

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos:
Formulação e caracterização físico-química**

ÉRICO MARTINI

PORTO ALEGRE, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos:
Formulação e caracterização físico-química**

Dissertação apresentada por **Érico Martini** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder F. Teixeira

PORTO ALEGRE, 2005

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17.08.2005, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Airton Monza da Silveira
Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M386i

Martini, Érico

Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química / Érico Martini – Porto Alegre: UFRGS, 2005 – 106p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanoemulsões catiônicas. 2. Oligonucleotídeos. 3. Lipídeos catiônicos. I. Teixeira, Helder F. II. Título.

CDU: 615.45

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira-CRB10/480

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacocinética, que disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, pela oportunidade, confiança, exemplo e sobretudo pela amizade. Muito obrigado.

Ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), especialmente aos colegas Guilherme Tavares, Tamara Silveira e à Profa. Dra. Mônica C. de Oliveira, pela importante colaboração durante todo o curso deste trabalho, e pela amizade.

Aos Professores Dra. Sílvia Guterres, Dra. Adriana Pohlmann, Dr. Pedro Ros Petrovick, Dr. Martin Steppe, Dra. Valquíria Bassani, Dr. Airton M. da Silveira, Dra. Tânia Amador, Dr. Edison Santana Carvalho e Dra. Teresa Dalla Costa por toda sua contribuição.

Aos meus amigos do laboratório 405, por toda a colaboração e amizade. Aos colegas e amigos de pós-graduação, especialmente à Lidiane, Ana Arigony, Tassiana e Ana Paula, pelos vários momentos compartilhados, convívio e amizade.

Aos meus pais Enio e Vera, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

À minha família, especialmente a Ricardo e Aline Siveiro, pelo companheirismo e compreensão pelas minhas ausências em várias ocasiões. Também às minhas queridas afilhadas Laura e Luísa Siviero, que nasceram durante este período.

Também agradeço à minha outra família, Clanir, Valdir e Tamara Garbini, pelo convívio, amizade e apoio.

Ao meu amor Michele, que me acompanhou durante toda esta caminhada, e que sempre me apoiou. Este trabalho é dedicado especialmente a você.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DA LITERATURA	07
Composição das nanoemulsões	09
Fase oleosa	11
Interface.....	13
Fase aquosa	18
Métodos de preparação das nanoemulsões.....	19
Propriedades das nanoemulsões	22
Diâmetro de gotícula das nanoemulsões	22
Potencial zeta das nanoemulsões	24
pH das nanoemulsões.....	26
Viscosidade das nanoemulsões	28
Associação de ácidos nucléicos com nanoemulsões.....	29
Liberação de ácidos nucléicos a partir de nanoemulsões.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
Materiais.....	35
Métodos.....	37
Preparação das nanoemulsões	37
Caracterização das nanoemulsões	38
Determinação do pH	38
Determinação do diâmetro de gotícula	38
Determinação da viscosidade.....	38
Determinação do potencial zeta	39
Avaliação morfológica.....	39
Avaliação da estabilidade das nanoemulsões	39
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do pdT ₁₆	40
Seleção do comprimento de onda de leitura	40
Determinação da linearidade.....	40
Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária	40
Avaliação da especificidade.....	41
Determinação do limite de detecção e quantificação.....	41

Associação do pdT ₁₆ com as nanoemulsões catiônicas.....	41
Propriedades físico-químicas após a associação do pdT ₁₆	42
Liberação do pdT ₁₆ a partir das nanoemulsões catiônicas	42
Análise estatística.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
Procedimento de emulsificação espontânea.....	47
Propriedades de nanoemulsões catiônicas.....	51
Determinação quantitativa da associação do pdT ₁₆ com as nanoemulsões catiônicas.....	61
Influência do pdT ₁₆ sobre propriedades de nanoemulsões.....	70
Estudos de liberação do pdT ₁₆ a partir de nanoemulsões catiônicas.....	75
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química de um triglicerídeo de cadeia média com cadeias carbonadas derivadas do ácido cáprico.....	11
Figura 2.	Estrutura química dos lipídeos catiônicos EA, DOTAP e DC-Chol, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.....	13
Figura 3.	Estrutura química dos fosfolipídeos DSPC, DOPE e DSPE-PEG, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.....	16
Figura 4.	Estrutura química dos tensoativos não-iônicos, Span 80 [®] , Tween 80 [®] e Poloxâmero, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.....	17
Figura 5.	Principal rota de formação de ácidos graxos livres através da hidrólise dos fosfolipídeos.....	27
Figura 6.	Diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersidade das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico, utilizando a mistura de acetona e etanol 8:2 ou etanol isoladamente como solvente no procedimento de emulsificação espontânea.....	48
Figura 7.	Estrutura química dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	51
Figura 8.	pH das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	52
Figura 9.	Diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade das formulações contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	53
Figura 10.	Potencial zeta (mV) das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	55
Figura 11.	Viscosidade (cP) das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	56
Figura 12.	Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões na ausência de lipídeo catiônico e presença dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2 mM. Aumento de 100.000x. Em destaque a presença de lipossomas nas nanoemulsões.....	58
Figura 13.	Estrutura química do oligonucleotídeo modelo pdT ₁₆	62

Figura 14.	Espectro de absorção do oligonucleotídeo modelo pdT ₁₆	62
Figura 15.	Representação gráfica da curva padrão através de espectrofotometria na região do ultravioleta com λ de 266nm.....	63
Figura 16.	Espectro de absorção do pdT ₁₆ em água (linha) e em solução de glicerina a 2,25% (linha tracejada).....	65
Figura 17.	Quantidade de ON pdT ₁₆ adsorvido (mg/g) em função da concentração do pdT ₁₆ adicionado (mg/g ou nmol/mL) com as nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico ou com 2 mM de EA, OA ou DT).....	67
Figura 18.	Diâmetro de gotícula das formulações contendo EA, OA e DT na concentração de 2mM após adição de quantidades crescentes do pdT ₁₆	70
Figura 19.	Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões contendo pdT ₁₆ na concentração de 25 μ M na ausência de lipídeo catiônico e presença dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2mM. Aumento de 100.000x.....	71
Figura 20.	Potencial zeta das formulações contendo EA, OA e DT na concentração de 2 mM após adição de quantidades crescentes do pdT ₁₆	74
Figura 21.	Quantidade de ON pdT ₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões obtidas em presença dos lipídeos catiônicos EA, OA ou DT (2 mM) ou isenta de lipídeo catiônico (SL), 15 minutos após a diluição 1:20.....	75
Figura 22.	Quantidade de pdT ₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2mM, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a diluição na proporção 1/20.....	76
Figura 23.	Quantidade de pdT ₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2 mM, 15 minutos após a diluição nos fatores de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/100.....	77
Figura 24.	Quantidade de ON pdT ₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2 mM, após 15 minutos de diluição na proporção 1/20, nas relações de carga [+/-] de 0,2, 2, 5, 10 e 20.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Exemplos representativos da composição qualitativa de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos.....	10
Tabela 2.	Exemplos representativos do tipo de metodologia empregada no desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos.....	19
Tabela 3.	Composição final das nanoemulsões catiônicas (% m/m) contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT.....	37
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeos catiônicos com etanol ou a mistura etanol/acetona na proporção 30/60.....	49
Tabela 5.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2 mM logo após o preparo e após 120 dias de armazenamento à temperatura de 4 °C.....	59
Tabela 6.	Resultados da avaliação da repetibilidade para doseamento de soluções aquosas de pdT ₁₆ na concentração de 3nmol/mL.....	64
Tabela 7.	Taxa de recuperação de concentrações crescentes do pdT ₁₆ em solução aquosa no ultrafiltrado após ultrafiltração/centrifugação.....	66
Tabela 8.	Superfície total (S _T) apresentada pelas nanoemulsões obtidas na presença dos lipídeos EA, OA e DT na concentração de 2 mM e na ausência de lipídeo catiônico (controle).....	68
Tabela 9.	Viscosidade das nanoemulsões catiônicas contendo 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT após a adição de quantidades crescentes de pdT ₁₆ ...	72
Tabela 10.	pH das nanoemulsões catiônicas contendo 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT após a adição de quantidades crescentes de pdT ₁₆	73

ABREVIATURAS

CTAB – cloreto de cetil trimetil amônio

EA – estearilamina

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

DOPC – dioleilfosfatidilcolina

DOPE – dioleilfosfatidiletanolamina

DSPC – diestearilfosfatidilcolina

DSPE-PEG – diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol

DT – DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano)

MET – microscopia eletrônica de transmissão

OA – oleilamina

ON – oligonucleotídeo

PC – fosfatidilcolina

pdT₁₆ – oligonucleotídeo modelo politimidilato de 16 nucleotídeos

PEG – polietilenoglicol

TCM – triglicerídeos de cadeia média

TCL – triglicerídeos de cadeia longa

[+/-] – relação de cargas positivas (lipídeo catiônico) e negativas (ON)

UF – ultrafiltração

RESUMO

Nanoemulsões catiônicas têm sido recentemente consideradas como potenciais sistemas de liberação de oligonucleotídeos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da adição de quantidades crescentes dos lipídeos catiônicos estearilamina (EA), oleilamina (OA) ou DOTAP (DT) sobre propriedades físico-químicas de nanoemulsões como sistemas de liberação de um oligonucleotídeo modelo (pdT₁₆). As formulações foram preparadas pelo procedimento de emulsificação espontânea. As nanoemulsões constituídas de triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, glicerol, quantidades crescentes dos lipídeos catiônicos (até 20 mM) e água foram caracterizadas em termos de diâmetro médio, pH, potencial zeta e viscosidade. Baseado nos resultados obtidos, as formulações contendo EA, OA e DT na concentração de 2 mM foram selecionadas para a continuidade do trabalho, uma vez que apresentam diâmetro de gotícula e potencial zeta de cerca de 250 nm e 40-50 mV, respectivamente. A taxa de associação do pdT₁₆ às nanoemulsões foi determinada, indiretamente, pelo doseamento deste, na fase aquosa externa após separação em membranas de ultrafiltração/centrifugação, por meio de espectrofotometria no UV. A maior taxa de associação do pdT₁₆ foi detectada para a formulação contendo o lipídeo catiônico DT (até ~70 mg/g de fase interna). Evidências adicionais da associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões foram detectadas pelo aumento do diâmetro de gotícula, inversão do potencial zeta e morfologia das gotículas. Em uma última etapa, um estudo preliminar da liberação do pdT₁₆ foi realizado especialmente para a formulação contendo o lipídeo catiônico DT. O fator de diluição e relação de cargas [+/-] foram identificados como os principais parâmetros que influenciam a liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência da concentração e da natureza do lipídeo catiônico empregado sobre as propriedades físico-químicas de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos.

