PERFIL DE DISSOLUÇÃO IN VITRO DE ÁCIDO OLEICO ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA O TRATAMENTO DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Jaqueline Mioduski (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Priscileila Colerato Ferrari (Orientadora), e-mail: priscileila@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Área: Farmácia. Subárea: Farmacotecnia.

Palavras-chave: Nanopartículas de poli(ε-caprolactona), sistemas de liberação controlada, cromatografia de alta eficiência, esquistossomose mansônica.

Resumo

Nanopartículas são sistemas sólidos coloidais com partículas com diâmetro médio de até 1000 nm. A esquistossomose é uma parasitose com alta prevalência e distribuição no Brasil, classificada como doença negligenciada, que normalmente não são alvos de investimento com nanotecnologia; porém, considerando as vantagens desses sistemas e o impacto da doença, se observou a necessidade de nova alternativa de tratamento. Buscou-se a obtenção de nanopartículas poliméricas de PCL em duas concentrações, através da técnica de nanoprecipitação, contendo ácido oleico como fármaco, devido a sua capacidade de destruir o tegumento dos parasitas. As nanopartículas foram caracterizadas, apresentando tamanho entre 200,1 nm e 221,0 nm, índice de polidispersão menor que 0,3, potencial Zeta entre -12,7 e -37,0 e superfície esférica e lisa. O fármaco foi quantificado por CLAE, e a eficiência de encapsulação apresentou valores de 69,239 ± 1,449 e 64,760 ± 2,805, porém o método de quantificação por CLAE e o meio de dissolução precisam ser ajustados para se prosseguir com o estudo de liberação in vitro.

Introdução

Sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido promissores por apresentarem várias vantagens com relação aos sistemas convencionais. Nanopartículas são caracterizadas como sistemas sólidos coloidais com diâmetro médio de partícula entre 5 e 1000 nm (MALFATTI et al, 2016).

A esquistossomose é uma infecção parasitária negligenciada de alta prevalência e distribuição no Brasil. Os sinais e sintomas relacionados à doença incluem diarreia, dor abdominal, hematêmese, melena, anemia e ascite (NEVES et. al., 2005). Doenças negligenciadas normalmente não são alvos de investimento com nanotecnologia; porém, considerando as vantagens dos sistemas nanoestruturados e o impacto da doença, observou-se a necessidade de nova alternativa de tratamento.

Estudos têm demonstrado atividade de ácidos graxos contra penetração ativa da cercária de *Schistosoma mansoni*, inibindo a atividade de suas enzimas proteolíticas (RESSUREIÇÃO et. al., 2015, LEE et al., 2013), além de causar alterações no tegumento dos vermes (Resultados não publicados). Nanopartículas poliméricas contendo ácido oleico foram obtidas em estudos prévios e caracterizadas, apresentando características físico-químicas satisfatórias (Resultados não

publicados), e por esse motivo, o objetivo do trabalho consistia na avaliação do perfil de dissolução *in vitro* do ácido oleico a partir desse sistema.
O fármaco ácido oleico compõe o núcleo oleoso do sistema, encapsulado por uma matriz sólida constituída do polímero poli(ε-caprolactona). A técnica utilizada para obtenção é chamada de nanoprecipitação ou deslocamento do solvente. Com esse sistema, visa-se o aumento da biodisponibilidade do ácido oleico nas veias mesentéricas, habitat do verme no corpo humano.

Materiais e Métodos

A técnica utilizada na obtenção das nanopartículas consiste na preparação de uma fase orgânica, onde o polímero, poli(ε-caprolactona) (PCL) é solubilizado em um solvente orgânico polar, e a fase aquosa. Adicionam-se tensoativos em ambas as fases. Em seguida a fase orgânica é gotejada sobre a fase aquosa sob agitação magnética, formando um sistema opalescente, que é mantido em agitação por mais dez minutos para estabilização. Após a obtenção, as amostras foram levadas até o equipamento de rotaevaporação para remoção do solvente em temperaturas de 40° C a 60° C. As formulações seguem na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das formulações desenvolvidas.

	Fase Orgânica				Fase Aquosa	
Amostras	PCL (g)	Ácido Oleico (g)	Span 80® (g)	Acetona (mL)	Tween 80® (g)	Água destilada (mL)
1	0,05	-	0,077	27	0,077	53
2	0,05	0,1	0,077	27	0,077	53
3	0,1	-	0,077	27	0,077	53
4	0,1	0,1	0,077	27	0,077	53

As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta através do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). As amostras foram diluídas na proporção 1:10 (v/v) em água destilada, e levadas ao equipamento para obtenção dos dados.
Para a caracterização da morfologia das nanopartículas, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-FEG). As amostras foram diluídas na proporção 1:100 (v/v), fixadas em suporte metálico, metalizadas com ouro por um minuto e levadas ao equipamento, modelo Mira 3 (Tescan).
Para a determinação quantitativa do ácido oleico, preparou-se uma solução estoque de ácido oleico em metanol (10 mg/mL); alíquotas dessa solução foram diluídas em metanol para formar a curva analítica com as concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL. As amostras foram filtradas e injetadas em triplicatas no equipamento de Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UHPLC) Nexera (Shimadzu), com fluxo de 0,5 mL/ min e volume de injeção de 50 µL. A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa C-18 (250 mm/ 4,6 mm, 5 µm); a fase móvel era composta pela mistura acetonitrila:metanol:hexano (90:8:2 v/v), acidificada com 0,2% de ácido acético. Utilizou-se o detector de ultravioleta em 208 nm. Este método também foi utilizado para avaliar a eficiência de encapsulação através das amostras liofilizadas após a obtenção, solubilizadas em metanol, e injetadas em triplicatas.
Tinha-se como objetivo avaliar o perfil de liberação do ácido oleico *in vitro*, e por isso testaram-se os possíveis meios de dissolução e o comportamento do fármaco frente

a esses meios; porém não se conseguiu quantificar o ácido oleico através do método de CLAE, de modo que não foi possível prosseguir com o estudo de liberação.

