

Vânia B. Deponti; Cristiane B. Mattos; Letícia S. Koester
Laboratório de Desenvolvimento Galênico
Faculdade de Farmácia – UFRGS

1) INTRODUÇÃO

A leishmaniose tem sido considerada pela OMS como a terceira doença parasitária mais importante, e devido à toxicidade e resistência do atual tratamento, novos sistemas de liberação de fármacos estão sendo desenvolvidos. Entre os compostos estudados, uma série de derivados sintéticos da 4-metoxichalcona foi recentemente testada contra a *Leishmania braziliensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e a 5-(2-Benzoiletênila)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida, denominada de composto 3i (Figura 1), foi o composto que apresentou maior atividade leishmanicida.

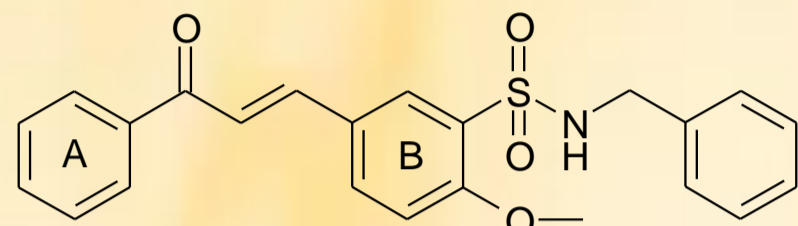


Figura 1 - Estrutura química da 5-(2-Benzoiletênila)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida

2) OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo o derivado sintético de chalcona, visando ao tratamento da LTA.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Solubilidade em óleos

Para determinar a solubilidade do composto 3i em diferentes óleos, foi adicionado quantidade em excesso do composto em óleo de rícino, triglicerídeos de cadeia média (TCM), octildodecanol (ODD), óleo de oliva, óleo de amêndoa, óleo de amendoim, vitamina E, óleo de copaíba, óleo de soja, mistura de TCM:óleo de soja (1:1) e mistura de TCM:óleo de rícino (1:1). Todos foram mantidos em agitação magnética durante 24h a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas, diluídas com metanol e analisadas em CLAE.

3.2) Desenvolvimento da nanoemulsão

As formulações foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea, onde foram testadas diferentes concentrações da 5-(2-Benzoiletênila)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida e tensoativos a fim de selecionar a(s) nanoemulsão(ões) mais promissora.

3.3) Caracterização

3.3.1) Tamanho de partícula

O tamanho médio de partícula e índice de polidispersão foram medidos a 25 °C por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600.

3.3.2) Potencial Zeta

O potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética utilizando um Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600.

3.3.3) Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise morfológica das nanoemulsões foi realizada em microscópio de transmissão eletrônica utilizando um JEM -1200 EXII.

3.3.4) Viscosidade

A viscosidade das nanoemulsões foi determinada utilizando viscosímetro de Ostwald com 6 mL de nanoemulsão (ajustado para 20 °C) e o tempo foi registrado. Os testes foram realizados levando em conta o tempo de escoamento das amostras através do capilar. O valor da constante de Ostwald foi determinado experimentalmente em relação ao escoamento da água a 20°C.

3.3.5) pH

O pH foi analisado por leitura direta em potenciômetro Digimed, previamente calibrado com tampão pH 4,0 e 7,0.

3.3.6) Teor e Taxa de Associação

O teor do composto 3i foi determinado através de cromatografia líquida de alta eficiência. A avaliação da taxa de associação foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação utilizando membrana Ultrafree® MC de 10.000 MW (Millipore) durante 10 min a 5.000 rpm, onde o ultrafiltrado contendo o composto 3i não associado foi quantificado por CLAE.

3.3.7) Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade do composto 3i incorporado ou não na nanoemulsão foi realizada frente a linhagem de células J774-A1 e determinado pelo método colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio].

3.3.8) Cinética de Degradação

Foi analisado o perfil de degradação do composto 3i frente à luz ambiente, utilizando uma solução metanólica da substância e a nanoemulsão.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de solubilidade em óleo é essencial para o desenvolvimento das nanoemulsões. A Figura 2 mostra que o composto 3i foi mais solúvel na mistura TCM:óleo de rícino (1:1,p/p) seguido pela mistura de TCM:óleo de soja (1:1,p/p).