Palavras-chave: oligonucleotídeos, nanoemulsões catiônicas, lipídeos catiônicos, caracterização físico-química

ABSTRACT

Cationic nanoemulsions have been recently considered as a potential delivery system for oligonucleotides. The aim of the present work was to evaluate the influence of the increasing amount of cationic lipids stearylamine (EA), oleylamine (OA) or DOTAP (DT) on physicochemical properties of nanoemulsions as a delivery system for a model oligonucleotide (pdT₁₆). Formulations were prepared by spontaneous emulsification procedure. Nanoemulsions containing medium chain triglycerides, egg lecithin, glycerol, increasing amounts of cationic lipids (up to 20 mM) and water were characterized in terms of mean droplet size, pH, zeta potential and viscosity. Based on the results, formulations containing EA, OA and DT at 2 mM were selected for further studies since their droplet size and zeta potential were about 250 nm and 40-50 mV, respectively. pdT₁₆ association efficiency with nanoemulsions was calculated after the pdT₁₆ assay in the aqueous phase, previously separated by ultrafiltration/centrifugation membranes, using UV spectrometry. The higher pdT₁₆ association could be detected for nanoemulsions containing DT (up to ~70 mg/g of internal phase). Additional evidences of pdT₁₆ association with nanoemulsions could also be detected by the increase of mean droplet size, inversion of zeta potential and morphology of oil droplets. In a last step, a preliminary study of pdT₁₆ release from nanoemulsions was performed, especially for the formulation containing DT. Dilution factor and charge ratio [+/-] were found to play a crucial role on the release of pdT₁₆ from nanoemulsions. In conclusion, the overall results show the effect of the type and the concentration of cationic lipids on physicochemical properties of nanoemulsions as delivery systems for oligonucleotides.

Keywords: oligonucleotides, cationic nanoemulsions, cationic lipids, physicochemical characterization

INTRODUÇÃO

As terapias baseadas no uso de ácidos nucleicos representam um dos maiores avanços da história recente das ciências biomédicas. Após a transferência intracelular, os ácidos nucleicos apresentam a habilidade de modificar a expressão gênica, podendo constituir terapias do tipo correção, complementação ou adição (MATTE e GIUGLIANI, 2004). Diversos estudos clínicos encontram-se atualmente em andamento, em especial, na terapia do câncer e nas infecções bacterianas e virais (OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002; JAASKELAINEN e URTTI, 2002; STAHEL e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2003; WAGNER et al., 2004; LAM e TIMMERMAN, 2004; BANKOWSKI e ANDERSON, 2004).

Estudos relativos ao emprego de polinucleotídeos constituídos de 12 a 40 nucleotídeos em fita simples, denominados oligonucleotídeos (ON), têm sido correntemente descritos na literatura (COUVREUR e MALVY, 2000). ON são constituídos de uma seqüência de ácidos nucleicos construídas para se hibridar especificamente com um determinado gene, um RNA mensageiro ou ainda uma proteína. A habilidade destes fragmentos de ácidos nucleicos de interferir na expressão gênica é a base da terapia com ON. LIANG e colaboradores (1999) descreveram os locais de ação dos ON, constituindo três diferentes estratégias: (i) Estratégia anti-gênica: ON inibem o processo de transcrição do DNA em fita dupla para RNA mensageiro em fita simples, através do pareamento de bases do tipo Hoogsteen; (ii) Estratégia antisense: ON são complementares ao RNA mensageiro restringindo o processo de tradução através de pontes de Hidrogênio do tipo Watson e Crick; (iii) Estratégia aptâmeros: ON interagem com proteínas via pontes de hidrogênio interferindo na sua atividade. Várias propostas de mecanismos de ação dos ON têm sido descritas na literatura (HÉLÈNE e TOULMÉ, 1990; SCANLON et al., 1995; PIROLLO et al., 2003; LAM e TIMMERMAN, 2004).

Entretanto, apesar das reconhecidas potencialidades terapêuticas dos ON, diversas aplicações permanecem limitadas pela sua reduzida penetração intracelular. Além do elevado peso molecular, o caráter polianiônico dos ON limita o seu transporte intracelular em decorrência da repulsão eletrostática com as membranas celulares (JAASKELAINEN e URTTI, 2002). Além disso, a instabilidade dos ON em fluidos biológicos devido a rápida degradação frente ao ataque das endo e exonucleases limita o uso destas moléculas *in vivo* (ZELPHATI e SZOKA, 1996; MÖNKKÖNEN e URTTI, 1998; OPALINSKA et al., 2002).

A fim de contornar esses inconvenientes, diversos estudos descrevem a modificação química dos ON naturais, seja através de alterações da natureza das ligações inter-nucleosídeos, da estrutura dos açúcares ou das bases (ENGELS e UHLMANN, 1999). A substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de enxofre originou a classe dos fosforotioatos, sendo esta correntemente utilizada devido a sua estabilidade em fluidos biológicos (HUGHES et al., 2001; STAHEL e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2003). Em 1998, a comercialização de uma seqüência de ON fosforotioato foi autorizada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento local de retinite induzida por citomegalovírus (VITRAVENE[®], Isis Pharmaceutical Inc.). Contudo, o uso de ON fosforotioatos por via sistêmica é fortemente limitado, devido ao aparecimento de toxicidade, decorrente da interação não específica com algumas proteínas, perturbando as suas funções, como a das polimerases, certas proteínas membranares e a albumina (KRIEG E STEIN, 1995; SRINIVASAN e IVERSEN, 1995; LIANG et al., 1999; OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002).

Paralelamente à modificação química dos ON, a associação dos ON naturais a sistemas lipídicos catiônicos tem sido proposta. ON carregados negativamente e os lipídeos catiônicos carregados positivamente são capazes de formar um complexo eletrostático espontaneamente em meio aquoso (ZHDANOV et al., 2002; BEREZHNA et al., 2005). Geralmente, os lipídeos catiônicos são estruturados na forma de lipossomas, adicionados de fosfolipídeos, podendo assegurar uma liberação citoplasmática dos ON devido ao seu efeito desestruturante sobre membranas (ZELPHATI e SZOKA, 1996). Além disso, a formação de um par iônico entre os ON e os lipídeos catiônicos limita a atividade das nucleases, reduzindo assim a cinética de degradação dos ON (LAPPALAINEN et al., 1994; FATTAL et al., 2001).

Apesar dos avanços na área de desenvolvimento de vetores não virais como os lipossomas catiônicos, a toxicidade dos sistemas e a reduzida eficiência de transfecção decorrente da instabilidade dos complexos formados com os ácidos nucleicos em presença de proteínas, têm sido relatadas (YI et al., 2000; CHOI et al., 2004). Além disso, limitações relacionadas com o uso de solventes tóxicos durante a preparação, com a estabilidade físico-química dos sistemas, bem como dificuldades de transposição de escala abrem perspectivas na área de desenvolvimento de novos sistemas coloidais como carreadores de ácidos nucleicos (STORM e CROMMELIN, 1998; MIN et al., 2005).

Neste contexto, nos últimos anos, nanoemulsões catiônicas têm sido propostas como sistemas de liberação de ON. Teixeira e colaboradores (1999) estudaram a associação de ON naturais de diferentes tamanhos (até 50 nucleotídeos) com nanoemulsões catiônicas constituídas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por lecitina de gema de ovo e pelo lipídeo catiônico estearilamina. Foi demonstrado que a eficiência de associação dos ON com a nanoestrutura está relacionada com a concentração e com o tamanho do fragmento de polinucleotídeo associado. Interações de natureza eletrostática e/ou hidrofóbica foram identificadas como sendo as principais responsáveis pela associação dos ON com a interface das nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001A, B).

A influência da composição qualitativa (núcleo oleoso, fosfolipídeos e lipídeos catiônicos) no perfil de liberação dos ON a partir de nanoemulsões catiônicas tem sido investigada (TEIXEIRA et al. 2001B; TRIMAILLE et al., 2003). Independente do núcleo oleoso e fosfolipídeos, o conjunto dos resultados obtidos indica que a estrutura química dos lipídeos catiônicos utilizados influencia a cinética de liberação dos ON associados. O uso de lipídeos catiônicos apresentando duas cadeias hidrofóbicas (e em especial polications) representa a estratégia mais eficaz no controle da liberação dos ON a partir das nanoemulsões catiônicas. Estudos posteriores demonstraram uma redução da cinética de degradação dos ON associados com as nanoemulsões catiônicas em meio biológico, bem como um aumento da captura dos ON veiculados por células tumorais (P388/ADR), após administração intratumoral das formulações (TEIXEIRA et al., 2001B, 2003).

Contudo, até o momento, ainda não foram realizados estudos comparativos de avaliação da influência da composição quantitativa de lipídeos catiônicos sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões como sistemas de liberação de ON. Considerando-se o efeito preponderante dos lipídeos catiônicos na associação e dissociação dos ON veiculados com nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001A, 2001B), bem como na potencial toxicidade dos sistemas (BRAZEAU et al., 1998), esse trabalho visa a contribuir com a otimização da composição de nanoemulsões catiônicas como sistema de liberação de ON.

Neste contexto, o objetivo geral da presente dissertação é realizar um estudo de formulação visando a avaliar a influência de diferentes lipídeos catiônicos sobre propriedades físico-químicas de nanoemulsões contendo ON obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea. Os objetivos específicos são os seguintes:

- Otimizar as condições experimentais para obtenção de nanoemulsões monodispersas, através do procedimento de emulsificação espontânea;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas de nanoemulsões catiônicas contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA ou DT;
- Validar metodologia de ultrafiltração/centrifugação a fim de avaliar a associação de um ON modelo, constituído de 16 nucleotídeos (pdT₁₆), com as nanoemulsões catiônicas, por espectroscopia na região do ultravioleta;
- Avaliar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas selecionadas após a associação de quantidades crescentes do pdT₁₆;
- Investigar preliminarmente os fatores que influenciam a liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões.

REVISÃO DA LITERATURA

O uso de lipídeos catiônicos na composição de vetores não virais de natureza polimérica e/ou lipídica na forma de agregados supramoleculares, nanopartículas e lipossomas tem se mostrado uma estratégia útil e segura para a transferência intracelular dos ácidos nucleicos (FATTAL et al., 1998, 2001; LAMBERT et al., 2001; JURKIEWICZ, 2003). O efeito benéfico da associação (adsorção e/ou encapsulamento) dos ácidos nucleicos com o sistema coloidal carregado positivamente tanto em termos de transferência intracelular de ON ou DNA (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*), como na redução da cinética de degradação dos ácidos nucleicos veiculados, tem sido demonstrado por vários autores (ZELPHATI e SZOKA, 1996; BROWN et al., 2001; CAMPBELL et al., 2001).

O desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas do tipo O/A como um potencial sistema para liberação de ácidos nucleicos tem merecido atenção por parte de diversos pesquisadores nos últimos anos. O interesse desses sistemas justifica-se principalmente pelo uso de nanoemulsões pela indústria farmacêutica na nutrição parenteral, bem como sistemas de liberação de diferentes fármacos. Além disso, alguns autores descrevem que o complexo formado entre nanoemulsões e ácidos nucleicos apresenta adequada estabilidade em fluidos biológicos e, em alguns casos, atividade de transfecção *in vitro* e *in vivo* superiores aos lipossomas catiônicos (CHOI et al., 2004; MIN et al., 2005).

Nesta etapa de revisão, diversos aspectos farmacotécnicos, como a composição das nanoemulsões, as metodologias de preparação e as propriedades físico-químicas das nanoemulsões catiônicas como sistema de liberação para ácidos nucleicos em fita simples (ON) e fita dupla (DNA) serão abordados.

Composição das Nanoemulsões

As nanoemulsões utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos são geralmente compostas por um núcleo oleoso de origem vegetal ou semi-sintética estabilizado na sua superfície por uma mistura binária de fosfolipídeos e lipídeos catiônicos. A adição de um lipídeo catiônico confere carga positiva à superfície da gotícula, permitindo a associação dos ácidos nucleicos à interface das nanoemulsões através da formação de um par iônico em meio aquoso. Exemplos da composição qualitativa de nanoemulsões catiônicas desenvolvidas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos representativos da composição qualitativa de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos.