Resultados e Discussão

Para verificar a eficiência da evaporação, mediu-se o volume das amostras após a rotaevaporação; os valores obtidos se apresentaram entre 23 e 60 mL; desejavam-se valores próximos a 53 mL, de modo que os volumes obtidos foram satisfatórios; amostras com valores menores que 53 mL podem ter sofrido degradação.
Os tamanhos das nanopartículas obtidas pela espectroscopia de correlação de fótons foram satisfatórios, visto que variaram de 200,1 nm e 221,0 nm, de modo que possuem tamanhos adequados para utilização como sistema carreador de fármaco, de acordo com estudos publicados (Mosqueira, 2000; Duran 2006).
O índice de polidispersão (PDI) é importante para determinar a distribuição de tamanhos de partícula, de modo que valores menores que 0,3 indicam homogeneidade. Os valores obtidos variaram de 0,200 a 0,288, mostrando que as nanopartículas apresentam homogeneidade de tamanho.
Os valores obtidos pelo potencial Zeta através da mobilidade eletroforética se apresentaram negativos, devido características do polímero. Os valores ideais são acima de +30 mV ou -30 mV, indicando a estabilidade elétrica. As amostras apresentaram valores entre -12,7 e -37,0, de modo que apenas as amostras sem fármaco apresentaram valores dentro do esperado.
O MEV-FEG é capaz de produzir imagens tridimensionais e de alta resolução da superfície de uma amostra. As imagens obtidas mostraram nanopartículas esféricas e com superfície lisa; o formato irregular indica degradação devido à rotaevaporação.

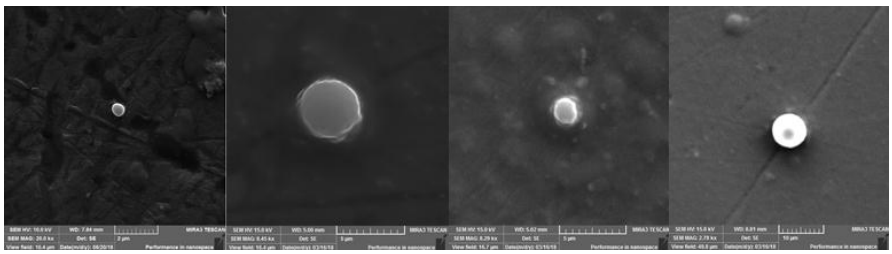


Figura 1 – Imagens representativas das amostras 1, 2, 3 e 4, respectivamente, obtidas pelo FEG nos meses de março e junho.

O método de CLAE foi utilizado na determinação quantitativa do ácido oleico e para prever a eficiência de encapsulação. A Figura 2 apresenta a curva de calibração obtida, juntamente com a equação da reta e coeficiente de determinação (R^2).

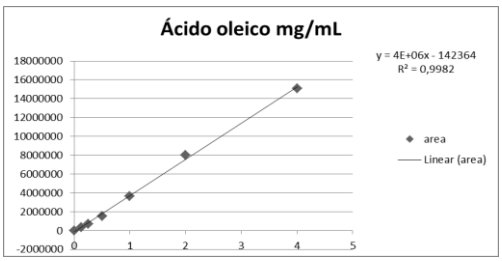


Figura 2 – Curva de calibração do ácido oleico obtida por CLAE.

O resultado da eficiência de encapsulação para as amostras de PCL com 0,05 g de polímero foi de 69,239 ± 1,449; para as amostras de PCL 0,1 g, o resultado foi de 64,760 ± 2,805. Assim, as amostras apresentaram um bom valor de eficiência de encapsulação, porém o resultado também indica que uma parte grande do fármaco adicionado na formulação se encontrava livre.
Não foi possível concluir o perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas, pois a quantidade de fármaco presente no meio de dissolução após a liberação não era detectável ao método de CLAE, sendo necessário testar outros meios capazes de dissolver o ácido oleico, ou ajustar o método de quantificação.

Conclusões

As nanopartículas foram obtidas de forma satisfatória e reprodutível, com características físico-químicas pertinentes para carreadores de fármacos. Possuem forma esférica e superfície lisa, apresentando irregularidades quando passam pelo processo de rotaevaporação em temperatura acima de 40ºC. Apresentaram bom resultado de eficiência de encapsulação, porém se observou a necessidade de ajustes no método de quantificação do ácido oleico: o método de CLAE trouxe dificuldades na obtenção dos resultados, além de não ser possível concluir o estudo de liberação *in vitro* do ácido oleico através desse método.

Agradecimentos

Á Fundação Araucária pelo financiamento para realização do projeto através da bolsa concedida; ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-Labmu) e ao C-Labmu Sebisa por disponibilizar os equipamentos e materiais utilizados.

Referências

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Art Liber**, São Paulo. 2006.

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.

MALFATTI, C. R. ; SOARES, K. C. N. **Promoção da saúde: Atuação Interdisciplinar em Inovação e Políticas Públicas**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2017.

MOSQUEIRA, V.C.F. et al. Poly (D, L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614-626, 2000.

NEVES, David Pereira ; MELO, Alan Lane de ; LINARDI, Pedro Marcos ; VITOR, Ricardo W. Almeida. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

RESSUREIÇÃO, 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.