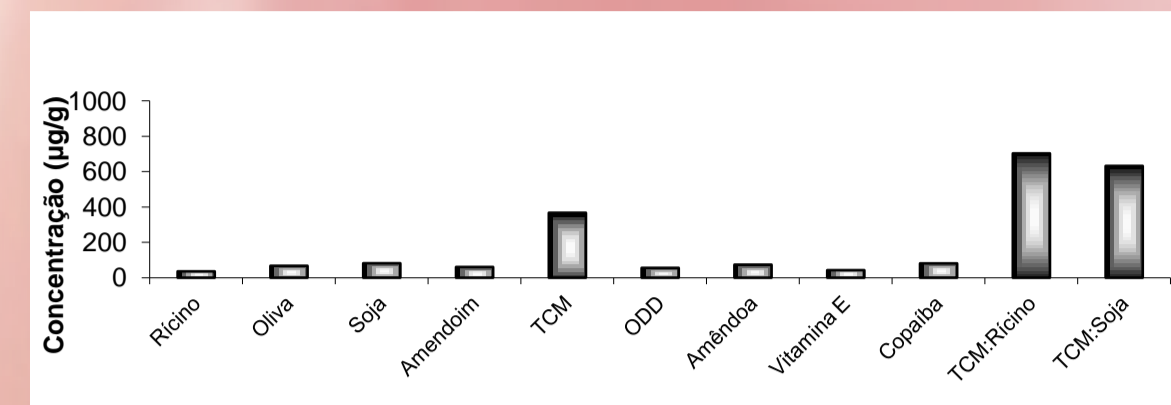


Figura 2 - Solubilidade do composto 3i em diferentes óleos.

Também foram analisadas as propriedades físico-químicas das formulações selecionadas, como mostra a Tabela 1, onde a nanoemulsão de concentração 0,75 mg.mL⁻¹ do composto 3i contendo a mistura de TCM:óleo de rícino como núcleo oleoso, lecitina de soja e vitamina E apresentou melhor taxa de associação em relação à formulação contendo TCM:óleo de soja, sendo dessa forma, a formulação selecionada para os estudos de citotoxicidade e fotodegradação.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de nanoemulsões brancas e nanoemulsões incorporadas com o composto 3i.

Formulação	Tamanho de gotícula (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Viscosidade (cP)	pH	Taxa de associação (%)					
TCM-R	101.73	0.49	0.15	0.08	-36.36	1.74	1.20	0.57	5.4	1.33	
TCM-R3i	96.64	0.42	0.13	0.10	-36.20	1.46	0.94	2.08	4.9	0.16	81.23
TCM-S	142.83	0.56	0.16	0.13	-33.53	3.27	1.67	1.24	5.1	2.58	
TCM-S3i	155.97	0.78	0.14	0.12	-37.00	1.89	1.86	2.35	5.2	3.15	64.50

A microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3) mostra que as gotículas oleosas são (quase) esféricas, mostrando a aparência típica de nanoemulsão óleo em água. Os resultados confirmam a análise de tamanho de partícula, em que o núcleo oleoso apresenta escala nanométrica.

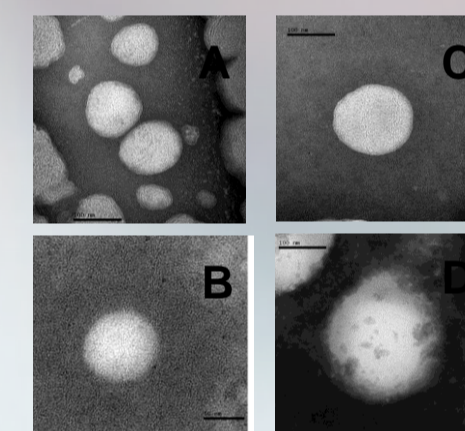


Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoemulsões (A) TCM-R; (B) TCM-R3i; (C) TCM-S e (D) TCM-S3i.