Ácido nucléico	Óleo	Sistema tensoativo	Referência
DNA pCMV-Luc	Rícino	DC-Chol, DOPE, Tween, Span, Brij, POL	Liu et al., 1996
DNA pCMVL	Rícino	DC-Chol, DOPE, Tween 80, Span 80, Brij 78	Hara et al., 1997
DNA pCMV-CAT	Soja	DT, DOPE, PEG ₂₀₀₀ PE	Kim et al., 2000
DNA pSV-CAT	Soja	DT, DOPE, COL, PEG ₂₀₀₀ PE, PEG ₅₀₀₀ PE	Yi et al., 2000
DNA pCMV-β	Esqualeno	DT, DMTAP, DPTAP, DSTAP, DDAB, DOEPC, DOPE, Tween 80, PEG ₂₀₀₀ PE, POL	Kim et al., 2001
DNA pCMV-β	Linhaça, soja e esqualeno	DT, PC	Chung et al., 2001
DNA pCMVL	Oliva	DT, DOPC, DOPE, PC, DSPE-PEG 2000, COL	Chesnoy et al., 2001
DNA pCMV-β	Esqualeno	DT, DOPE, Tween 80, Montanide 80, Span 80, Brij	Kim et al., 2002
DNA pCMV-Luc	Esqualeno	DT, DOPE	Choi et al., 2002
DNA pCMVKm	Esqualeno	DT, Span 85, Tween 80	Ott et al., 2002
DNA pCMV-β	Esqualeno, Soja e Linhaça	DT	Kim et al., 2003
DNA Ag85B	TCM	EA, PC, POL	Bivas-Benita et al., 2004
DNA pCMV-Luc	Esqualeno, Papoula	DT, DOPE	Yoo et al., 2004
DNA pEGFP-C1	Rícino	DC-Chol, DOPE, Tween 80	Choi et al., 2004
DNA pGL3	Soja	CTAB, POL	Barut et al., 2005
DNA pCMV-β	Esqualeno	DT, DOPE, Tween 80	Kim et al., 2005
DNA pCMV-Lac	Esqualeno	EA, DT, DOPE, COL, Tween	Hung et al., 2005
DNA pEBVGFP	Rícino	DC-Chol, DOPE, Tween 80	Min et al., 2005
ON pdT ₁₆₋₅₀	TCM	EA, PC, POL	Teixeira et al., 1999; Trimaille et al., 2003
ON pdT ₁₆	TCM	EA, DT, RPR C ₁₄ ; RPR C ₁₈ , PC, DSPC, POL, DSPE-PEG 2000	Teixeira et al., 2001 ^a ; 2001 ^b
ON pdT ₁₆	TCM	EA, RPR C ₁₈ , PC, POL	Teixeira et al., 2003

Abreviações: POL (poloxâmero); EA (estearilamina); PEG₂₀₀₀PE (1-palmitoil-2-oleil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000); COL (colesterol); PEG₅₀₀₀PE (1-palmitoil-2-oleil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 5000); DC-Chol (dimetilaminoetano-carbamoil-colesterol); DOPE (dioleilfosfatidiletanolamina); DT (1,2-dioleil-3-trimetil amônio propano); DMTAP (dimiristoiltrimetilamônio-propano); DPTAP (dipalmitoiltrimetilamônio-propano); DSTAP (diesteariltrimetilamônio-propano); DDAB (brometo de dimetildioctadecilamônio); DOEPC (dioleiletilfosfatidilcolina); PC (fosfatidilcolina); DOPC (dioleilfosfatidilcolina); DSPE-PEG 2000 (diestearilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000); CTAB (cloreto de cetil trimetil amônio); DSPC (diestearilfosfatidilcolina).

Fase oleosa

O núcleo oleoso das nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos varia entre 5 e 35 % da composição final das formulações apresentadas na tabela 1. A seleção do núcleo oleoso é geralmente realizada com base nas propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações. Óleos de origem vegetal ou semi-sintética autorizados para uso parenteral, constituídos principalmente de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL), têm sido correntemente empregados (KLANG e BENITA 1998).

Alguns estudos relatam o uso de óleos vegetais como o de soja, de oliva e de rícino no preparo de nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DOTAP como veículo para DNA (YI et al., 2000; KIM et al., 2003). Contudo, atualmente, observa-se um interesse crescente no uso dos TCM no preparo de nanoemulsões. Os TCM são obtidos da hidrólise do óleo de côco e fracionados em ácidos graxos livres contendo entre 6 e 12 átomos de carbono. Após, estes ácidos graxos são esterificados com o glicerol (KLANG e BENITA, 1998; FLOYD, 1999). Um exemplo de estrutura de triglicerídeo de cadeia média está representado na figura 1.

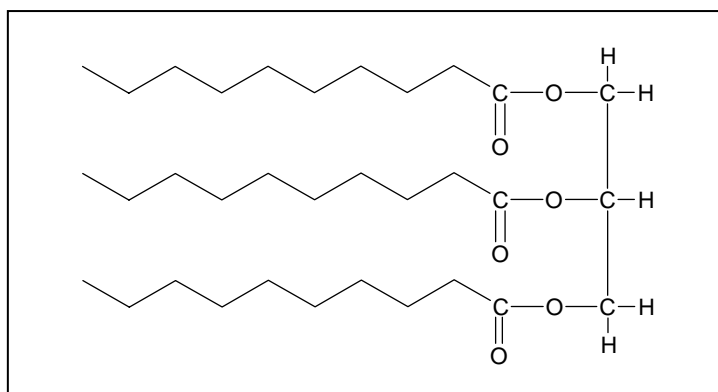


Figura 1. Estrutura química de um triglicerídeo de cadeia média com cadeias carbonadas derivadas do ácido cáprico.

Os TCM apresentam algumas vantagens principalmente em relação a sua capacidade de serem até 100 vezes mais miscíveis em água que os análogos de cadeia longa (BENITA e LEVY, 1993; MUCHTAR e BENITA, 1994) e apresentarem reduzida toxicidade após administração parenteral ($DL_{50}=3,7$ g/kg) (WADE e WELLER, 1994). A tabela 1 demonstra a utilização dos TCM na obtenção de sistemas de liberação tanto para ON (TEIXEIRA et al., 1999, 2003; TRIMAILLE et al., 2001) como para DNA (TRIMAILLE et al., 2001, 2003).

CHUNG e colaboradores (2001) realizaram um estudo extensivo com 18 diferentes óleos de origem natural visando a avaliar o efeito da viscosidade e tensão interfacial dos óleos nas propriedades físico-químicas e estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas. Deste estudo, o esqualeno foi selecionado como o núcleo oleoso mais promissor para estudos de transfecção. Mais recentemente, o mesmo grupo, descreve a utilização de um óleo de densidade superior ao esqualeno, o lipiodol, que é um óleo derivado da semente de papoula, que apresenta na sua composição ésteres etílicos dos ácidos linoléico, palmítico e esteárico. De fato, os resultados *in vitro* demonstraram que as nanoemulsões contendo o referido óleo apresentam maior atividade de transfecção. Óleos de densidade inferior a da água apresentam menor probabilidade de contato com a superfície das células, ao passo que as gotículas contendo óleos de alta densidade tendem a sedimentar na superfície das células, aumentando a atividade de transfecção (YOO et al., 2004).

Outro estudo relativo à seleção do núcleo oleoso de nanoemulsões foi realizado visando ao encapsulamento do complexo formado entre o lipídeo catiônico EA e ON na fase interna dos sistemas visando a reduzir a velocidade de liberação dos ON (TEIXEIRA et al., 2001B). Os autores avaliaram a influência da natureza de diferentes núcleos (triglicerídeos, oleato de etila, benzoato de benzila, álcool benzílico) na partição do complexo formado entre a EA e um ON, com o objetivo de selecionar um núcleo oleoso para a composição da fase interna das nanoemulsões. Os resultados demonstraram que os complexos lipídeos catiônicos/ON são apenas parcialmente solúveis em solventes que apresentam elevados valores de EHL, como por exemplo, o álcool benzílico (TEIXEIRA et al., 2001B).

Devido à sensibilidade ao oxigênio, a adição de antioxidantes no preparo de nanoemulsões compostas de fosfolipídeos e óleos vegetais tem sido descrita (TEIXEIRA et al., 1999). A oxidação desses constituintes pode influenciar de maneira decisiva a estabilidade física do sistema (BENITA e LEVY, 1993). O α -tocoferol e mesilato de desferoxamina têm sido empregados como antioxidantes de nanoemulsões (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999), sendo que o α -tocoferol tem sido o antioxidante mais comumente utilizado em nanoemulsões, provavelmente devido à sua incorporação em nanoemulsões lipídicas comerciais (Lipofundin[®] e Trivé 1000[®]) (FLOYD, 1999).

Interface

As nanoemulsões utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucleicos caracterizam-se por apresentarem uma interface composta por um agente tensoativo carregado positivamente. Esses têm por objetivo principal a associação dos ácidos nucleicos com a estrutura coloidal (TEIXEIRA et al., 1999, 2003; TAMILVANAN, 2004). No caso particular de polinucleotídeos de elevado peso molecular, como o DNA, a presença dos lipídeos catiônicos na interface tem a função de associar e compactar o ácido nucleico visando a um efetivo transporte intracelular (EASTMAN et al., 1997; BROWN et al., 2001).

A tabela 1 indica que os lipídeos catiônicos mais empregados na composição das nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de polinucleotídeos são a EA, o DOTAP e o DC-Chol. A figura 2 apresenta a estrutura química desses lipídeos.

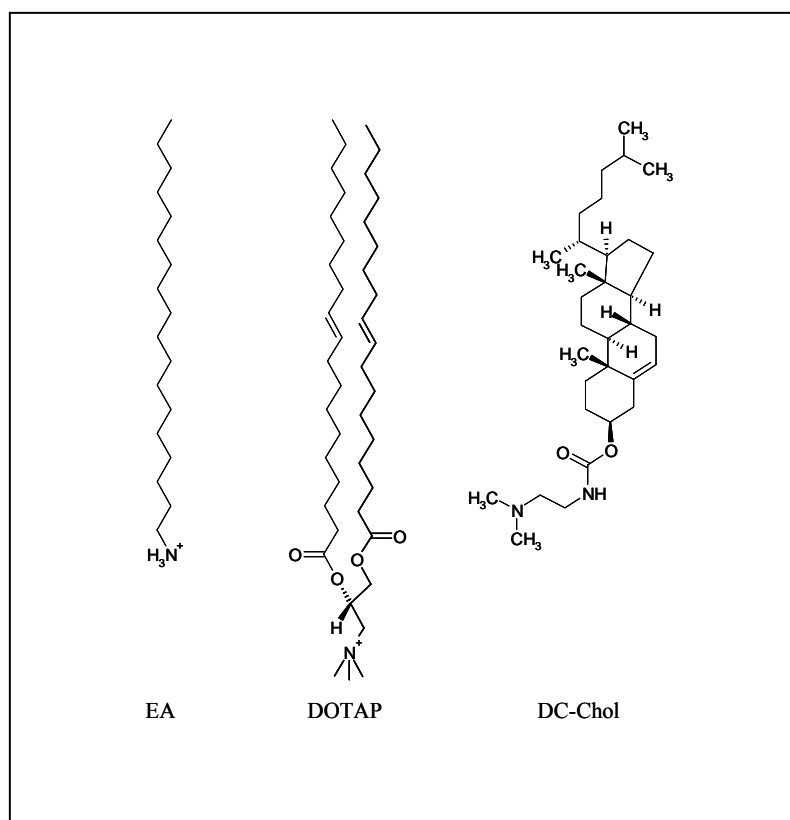


Figura 2. Estrutura química dos lipídeos catiônicos EA, DOTAP e DC-Chol, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.

