas de carga negativa, condizentes com o polímero utilizado (Eudragit®), os valores encontrados sugeriram instabilidade, nota-se com o aumento do potencial no tempo 30, no entanto o Eudragit® é fortemente influenciado por mudanças de pH, o que pode ter ocasionado uma diminuição do potencial zeta no tempo 60. Os valores obtidos podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados do estudo de estabilidade das nanopartículas

ISSN 1676-0093

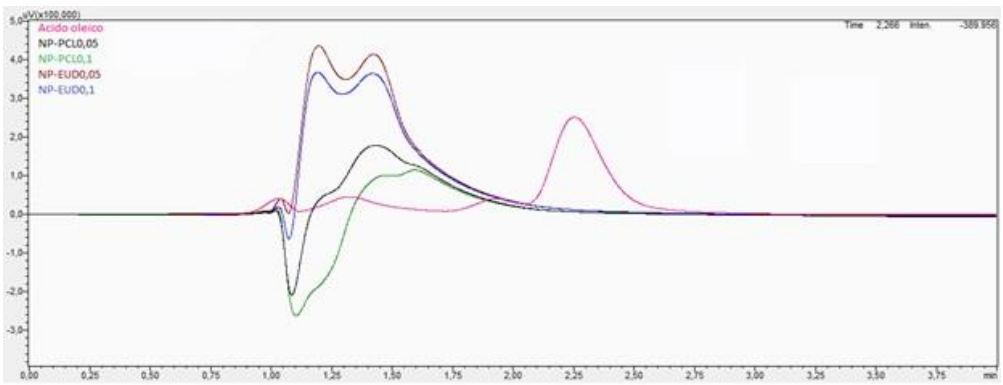
		Tamanho de partículas (nm)			Índice de polidispersão (PDI)			Potencial Zeta (mV)		
Amostra		Dia 0	Dia 30	Dia 60	*Dia 0*	*Dia 30*	*Dia 60*	*Dia 0*	*Dia 30*	*Dia 60*
	A	-	925,6	415,1	-	1,000	0,625	-	-29,0	-6,0
NP_EUD0.05	R	303,3	142,4	285,7	0,659	1,000	0,856	-25,3	-32,2	-31,4
	C	-	501,9	192,9	-	0,826	0,195	-	-20,9	-19,1
	A	-	564,9	-	-	0,858	-	-	-26,1	-
NP_EUD0.05_AO	R	194,4	679,8	247,0	0,687	1,000	0,525	-31,2	-19,0	-27,4
	C	-	472,5	414,5	-	0,804	0,651	-	-16,4	-27,2
	A	-	402,8	-	-	0,734	-	-	-19,6	-
NP_EUD0.1	R	191,3	391,7	238,5	0,549	0,736	0,522	-21,6	-37,8	-22,8
	C	-	619,7	-	-	1,000	-	-	-16,4	-
	A	-	388,8	-	-	0,688	-	-	-23,0	-
NP_EUD0.1_AO	R	263,0	458,4	243,6	0,453	0,752	0,603	-31,7	-31,6	-34,6
	C	-	476,1	176,1	-	1,000	0,228	-	-28,3	-31,0

A: temperatura ambiente; R: refrigerada; C:congelada

Com relação ao pH das amostras obtidas, não houve mudanças muito significativas entre as amostras com e sem fármaco, pois, o ácido oleico estava encapsulado. As diferentes condições de armazenamento também não apresentaram grandes diferenças entre si, levando a crer que o aumento no valor do potencial hidrogeniônico é em função do tempo. Apesar dos indicativos de instabilidade as amostras não apresentaram degradação.

Para quantificação do ácido oleico encapsulado, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência, cuja curva de calibração foi obtida em triplicata. A equação da reta obtida foi: y= 3,011800x – 36203,0794, onde x é a concentração do fármaco e y é a área do pico, com coeficiente de relação r^2=0,9945. Obteve-se valores de desvio padrão menos que 5%, indicando que o método de quantificação do ácido oleico desenvolvido é preciso (ANVISA, RDC 166/2017). A especificidade foi testada a partir das nanopartículas e do ácido oleico puro, o cromatograma obtido não apresenta sobreposição de picos no tempo de retenção característico do ácido oleico (2,25 min), demonstrando a especificidade do método.

Figura 1 – Cromatograma do ácido oleico puro e da suspensão de nanopartículas de Eudragit.



A partir do método de quantificação desenvolvido e validado foi realizado o estudo do teor do fármaco encapsulado nas nanopartículas, demostrando que 100% do fármaco foi encapsulado, o estudo de estabilidade também mostrou que não houve liberação do ácido oleico das nanopartículas após armazenamento nas três temperatura durante 15 dias, os tempos 30 e 60 dias não foram possíveis de serem realizados, por problemas com o UHPLC. Quanto a difração de raios X, o Eudragit apresenta um comportamento semicristalino com dois picos largos em [2 (símbolo theta)= 13°] e [2 (símbolo theta)= 27°], porém com a formação das nanopartículas seu pico sofreu um deslocamento para [2 (símbolo theta)= 20°] indicando modificação do arranjo cristalino. Também se observou o desaparecimento do segundo pico, indicando redução da cristalinidade, entretanto, a incorporação do fármaco não alterou a estrutura das nanopartículas, uma vez que os difratogramas são semelhantes ao da nanopartícula inerte.

Conclusão/ões

Pode-se concluir que, as dispersões de nanopartículas poliméricas apresentam algumas limitações em relação a sua estabilidade físico-química e microbiológica, sendo que condições de armazenamento em temperaturas mais baixas variam menos em relação ao armazenamento em temperatura ambiente. Para minimizar essas limitações, em função da estabilidade, o uso de técnicas de secagem como a liofilização poderia ser empregado no sistema nanoparticulado, a fim de aumentar a vida útil das nanopartículas e prevenir eventuais fenômenos de degradação das nanopartículas poliméricas.

Agradecimentos

Agradeço a professora orientadora, Priscileila Colerato Ferrari pelo auxílio, confiança e disponibilidade. A técnica do laboratório, Aparecida, a Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao c-LABMU e seus colaboradores e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento concedido.

Referências

AMARA, R.O., et al. Praziquantel–lipid nanocapsules: an oral nanotherapeutic with potential *Schistosoma mansoni* tegumental targeting. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4493–4505, 2018.

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

LEE, V.S.T., et al. 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.

RESSURREIÇÃO, M., et al. Sensory Protein Kinase Signaling in Schistosoma mansoni Cercariae: Host Location and Invasion. **The Journal of Infectious Diseases,** v. 212, p.1787–1797, 2015.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., et al. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta Tropica**, v.174, p. 64–71, 2017.