No estudo de citotoxicidade frente às células J774-A1 os resultados indicam que tanto o composto quanto a nanoemulsão não foram citotóxicas para a linhagem celular analisada (Figura 4).

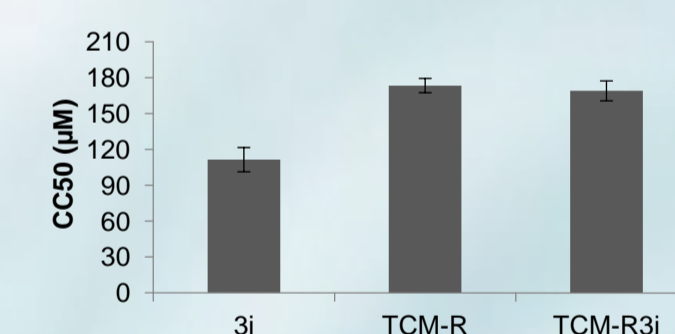


Figura 4. Concentração citotóxica (CC₅₀) do composto 3i, TCM-R e TCM-R3i contra linhagem celular J774-A1.

A análise dos resultados do estudo de cinética de degradação frente à luz, indicou que ocorre uma cinética de primeira ordem para a solução metanólica e reação de segunda ordem para a nanoemulsão. A nanoemulsão foi capaz de proteger parcialmente o derivado sintético de chalcona da degradação frente à luz (Figura 5).

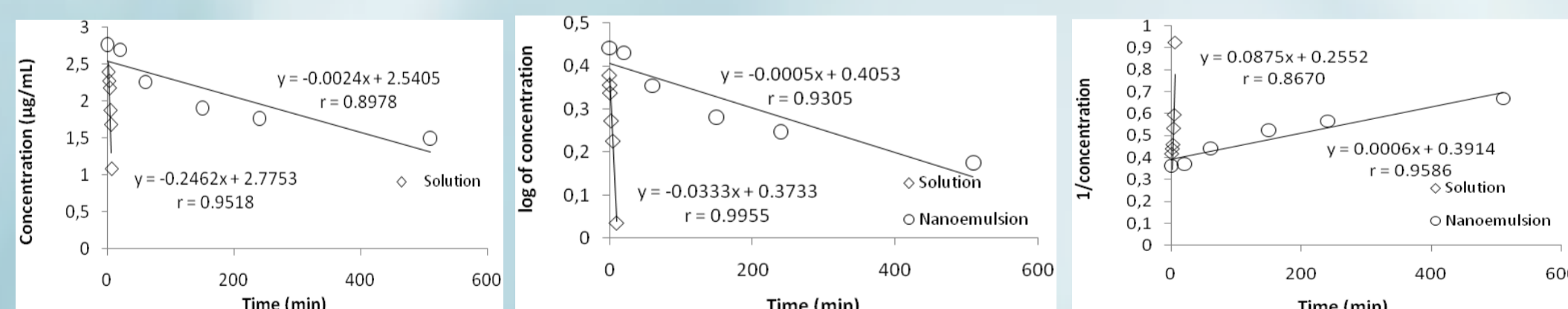


Figura 5. Gráficos da concentração (reação de ordem zero), log da concentração (reação de primeira ordem) e inverso da concentração (reação de segunda ordem) remanescente do composto 3i versus tempo na fotodegradação.

5) CONCLUSÃO

O método de emulsificação espontânea produziu nanoemulsões com partículas de tamanho reduzido, caracterizado como sistemas monodispersos, com potencial zeta altamente negativo e baixa viscosidade. Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade frente a linhagem de células J774-A1, mostraram que a nanoemulsão e o composto 3i não são citotóxicos. Na cinética de degradação, observa-se que a nanoemulsão foi capaz de proteger parcialmente o derivado de chalcona da degradação frente à luz.

REFERÊNCIAS

- ANDRIGHETTI-FROHNER *et al.* Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.44, p. 755-763, 2009.
- TEIXEIRA *et al.* Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através da técnica de emulsificação espontânea. *Caderno de Farmácia*, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.
- BOECK *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.