Como pode ser observado na figura 2, os lipídeos catiônicos podem ser formados por três partes distintas: o domínio hidrofóbico, o domínio hidrofílico, e em alguns casos, um braço espaçador. No que se refere ao domínio hidrofóbico, as cadeias hidrocarbonadas e o grupamento colesteril representam os dois grupamentos mais freqüentemente descritos (CHESNOY e HUANG, 2000). Os lipídeos catiônicos de cadeia simples são também denominados tensoativos, devido a sua conhecida capacidade de formar micelas em solução, como é o caso da EA. A associação de ON ou DNA com nanoemulsões catiônicas contendo o lipídeo catiônico EA tem sido descrita na literatura visando principalmente vias de aplicações locais, como a intratumoral (TEIXEIRA et al., 2003) e pulmonar (BIVAS-BENITA et al., 2004).

Os lipídeos catiônicos de cadeia dupla representam a maioria dos lipídeos utilizados em nanoemulsões para liberação de ácidos nucléicos. A cadeia hidrocarbonada insaturada oleil contendo 18 átomos ($C_{18:1}$) de carbono é a que aparece mais freqüentemente neste tipo de formulação (ex. DOTAP, DOTMA), ao passo que para as cadeias saturadas, as de maior freqüência são C_{18} (ex. RPRC₁₈), C_{16} (ex. CTAB) e C_{14} (RPRC₁₄). Segundo Kim e colaboradores (2001), o tamanho de cadeia, bem como o grau de insaturação, podem ter influência na atividade de transfecção de nanoemulsões catiônicas. Os autores demonstraram através de estudos *in vitro* que a capacidade de transfecção diminui à medida que se aumenta o tamanho da cadeia hidrocarbonada, para os tensoativos bicatenários DSTAP ($C_{18:0}$), DPTAP ($C_{16:0}$) e DMTAP ($C_{14:0}$), embora a maior atividade de transfecção tenha sido observada para o lipídeo catiônico DOTAP (figura 2), que apresenta como grupamento polar uma amina quaternária e duas cadeias hidrocarbonadas insaturadas ($C_{18:1}$), evidenciando desta forma a influência da natureza da cadeia hidrocarbonada na capacidade de transfecção das nanoemulsões.

O uso de lipídeos catiônicos derivados do colesterol também tem sido descrito na literatura de sistemas nanoemulsionados, com destaque para o lipídeo catiônico DC-Chol, que apresenta no seu domínio hidrofóbico um grupamento colesterila, que serve como âncora hidrofóbica (HARA et al., 1997). Zhdanov e colaboradores (2002) relataram que, no caso do DNA, a presença de colesterol é capaz de aumentar a estabilidade dos sistemas na circulação sanguínea devido à interação do complexo formado entre o DNA e colesterol com os outros constituintes do filme interfacial.

O braço espaçador representa a porção do lipídeo catiônico entre os domínios hidrofóbico e hidrofílico. Essa porção tem sido considerada crucial no sentido de assegurar o contato entre o grupamento polar catiônico e o grupamento fosfato dos ácidos nucleicos, bem como na atividade de transfecção. Nos lipídeos catiônicos contendo cadeia hidrocarbonada dupla, um esqueleto de 3 carbonos do glicerol é utilizado como espaçador. Para os tensoativos catiônicos derivados do colesterol, um espaço de 3 a 6 carbonos entre o grupamento amina e o espaçador é necessário para a atividade. Ainda, os derivados contendo espaçadores biodegradáveis, como por exemplo, os ésteres e amidas, são menos tóxicos que aqueles que não apresentam grupamentos biodegradáveis (CHESNOY e HUANG, 2000). No caso dos lipídeos catiônicos DOTAP e DC-Chol, a presença de um éster como braço espaçador representa uma vantagem em termos de biodegradabilidade, em relação a outros lipídeos que não apresentam este grupamento, podendo facilitar a liberação dos ácidos nucleicos a partir do sistema coloidal (CHESNOY e HUANG, 2000; ZHDANOV et al., 2002).

De maneira geral, os lipídeos utilizados na composição das nanoemulsões são moncatiônicos, podendo apresentar funções amina primárias (ex. estearilamina), secundárias (ex. DOGS), terciárias (ex. DC-Chol) ou ainda quaternárias (ex. DOTAP). O grupamento amina é responsável pelas interações eletrostáticas que ocorrem entre os lipídeos catiônicos e os grupamentos fosfato, carregados negativamente, dos ácidos nucleicos. Dependendo do tipo de amina presente no lipídeo catiônico, a carga positiva conferida pode ser ou não dependente do pH do meio. A utilização de lipídeos policatiônicos (p.ex. RPR C₁₈) tem sido menos freqüentemente descrita na obtenção de nanoemulsões, em comparação aos lipídeos moncatiônicos, geralmente por razões de toxicidade (TEIXEIRA et al., 2001; ZHANG et al., 2004).

Apesar do relato da obtenção de nanoemulsões catiônicas apenas com a adição de lipídeos catiônicos (KIM et al., 2003), a grande maioria utiliza estes em misturas binárias com fosfolipídeos, como pode ser observado na tabela 1. Os fosfolipídeos podem ser originários de fontes naturais, como as lecitinas, e semi-sintéticos, como DOPE e DSPC (figura 3). O uso de fosfolipídeos na composição de emulsões de uso parenteral tem sido correntemente descrito por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999). Além das cadeias hidrocarbonadas que podem ser saturadas (DSPC) ou insaturadas (DOPE), os fosfolipídeos apresentam um grupamento polar cuja carga depende do pH do meio. Desta

forma, um dos objetivos da utilização destes lipídeos em combinação com os lipídeos catiônicos é a otimização da relação de cargas positivas (lipídeos catiônicos) e negativas (ácidos nucleicos). Adicionalmente, segundo Kim e colaboradores (2001), a adição de fosfolipídeos semi-sintéticos, como DOPE, é capaz de melhorar a atividade de transfecção *in vitro* e *in vivo* de nanoemulsões catiônicas devido às propriedades fusogênicas deste fosfolipídeo.

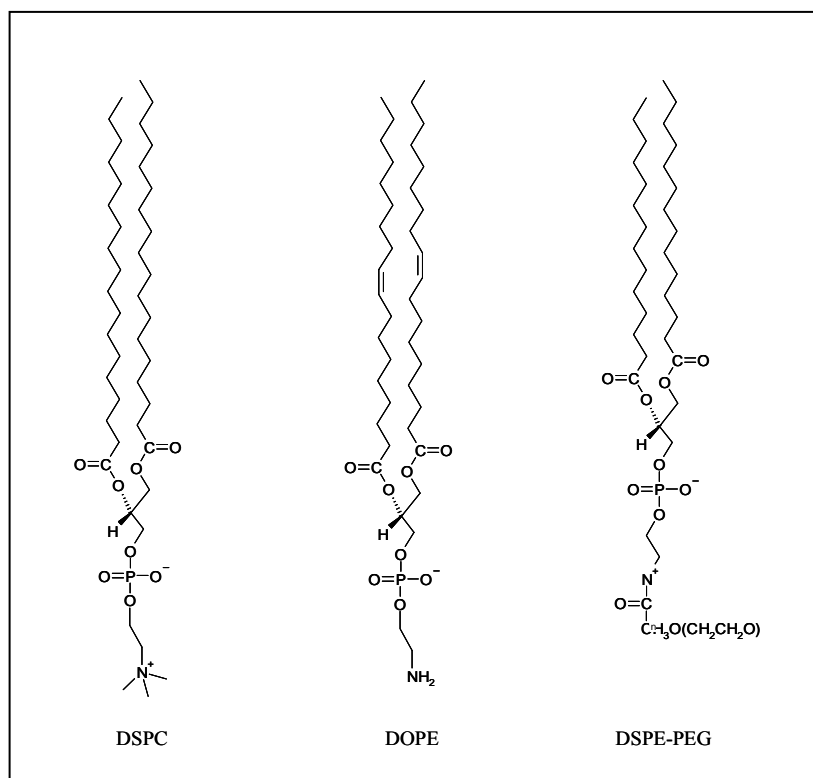


Figura 3. Estrutura química dos fosfolipídeos DSPC, DOPE e DSPE-PEG, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.

O uso de fosfolipídeos ligados covalentemente ao polietilenoglicol (PEG), como o DSPE-PEG (figura 3), em associação com outros fosfolipídeos, tem sido relatado na composição de nanoemulsões como veículo de DNA (YI et al., 2000; CHESNOY et al., 2001) e ON (TEIXEIRA et al., 2001A, 2001B). A incorporação desses lipídeos em nanoemulsões visa alguns objetivos, entre eles, aumentar a estabilidade física das formulações e reduzir as interações de proteínas com as nanoemulsões catiônicas. De fato, tem sido demonstrado que a presença de lipídeos-PEG na interface de sistemas coloidais cria uma barreira estérica ao acesso de proteínas, prevenindo assim a agregação das nanoestruturas (LIU et al., 1996; HUNG et al., 2005).

Com os mesmos objetivos da incorporação de lipídeos-PEG, alguns autores descrevem o uso de tensoativos não-iônicos (figura 4) na preparação de nanoemulsões contendo DNA (LIU et al., 1996; HARA et al., 1997; KIM et al., 2001; CHOI et al., 2004; MIN et al., 2005). Os tensoativos propostos nessas formulações (figura 4) são geralmente os ésteres de ácidos graxos do sorbitano, como a série dos Tweens[®] e Spans[®], que de maneira geral, são aprovados em várias farmacopéias para uso parenteral (THE UNITED, 1998; BRITISH, 1999). O Span 80[®] apresenta o mesmo grupamento hidrofóbico do Tween 80[®], contudo, diferindo na presença de três cadeias de polioxietileno por molécula no Tween 80[®]. Aos tensoativos como o Tween 80[®], têm sido atribuída a formação de uma barreira estérica na interface através de suas cadeias de caráter hidrofílico, impedindo assim a aproximação e agregação das nanoemulsões com proteínas (HARA et al., 1997; CHOI et al., 2002).

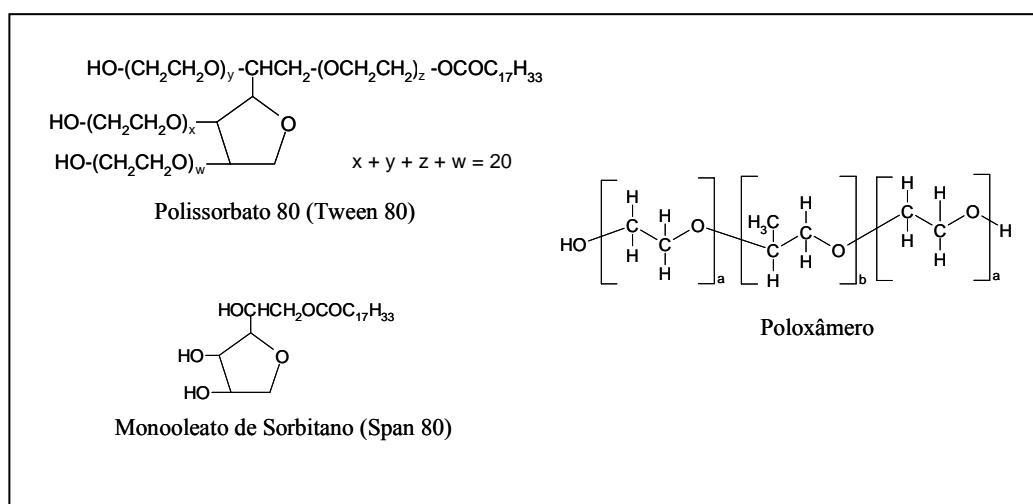


Figura 4. Estrutura química dos tensoativos não-iônicos, Span 80[®], Tween 80[®] e Poloxâmero, empregados na composição de nanoemulsões catiônicas.

Na mesma linha, a adição de tensoativos sintéticos da série dos poloxâmeros em associação com fosfolipídeos, na composição de nanoemulsões catiônicas, tem sido relatada (tabela 1). Os poloxâmeros são copolímeros do óxido de etileno e propileno, de natureza não iônica, utilizados por suas propriedades de estabilização estérica de estruturas coloidais (KLANG et al., 1994). Jumaa e Müller (1999) demonstraram uma estabilidade superior de nanoemulsões constituídas de misturas do óleo de rícino com óleo de soja ou TCM, e estabilizadas por poloxâmero 188[®] em comparação ao uso de outros co-tensoativos durante autoclavagem. Os autores relacionaram este efeito com o elevado ponto de turvação do poloxâmero 188[®] em relação a outros tensoativos, como o polissorbato 80, resultando em uma maior resistência frente à desidratação durante a operação de esterilização.

Apesar das vantagens relacionadas à adição de tensoativos de natureza não iônica e lipídeos-PEG na composição de nanoemulsões catiônicas, seja no que se refere à estabilidade física do sistema ou do complexo formado em presença de proteínas, alguns autores têm relatado a influência negativa destes tensoativos na eficiência de transfecção. Como um exemplo, Kim e colaboradores (2001) descreveram uma maior atividade de transfecção para DNA veiculado em nanoemulsões contendo o Tween 80 em relação aquelas contendo fosfatidiletanolamina-PEG e o tensoativo Poloxâmero 188. Os autores atribuíram estes resultados à interferência da porção hidrofílica desses tensoativos (de elevado peso molecular) no acesso das nanoestruturas às células e no escape dos endossomas, indicando a necessidade de otimização das nanoemulsões contendo esses tensoativos como sistemas de liberação para ácidos nucleicos.

Fase aquosa

A adição de outros adjuvantes na fase aquosa de nanoemulsões é necessária a fim de ajustar algumas propriedades das formulações, como a isotonicidade e o pH, de modo que seja compatível com os fluídos biológicos, de acordo com a via de administração pretendida. Apesar do relato da atividade hemolítica *in vitro* do glicerol ser superior a de outros agentes isotonizantes, como o xilitol e o sorbitol, conforme descrito por Jumaa e Müller (1999), o glicerol é atualmente o agente isotonizante mais utilizado na composição de nanoemulsões de uso parenteral, e pode ser encontrado em algumas das formulações catiônicas descritas na tabela 1 (TEIXEIRA et al., 1999, 2001, 2003; TRIMAILLE et al., 2001, 2003). O uso de eletrólitos como isotonizantes de emulsões é desaconselhado, uma vez que esses podem interagir fortemente com colóides, influenciando a sua estabilidade (WASHINGTON, 1996).

O pH das nanoemulsões é geralmente ajustado para valores próximos a 7,4 com soluções aquosas de ácido clorídrico, por razões fisiológicas. Esse procedimento tem sido correntemente descrito para formulações de nanoemulsões catiônicas as quais contém em sua composição lipídeos catiônicos cujo grupamento polar é uma amina primária, uma vez que esses lipídeos conduzem a formulações com valores de pH alcalinos (TEIXEIRA et al., 1999; 2001a, 2001b). Por outro lado, alguns autores descrevem o ajuste de pH de nanoemulsões lipídicas por razões de estabilidade, visando evitar a hidrólise de TCM, TCL e fosfolipídeos, formando ácidos graxos livres (RABINOVICH-GUILATT et al., 2005).

Métodos de Preparação das Nanoemulsões

Diversos procedimentos têm sido descritos para a produção de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos. Esses geralmente utilizam equipamentos como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou ultra-som (MAA e HSU, 1999; NAINI e SINGH, 2002; BIVAS-BENITA et al., 2004). A obtenção de nanoemulsões catiônicas através de técnicas baseadas no uso de solventes orgânicos, como a emulsificação espontânea, tem sido recentemente descrita (TEIXEIRA et al., 2002; TRIMAILLE et al., 2003). A tabela 2 demonstra a aplicação destes procedimentos.

Tabela 2. Exemplos representativos do tipo de metodologia empregada no desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos.

Ácido Nucléico	Metodologia de Preparo	Referência
DNA pCMV-CAT	Microfluidização	Kim et al., 1999
DNA pSV-CAT	Microfluidização	Yi et al., 2000
DNA pCMVKm	Microfluidização	Ott et al., 2002
DNA pCMV-Luc	Sonicação	Choi et al., 2002; Yoo et al., 2004
DNA pCMV- β	Sonicação	Kim et al., 2001, 2002, 2003, 2005; Chung et al., 2001; Choi et al., 2002
DNA pEGFP-C1	Sonicação	Choi et al., 2004
DNA pGL3	Sonicação	Barut et al., 2005
DNA pCMV-LacZ	Sonicação	Hung et al., 2005
DNA Ag85B	Homogeneização à alta pressão	Bivas-Benita et al., 2004
ON pdT ₁₆₋₅₀	Microfluidização	Teixeira et al., 1999; 2001 ^a ; 2001 ^b , 2003
ON pdT ₁₆	Emulsificação espontânea	Teixeira et al., 2002
ON pdT ₁₅	Emulsificação espontânea	Trimaille et al., 2003

A obtenção de nanoemulsões através do uso de homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores tem sido descrita na literatura, como pode ser observado na tabela 2. De maneira geral, a preparação de nanoemulsões através desses procedimentos pode ser dividida

em duas fases distintas. Em uma primeira etapa, as fases aquosa e oleosa, contendo os componentes hidro ou lipofílicos, respectivamente, são aquecidas separadamente (~70 °C) e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade (como Ultraturrax® e Politron®). A emulsão primária obtida apresenta um diâmetro de gotícula submicrométrico, influenciado pelo equipamento utilizado e pelas condições operacionais. Após resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro de gotícula é progressivamente reduzido até valores compreendidos entre 100 e 300 nm através da utilização de homogeneizadores de alta pressão (BIVAS-BENITA et al., 2004) ou microfluidizadores (TEIXEIRA et al., 1999, 2001, 2003).

Os homogeneizadores de alta pressão consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positivo a qual injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em uma válvula homogeneizadora (LACHMAN et al., 2001), enquanto que os microfluidizadores são constituídos de uma câmara de interação onde o fluido é injetado e homogeneizado por corte, impacto e cavitação. Fatores como temperatura, viscosidade e concentração da fase interna das emulsões influenciam as características físico-químicas do produto final e a otimização das condições operacionais deve ser realizada para cada sistema desenvolvido e tipo de equipamento utilizado (BENITA e LEVY, 1993; JUMAA e MÜLLER, 1998; LIEDTKE et al., 2000; TADROS et al., 2004). Além da maior disponibilidade de equipamentos para a preparação em escala laboratorial, a obtenção de nanoemulsões de reduzido diâmetro de gotícula monodisperso e a maior facilidade de transposição de escala tem sido descritas como vantagens da microfluidização em relação à homogeneização a alta pressão (MAA e HSU, 1999; NAIRN, 2000; NAINI e SINGH, 2002).

O uso de ultra-som para a preparação de nanoemulsões catiônicas também tem sido descrito por vários autores. Encontram-se disponíveis no mercado diferentes modelos de sonicadores para a produção de nanoestruturas em escala laboratorial (NAIRN, 2000). Geralmente, o fluido é primeiramente conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina e a vibração desta produz ondas ultrasônicas, que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de diâmetro reduzido (BOLDYREV, 1995; MIZUKOSHI et al., 1999; MAA e HSU, 1999). Os principais parâmetros que envolvem este procedimento de

homogeneização são as propriedades interfaciais da emulsão, que podem ser controladas pela natureza e concentração dos tensoativos e pelas propriedades do óleo, em especial, a tensão superficial e a viscosidade (DELAIR, 2004). O uso de homogeneizadores e ultra-som podem conduzir à obtenção de nanoemulsões de propriedades físico-químicas equivalentes através da otimização das condições operacionais e da composição quali e quantitativa das formulações (MAA e HSU, 1999). Contudo, alguns autores têm relatado algumas desvantagens em relação à utilização de ultra-som, como o aquecimento excessivo da amostra, contaminação do produto com resíduos de titânio provenientes da sonda, largas distribuições de tamanho de gotícula e baixa reprodutibilidade em relação ao diâmetro de gotícula, além de problemas relacionados às dificuldades de transposição de escala (WASHINGTON e DAVIS, 1988; SORGI e HUANG, 1996). A associação de ácidos nucléicos com nanoemulsões obtidas por ultra-som deve ser realizada após o procedimento de homogeneização, uma vez que existem relatos da degradação de ON utilizando esse procedimento (ZOBEL et al., 1999).

Mais recentemente, a viabilidade de preparação de nanoemulsões catiônicas como sistema de liberação de ácidos nucléicos através de emulsificação espontânea foi descrito na literatura (TRIMAILLE et al., 2001, 2003; TEIXEIRA et al., 2002). Através desta técnica é possível preparar nanoemulsões com propriedades físico-químicas similares àquelas obtidas por métodos físicos, com a vantagem de ser uma técnica simples, de menor custo, rápida, e que permite preparar pequenos lotes de formulação em temperaturas inferiores àquelas utilizadas pelas outras técnicas. Além disso, a emulsificação espontânea possibilita a funcionalização da interface das nanoemulsões através da nanoprecipitação de polímeros pré-formados (TRIMAILLE et al., 2001; 2003; CHAIX et al., 2003). Este método baseia-se no processo de emulsificação espontânea de uma fase oleosa contendo tensoativos. Esta fase oleosa é solubilizada em solvente orgânico apropriado, e após misturada, sob agitação mecânica moderada, com uma fase aquosa. O solvente orgânico é então removido por evaporação sob pressão reduzida (YU et al., 1993). A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente na água. Após a adição da fase orgânica na água, é observado um rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas. Esta instabilidade mecânica é causada por variações locais na tensão interfacial, que é capaz de deslocar o óleo para a fase aquosa (MOSQUEIRA et al., 2000; BOUCHEMAL et al., 2004).

Propriedades das Nanoemulsões

Diâmetro de gotícula das nanoemulsões

Dentre as principais propriedades dos sistemas multifásicos, como as nanoemulsões, encontram-se o diâmetro e a distribuição de gotículas da fase interna. Nanoemulsões apresentam geralmente uma distribuição unimodal e diâmetro médio compreendido entre 100 e 300 nm (HASKELL et al., 1998). Várias metodologias têm sido empregadas com o propósito de avaliar o diâmetro de gotícula de nanoemulsões, sendo que o valor esperado é o principal critério para a seleção do método a ser utilizado (WESTESEN e WEHLER, 1993). Espectroscopia de correlação de fótons, também denominada de espalhamento de luz dinâmica, e técnicas complementares de microscopia, como transmissão, varredura e criofratura têm sido correntemente utilizadas (BENITA e LEVY, 1993; HASKELL, 1998; TIAN e LI, 1998). Diversos fatores podem influenciar a distribuição e o diâmetro médio de gotícula de nanoemulsões catiônicas utilizadas como sistemas de liberação de ácidos nucléicos, em especial, a composição quali e quantitativa das formulações e as condições experimentais utilizadas nas metodologias de preparação (ISHII et al., 1990; JUMAA e MÜLLER, 1998; CHUNG et al., 2001).

O efeito da concentração e das propriedades físico-químicas do núcleo oleoso (i.e. viscosidade e tensão interfacial) sobre o diâmetro médio das nanoestruturas formadas tem sido investigado (JUMMA et al., 1998; JUMAA e MULLER, 1998; CHUNG 2001). Dentre uma gama de 18 tipos de óleos de origem animal, vegetal e mineral estudados por Chung e colaboradores (2001), aqueles de maior tensão interfacial, como o esqualeno, girassol e jojoba, conduziram à obtenção de formulações de menores diâmetros de gotícula (< 250 nm). Outros autores têm descrito a influência da concentração de fase interna e da viscosidade dos óleos empregados sobre o aumento significativo do diâmetro de gotícula. Contudo, Jumaa e colaboradores (1998), demonstraram que a metodologia de preparo das formulações pode se sobrepor à influência das propriedades físico-químicas dos óleos utilizados. A obtenção de nanoemulsões contendo 30 % de óleo de rícino (um óleo de maior viscosidade) com diâmetro e índice de polidispersidade comparáveis àquelas obtidas com 20% de TCM (um óleo de menor viscosidade), através da otimização da pressão e número de ciclos de homogeneização, foi claramente demonstrado por Jumaa e Muller (1998).

Considerando a bem estabelecida influência dos constituintes do filme interfacial no diâmetro de nanoestruturas, estudos relativos à otimização do diâmetro de gotícula de nanoemulsões, em função da adição de concentrações crescentes de tensoativos catiônicos, têm sido realizados. Como um exemplo, Kim e colaboradores (2001) demonstraram a influência da adição do lipídeo catiônico DOTAP no diâmetro de gotícula de nanoemulsões obtidas por ultra-som. Foram preparadas diversas formulações constituídas de um núcleo oleoso de esqualeno estabilizadas por concentrações crescentes de DOTAP (3 a 30 mg/mL). Nas mesmas condições de homogeneização por ultra-som, os resultados demonstraram que o diâmetro de gotícula das formulações diminui à medida que se aumenta a concentração de DOTAP até 24 mg/mL (~260 a 130 nm), sendo que a partir desta concentração o diâmetro atinge um platô, sem apresentar uma redução suplementar do diâmetro de gotícula. Além disso, os autores relacionaram o maior diâmetro das nanoemulsões obtidas com menores concentrações de DOTAP (até 9 mg/mL) com a instabilidade do sistema em função do tempo e em presença de meio tampão fosfato.

A associação de ácidos nucléicos com nanoemulsões catiônicas também pode exercer uma influência marcante sobre o diâmetro e distribuição das gotículas, podendo conduzir a desestabilização do sistema. Contudo, a formação de agregados da fase interna das nanoemulsões tem sido relacionada principalmente com a associação de elevadas concentrações de ácidos nucléicos (LIU et al., 1996; HARA et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2001; KIM et al., 2002). De maneira geral, estudos preliminares prevêm uma zona de concentração na qual o ácido nucléico veiculado não interfere na estabilidade da estrutura coloidal (OTT et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; BIVAS-BENITA et al., 2004; SILVA et al., 2004). Uma relação de cargas [+/-] positiva é geralmente utilizada, ou seja, um excesso de carga positiva aportada pelos lipídeos catiônicos em relação ao número de grupamentos fosfato dos ácidos nucléicos. Trimaille e colaboradores (2003) descrevem, entretanto, a manutenção do diâmetro de gotícula de nanoemulsões contendo ON e DNA em relações [+/-] negativas, após a passagem por uma zona de agregação das gotículas da fase interna (de potencial zeta tendendo a nulo), na qual a estabilidade das nanoemulsões seria assegurada pela repulsão eletrostática dos ácidos nucléicos adsorvidos na interface O/A.

Atualmente, grande parte dos estudos de formulação tem como foco a manutenção do diâmetro de gotícula após a diluição tanto em tampão como em meio de cultura de células contendo proteínas, uma vez que a redução da eficiência de transfecção devido à agregação de

sistemas coloidais catiônicos tem sido descrita (FELGNER et al., 1987; GAO et al., 1991). Assim, a adição de co-tensoativos de natureza não-iônica na composição de nanoemulsões tem sido considerada por diversos autores (LIU et al., 1996; HARA et al., 1997; KIM et al., 2001; CHOI et al., 2002, 2004). A capacidade de formar uma barreira estérica na interface, impedindo a aproximação e agregação das nanoemulsões com proteínas plasmáticas tem sido investigada. Kim e colaboradores (2001) compararam emulsões estabilizadas pela mistura de tensoativos DOTAP e DOPE na presença ou ausência de Tween 80[®]. Foi demonstrado através de medidas turbidimétricas que a incorporação do Tween 80[®] conduziu a uma estabilidade superior das nanoemulsões em função do tempo, em comparação aquelas obtidas em ausência desse tensoativo, para as quais foi observada a formação de agregados, resultando na completa separação de fases dos sistemas.

Em continuidade, em um outro estudo, Kim e colaboradores (2002) avaliaram a influência da presença de tensoativos não-iônicos em sistemas nanoemulsionados contendo plasmídeo DNA pCMV- β , a fim de elucidar a função do Tween 80[®] na estabilidade das nanoemulsões. Foram selecionados diversos tensoativos não iônicos de estrutura química similar ao Tween 80[®] com diferentes tamanhos de cadeia PEG e alifáticas. Esses tensoativos conduziram à obtenção de nanosistemas de menor diâmetro de gotícula estáveis em meio tamponado e frente à associação de DNA. Em contrapartida, as formulações obtidas na presença de tensoativos que não contém cadeias PEG (i.e. Span 80[®], Montanide 80[®] e álcool oleílico) apresentaram um aumento significativo do diâmetro de gotícula em meio tamponado e mostraram-se instáveis frente à associação de DNA. Resultados similares foram demonstrados por Liu e colaboradores (1996), embora nestes estudos os autores tenham utilizado DC-Chol como lipídeo catiônico e óleo de rícino como constituinte do núcleo oleoso.

Potencial zeta das nanoemulsões

O potencial zeta reflete a composição da interface das nanoemulsões, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A determinação do potencial zeta é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Um elevado valor de potencial zeta em módulo (> 30mV) é importante para a estabilidade físico-química das emulsões, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações da fase interna (BENITA e LEVY, 1993; KLANG e BENITA, 1998; ROLAND et al., 2003).

Como descrito na tabela 1 (página 10), a maior parte das nanoemulsões é composta por fosfolipídeos, que apresentam ionização dependente do pH do meio. Os fosfolipídeos purificados (i.e. DSPC e DOPC) originam nanoemulsões de potencial zeta tendendo a nulo em pH 7,4, enquanto que as lecitinas, de gema de ovo ou soja, conduzem a nanoemulsões de potencial zeta negativo. De fato, as lecitinas são misturas heterogêneas de fosfolipídeos neutros e ácidos, sendo que estes últimos apresentam carga negativa em pH neutro (BENITA e LEVY, 1993). Assim, a eficiência de associação de poliânions, como os ácidos nucleicos, é reduzida com nanoemulsões estabilizadas por fosfolipídeos devido a fenômenos de repulsão eletrostática estabelecidos na interface O/A (TEIXEIRA et al., 2001B). Desta forma, a adição de lipídeos catiônicos na formulação das nanoemulsões origina uma interface carregada positivamente ($\zeta=30-55$ mV) visando a associação de ácidos nucleicos (TEIXEIRA et al., 1999; YANG e BENITA, 2000; TEIXEIRA et al., 2001).

O potencial zeta depende tanto da concentração como da extensão de ionização dos grupamentos de carga positiva presentes nos lipídeos catiônicos. Alguns estudos tratam da avaliação sistemática da influência da concentração dos lipídeos catiônicos sobre o potencial zeta de nanoemulsões. Kim e colaboradores (2003) avaliaram o potencial zeta de nanoemulsões catiônicas constituídas de um núcleo de esqualeno e concentrações crescentes do lipídeo catiônico DOTAP. Os autores demonstraram um aumento progressivo do potencial zeta ($\sim 30 - 75$ mV) das nanoemulsões até uma determinada concentração (24 mg/mL), a partir da qual, a adição suplementar de DOTAP, não conduz a um aumento significativo do potencial zeta. Outros autores também têm descrito a observação de um platô dos valores de potencial zeta de nanoemulsões catiônicas contendo os lipídeos catiônicos EA (SILVA et al., 2004), AO (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004) e CTAB (BARUT et al., 2005). Essas observações têm sido atribuídas a diferentes fenômenos incluindo a possibilidade de saturação da interface e a redução da ionização devido ao elevado pH da interface neste tipo de sistema (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004).

Apesar dos estudos de associação de polinucleotídeos com nanoemulsões catiônicas serem realizados geralmente em excesso de carga positiva, cujo potencial zeta permanece inalterado (TEIXEIRA et al., 1999; BARUT et al., 2005), estudos relativos à caracterização do potencial zeta de nanoemulsões em função da concentração de ácido nucleico têm sido recentemente descritos na literatura (OTT et al., 2002; YOO et al., 2004; MIN et al., 2005; YI et al., 2005).

Geralmente, os experimentos são realizados com a adição de concentrações crescentes de DNA, em solução aquosa, a nanoemulsões de concentração conhecida de lipídeo catiônico. O potencial zeta positivo decresce progressivamente até valores negativos, indicando a associação dos ácidos nucleicos com a interface das nanoemulsões. Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões também têm sido descritos quando a relação de carga [+/-] aproxima-se da unidade, uma vez que os fenômenos de repulsão das gotículas da fase interna estão reduzidos para os complexos formados nessa relação de cargas (TRIMAILLE et al., 2003; MIN et al., 2005).

A incorporação de fosfolipídeos conjugados com o polietilenoglicol em nanoemulsões catiônicas contendo ON (TEIXEIRA et al., 2001b) e DNA (CHESNOY et al., 2001; KIM et al., 2001) tem sido descrita na literatura. Nesses estudos, a avaliação do potencial zeta tem sido empregada com a finalidade de demonstrar a localização da DSPE-PEG na interface das nanoemulsões. Independente do lipídeo catiônico (EA ou DOTAP) ou do núcleo oleoso (óleo de oliva, TCM ou esqualeno) utilizado, a adição de DSPE-PEG reduz o potencial zeta em até cerca de 20 mV, indicando o mascaramento da carga positiva aportada pelos lipídeos catiônicos pelas cadeias PEG localizadas na interface das nanoemulsões (CHESNOY et al., 2001; KIM et al., 2001). No caso específico de ON, foi evidenciada a redução progressiva do potencial zeta com a adição crescente do ON p_{DT16} apenas para nanoemulsões catiônicas contendo o DSPE-PEG sugerindo a interação dos ON com as cadeias PEG na interface das nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001b).

pH das nanoemulsões

O pH das nanoemulsões catiônicas está geralmente situado a valores próximos a 7,4, principalmente por razões fisiológicas. A avaliação do pH de nanoemulsões tem sido correntemente descrita no monitoramento da estabilidade de nanoemulsões lipídicas. Nanoemulsões são física e quimicamente estáveis em valores de pH próximos a 7,4 (BENITA e LEVY, 1993). Esse fato está relacionado à taxa de hidrólise dos ésteres de ácidos graxos dos triglicerídeos de cadeia média (TCM) e fosfolipídeos que, após hidrólise, liberam ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres formados reduzem o pH das formulações, sendo empregados como indicadores de estabilidade de nanoemulsões em diferentes condições de temperatura e armazenamento e frente à operação de esterilização. A figura 5 demonstra a

principal via de degradação dos fosfolípidos através da hidrólise da diacilfosfatidilcolina e diacilfosfatidiletanolamina gerando os derivados correspondentes monoacilados e ácidos graxos livres. Ácidos graxos livres podem também se formar pela hidrólise de triglicerídeos de cadeia média, formadores do núcleo oleoso, em seus mono e diglicerídeos correspondentes, apesar desta reação ser mais lenta quando comparada com a hidrólise de fosfolípidos (BENITA e LEVY, 1993; TAMILVANAN et al., 2001).

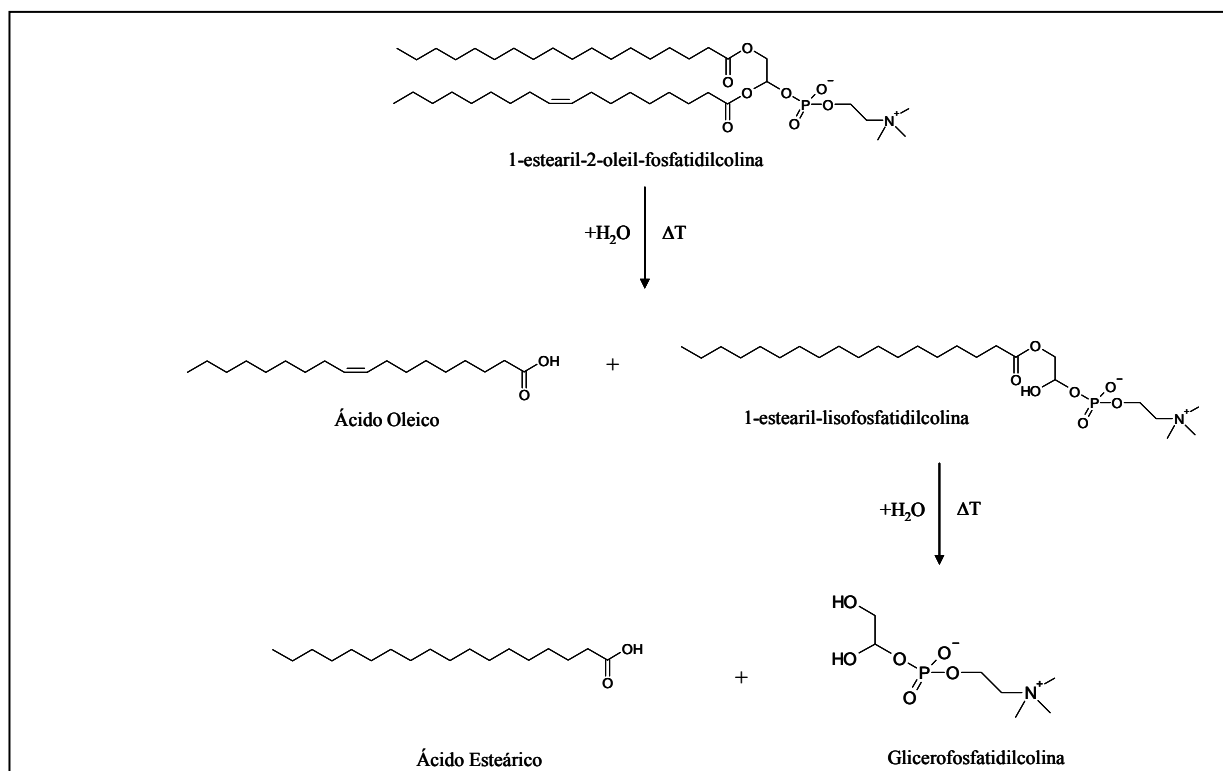


Figura 5. Principal rota de formação de ácidos graxos livres através da hidrólise dos fosfolípidos.

O ajuste do pH de nanoemulsões catiônicas com ácidos diluídos tem sido descrito para formulações compostas de lipídeos catiônicos que apresentam na sua estrutura química grupamentos amins primárias como a EA (TEIXEIRA et al., 1999, 2001, 2003) e a OA (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004). De fato, o pH final das nanoemulsões pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface. Relatos da redução da ionização do lipídeo catiônico oleilamina ($pK \sim 10$) têm sido descritos para nanoemulsões em valores de pH alcalinos (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004), podendo assim reduzir os sítios de interação da interface para a associação dos ácidos nucléicos.

Trimaille e colaboradores (2003) avaliaram a influência do pH do meio de diluição no potencial zeta de nanoemulsões constituídas de TCM, lecitina de gema de ovo e do lipídeo catiônico estearilamina. Os resultados demonstraram elevados valores de potencial zeta ($\zeta > 60$ mV) em uma ampla faixa de pH compreendida entre cerca de 2 e 7,5, a partir da qual uma redução do potencial zeta foi observada. Uma redução progressiva do potencial zeta das nanoemulsões catiônicas pode ser detectada até um pH próximo de 10, a partir da qual ocorre a inversão do potencial zeta a valores negativos, indicando que à medida que se aproxima do valor de pK do lipídeo catiônico EA (pK=10,4), o grupamento amina passa a estar na forma não-ionizada.

Viscosidade das nanoemulsões

A avaliação da viscosidade de nanoemulsões líquidas tem sido pouco descrita na literatura, contudo, essa propriedade reveste-se de especial importância no desenvolvimento de nanoemulsões de uso parenteral, para as quais uma elevada viscosidade pode representar uma limitação no momento da administração. Diferentes parâmetros como a concentração da fase interna (JUMAA e MÜLLER, 1998), o diâmetro de gotícula (SILVANDER et al., 2003, SILVA et al., 2004) e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (JUMAA e MÜLLER, 1998; CHUNG et al., 2001) podem influenciar a viscosidade de nanoemulsões. A viscosidade de nanoemulsões líquidas apresenta geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano (ISHII et al., 1990; ROLAND et al., 2003; SILVANDER et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar a influência do tensoativo não iônico poloxâmero 188 (um copolímero do óxido de etileno e propileno) sobre a viscosidade de nanoemulsões catiônicas destinadas à liberação de ON, Silva e colaboradores (2004) desenvolveram nanoemulsões catiônicas compostas por TCM, lecitina de gema de ovo e EA, na presença ou ausência do poloxâmero 188. Independente da concentração de EA empregada, existe uma tendência significativa ao aumento da viscosidade de todas as formulações contendo poloxâmero 188, em comparação às formulações na ausência desse tensoativo. Esse resultado, de acordo com os autores, pode estar relacionado ao menor diâmetro das gotículas detectado para as formulações contendo poloxâmero 188, sugerindo um aumento das interações interparticulares, e conseqüentemente, em uma maior viscosidade, como descrito por outros autores (ISHII et al., 1990).

Barut e colaboradores (2005) em seus estudos observaram uma redução na viscosidade de nanoemulsões catiônicas contendo plasmídeo DNA pGL3, compostas por óleo de soja (35%) e estabilizadas pelo tensoativo catiônico CTAB (5%) em função do tempo (até 5 meses após o preparo) e temperatura de armazenamento (4, 25 e 40 °C). Conforme os resultados apresentados, foi observada uma redução da viscosidade das formulações em função do tempo para as amostras armazenadas sob as diferentes temperaturas, embora esta redução tenha sido mais acentuada para as amostras armazenadas à 25 e 40°C. A viscosidade inicial das formulações foi de cerca de 64,5 cP e o decréscimo da viscosidade pode estar relacionado com as alterações do diâmetro de gotícula nas diferentes condições de armazenamento.

Associação de ácidos nucléicos com nanoemulsões

A associação dos ácidos nucléicos com nanoemulsões catiônicas tem sido investigada através de diferentes metodologias. Embora alguns estudos estejam focados na comprovação indireta da associação, seja através das modificações das propriedades físico-químicas das nanoemulsões (i.e. potencial zeta e diâmetro de gotícula) ou na avaliação da estabilidade do complexo formado, como nos ensaios de retardamento em gel de eletroforese (YI et al., 2000; BARUT et al., 2005; KIM et al., 2005), outros autores têm estimado a associação dos ácidos nucléicos com as nanoemulsões de modo quantitativo. A avaliação da taxa de associação baseia-se na diferença entre a quantidade de ácido nucléico (ON ou DNA) adicionada às nanoemulsões e a quantidade não associada determinada quantitativamente na fase aquosa externa da nanoestrutura, após separação desta fase por centrifugação (OTT et al., 2002) ou mais freqüentemente por ultrafiltração-centrifugação (TEIXEIRA et al., 1999; TRIMAILLE et al., 2003; BIVAS-BENITA et al., 2004).

Em relação à técnica de retardamento em gel de eletroforese, a formação do complexo formado entre as nanoemulsões catiônicas e o ácido nucléico de forma qualitativa e/ou semi-quantitativa, especialmente no caso do DNA, é geralmente realizado através de avaliação das alterações no diâmetro de gotícula ou potencial zeta visando demonstrar a associação dos ácidos nucléicos. A avaliação da associação do DNA com as nanoemulsões é determinada experimentalmente utilizando-se diversas razões entre o lipídeo catiônico e o ácido nucléico. O complexo selecionado é aquele que não apresenta nenhuma banda característica de migração de DNA livre no gel de eletroforese, indicando a associação de 100% do DNA com a nanoemulsão (YI et al., 2000; KIM et al., 2002; HUNG et al., 2005; MIN et al., 2005).

No caso de nanoemulsões catiônicas contendo DNA, a separação da fase externa visando a quantificação do DNA não associado com as nanoemulsões tem sido realizada através das metodologias de centrifugação ou filtração em membrana. Ott e colaboradores (2002) determinaram a taxa de associação de DNA com nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DOTAP. Os autores descreveram o doseamento do DNA na fase aquosa externa das nanoemulsões após separação das fases utilizando centrifugação. Uma elevada eficiência de associação do DNA (~95%) adicionado às nanoemulsões foi observada. Em um outro estudo, Bivas-Benita e colaboradores (2004) avaliaram a taxa de associação do DNA para nanoemulsões contendo o lipídeo EA. A quantidade de DNA associado às nanoemulsões foi determinada através da diferença entre a quantidade de DNA adsorvido às gotículas e a quantidade livre na fase aquosa externa, através do uso de membranas de ultrafiltração-centrifugação, sendo que a taxa de associação foi superior a 99% para as concentrações de 0,13 e 0,2mg/mL de DNA. Em ambos os estudos, a elevada taxa de associação obtida foi atribuída ao excesso de moléculas de lipídeos catiônicos presente na interface das gotículas, disponível para interagir com o DNA, através de interações eletrostáticas.

No que se refere à avaliação da associação de ON com nanoemulsões catiônicas, o procedimento de ultrafiltração-centrifugação tem sido correntemente empregado. Teixeira e colaboradores (1999) avaliaram a taxa de associação de uma série de ON politimidilatos contendo de 16 até 50 nucleotídeos com nanoemulsões catiônicas constituídas por TCM, lecitina de gema de ovo e o lipídeo catiônico EA. Nas condições experimentais estudadas, foi demonstrada uma elevada eficiência de associação (~100%) do ON contendo 16 nucleotídeos (pdT₁₆) até a concentração de 200 µM. Para os fragmentos maiores observa-se uma redução progressiva da taxa de associação à medida que se aumenta o tamanho do ON, detectando-se para o ON contendo 50 nucleotídeos (pdT₅₀) a menor taxa de associação (~50%). Utilizando a mesma formulação, Trimaille e colaboradores (2003) descreveram a isoterma de adsorção de um ON pdT₁₅ com as nanoemulsões catiônicas. Os autores sugerem que a adsorção ocorre de forma não-linear, ou seja, a taxa de associação aumenta à medida que se aumenta a concentração de ON, até atingir um platô, no qual ocorre a saturação de cargas positivas disponíveis na interface para interagir com o ON. Este comportamento não-linear, que pode ser descrito pelo modelo matemático de Langmuir, apresenta um processo de adsorção em duas etapas distintas. Na primeira etapa, com ON em baixas concentrações, o processo de adsorção é independente da concentração inicial de ON, devido a grande quantidade de sítios

de interação de carga positiva disponível na interface para interagir com o ON. Após o máximo de adsorção, observado no platô da curva, ocorre a segunda etapa do processo de adsorção, que é dependente da concentração de ON. Nesta etapa, a afinidade das gotículas pelo ON diminui à medida que aumenta a quantidade de ON adsorvido na interface.

Baseados nos resultados obtidos com a associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões contendo EA, estudos relativos à avaliação da eficiência de associação do pdT₁₆ com nanoemulsões contendo outros lipídeos moncatiônicos como o DOTAP ou policatiônicos como o RPRC₁₈ foram realizados. De maneira geral, interações eletrostáticas governam as interações entre os ON e os lipídeos catiônicos, sendo que a relação de cargas é o principal fator que influencia a taxa de associação dos ON com as nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001A, 2001B). Em um estudo de transferência de fluorescência, foi observado que a presença dos lipídeos catiônicos EA, DT e RPRC₁₈ conduz a aproximação dos ácidos nucléicos com a interface das nanoemulsões, ilustrando a formação do par iônico na interface óleo/água (TEIXEIRA et al. 2001B). Contudo, outros constituintes da interface, como os lipídeos peguilados (DSPE-PEG), demonstraram ser capazes de bloquear o acesso dos ON a interface das nanoemulsões, através de um provável mecanismo de impedimento estérico, induzido pelas cadeias de PEG. O conjunto dos resultados obtidos sugere que o pdT₁₆ interage fortemente com o PEG, conduzindo a sua localização mais externa à interface das nanoemulsões.

Liberação de ácidos nucléicos a partir de nanoemulsões

Estudos relativos à liberação de ON associados a partir de nanoemulsões catiônicas têm sido descritos na literatura (TEIXEIRA et al., 1999; 2001A; TRIMAILLE et al., 2003). A avaliação da influência da composição qualitativa (i.e. tipo de núcleo oleoso, natureza dos fosfolipídeos e lipídeos catiônicos) das formulações, bem como dos fatores que governam a liberação de polinucleotídeos a partir da estrutura coloidal têm sido investigados de maneira quantitativa. Assim como no estudo de associação dos ácidos nucléicos, a principal metodologia utilizada para determinar a liberação dos ácidos nucléicos a partir das nanoemulsões é a ultrafiltração/centrifugação, a qual permite a determinação da quantidade de ácido nucléico liberado no ultrafiltrado, após diluição das amostras em diferentes meios (TEIXEIRA et al., 2001A).

Teixeira e colaboradores (1999) avaliaram a liberação do ON pdT₁₆ a partir de nanoemulsões, obtidas na presença ou ausência do lipídeo catiônico EA (0,5 %), após diluição das formulações em água e tampão fosfato em diferentes fatores de diluição (1:200, 1:500 e 1:1000). Os autores observaram a liberação da totalidade do pdT₁₆ veiculado na formulação isenta de lipídeo catiônico após diluição em água ou tampão fosfato. Em contrapartida, a quantidade de ON liberado a partir da nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico EA é de cerca de 20%, independente do meio e do fator de diluição empregado (TEIXEIRA et al., 1999; TRIMAILLE et al., 2003). Esses resultados indicam o efeito do lipídeo catiônico EA na estabilidade do complexo formado entre as nanoemulsões e o fragmento de ácido nucléico. Contudo, na presença de proteínas no meio, a liberação do pdT₁₆ foi extremamente rápida demonstrando o efeito da presença de proteínas em fenômenos de competição na interface O/A (TEIXEIRA et al., 2001A).

Visando o controle da liberação de ON a partir de nanoemulsões catiônicas em meio de liberação contendo proteínas, um estudo de investigação dos fatores que exercem influência na liberação do pdT₁₆ foi realizado por TEIXEIRA e colaboradores (2001A). Em uma primeira etapa, diferentes núcleos oleosos foram testados com o objetivo de localizar o par iônico formado entre o pdT₁₆ e a EA na fase interna da nanoemulsões. Apesar dos estudos demonstrarem a possibilidade da partição do complexo formado em diferentes núcleos oleosos de elevados valores de EHL, esse parâmetro não contribuiu na redução de cinética de liberação do pdT₁₆ associado. A substituição do lipídeo EA pelo DOTAP (lipídeo monocatiônico com duas cadeias hidrocarbonadas) ou pelo RPR C₁₈ (lipídeo policatiônico contendo duas cadeias hidrocarbonadas) conduziu a uma redução da cinética de liberação do pdT₁₆ de maneira significativa. Esses resultados indicam a maior estabilidade do complexo formado entre os ON e os lipídeos catiônicos contendo duas cadeias hidrofóbicas na interface, provavelmente devido aos dois pontos de ancoragem apresentados por esses lipídeos. De maneira indireta, a menor velocidade de liberação do pdT₁₆ em meio biológico (em presença de proteínas) foi observada através da redução da cinética de degradação do pdT₁₆ para as formulações contendo os lipídeos DOTAP e RPRC₁₈.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Ácido nucléico

- Oligonucleotídeo modelo politimidilato de 16 nucleotídeos (Invitrogen, Brasil);

Matérias-primas

- Estearilamina (Sigma, EUA);
- DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano) (Sigma, EUA);
- Glicerina p.a (Merck, Alemanha);
- Lecitina de gema de ovo (fosfatidilcolina 84%; fosfatidiletanolamina 8%; Liso-fosfatidilcolina 2,2%; Liso-fosfatidiletanolamina 0,4%; Esfingomielina 2,2%) (LIPOID E-80[®]) (Lipoid AG, Alemanha);
- Oleilamina (>98% de aminas primárias) (Aldrich, EUA);
- Triglicerídeos de cadeia média (cáprico/caprílico) (Lipoid AG, Alemanha).

Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético TE-085 (Tecnal, Brasil);
- Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Suíça);
- Banho com sistema de refrigeração Frigomix[®] B equipado com aquecedor termostaticado Thermomix[®] BM (B. Braun Biotech International, Alemanha);
- Bomba de vácuo VAC[®] V-500 (Büchi, Labortechnik AG, Suíça);
- Centrífuga Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Alemanha);
- Espectrofotômetro de varredura, dotado de sistema multicélulas Hewlett-Packard 8452A, com programa computacional para avaliação e gerenciamento dos dados (software HP Chemstation);
- Evaporador rotatório R-114 (Büchi Labortechnik AG, Suíça);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Japão);
- Potenciômetro B474, (Micronal, Brasil);
- Viscosímetro capilar Durchlaufzeit 20-75s (Normschliff Glasgerate, Alemanha);
- Zetasizer HSA 3000 (Malvern, Inglaterra).

Solventes e reagentes

- Acetato de uranila p.a (Reagen, Brasil);
- Acetona p.a (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Ácido clorídrico p.a (Nuclear, Brasil);
- Cloreto de sódio p.a (Merck, Alemanha);
- Etanol p.a (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
- Fosfato de potássio Dibásico (Synth, Brasil);
- Hidróxido de sódio p.a (Merck, Alemanha).

Métodos

Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea, com base em estudos preliminares descritos por Teixeira e colaboradores (2002). Nesse procedimento, os constituintes da fase oleosa e da fase aquosa são solubilizados em um solvente orgânico e água, respectivamente. Após, a fase orgânica é vertida através de funil calibrado, sob agitação moderada e constante, na fase aquosa, seguido da retirada do solvente através de destilação sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

Em uma primeira etapa, foi avaliada a influência da quantidade e o tipo de solvente orgânico sobre o tamanho de gotícula das nanoemulsões isentas de lipídeo catiônico (tabela 3). Para tanto, foram testadas quantidades crescentes da mistura de etanol:acetona/água e etanol/água, nas proporções de 10:20; 20:40; 30:60 e 40:80 (solvente orgânico:água, m/m). Foram preparados três lotes de 10 mL de cada formulação. Utilizando a proporção 30:60 selecionada, três séries de nanoemulsões foram preparadas, contendo quantidades crescentes dos lipídeos catiônicos EA e OA nas concentrações de 0,0005; 0,005; 0,025; 0,05 e 0,5 (% m/m) e do lipídeo catiônico DOTAP nas concentrações 0,00132; 0,0132; 0,066; 0,132 e 1,32 (% m/m). A tabela 3 apresenta a composição e concentração dos diferentes constituintes das formulações. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Para fins de apresentação dos resultados, as concentrações dos lipídeos catiônicos EA, OA e DOTAP foram expressas em molaridade, correspondendo a 0,02; 0,20; 1,00; 2,00 e 20 mM.

Tabela 3. Composição final das nanoemulsões catiônicas (% m/m) contendo os lipídeos catiônicos estearilamina (EA), oleilamina (OA) e DOTAP (DT).

	Série EA	Série OA	Série DT
Lipoid E-80	2,00	2,00	2,00
TCM	8,00	8,00	8,00
Estearilamina	0,0005 - 0,50	-	-
Oleilamina	-	0,0005 - 0,50	-
DOTAP	-	-	0,00132 - 1,32
Glicerol	2,25	2,25	2,25
Água q.s.p	100,00	100,00	100,00

Caracterização das nanoemulsões

Determinação do pH

A determinação do pH das nanoemulsões foi realizada diretamente nas formulações através da utilização de um potenciômetro calibrado com pH 4 e 7 antes e após o ajuste das nanoemulsões para pH 7,4. Os resultados foram expressos como média de três determinações dos três diferentes lotes preparados.

Determinação do diâmetro de gotícula

As diferentes formulações foram caracterizadas em termos de diâmetro médio de gotícula através de espectroscopia a laser de autocorrelação pela difusão de um raio monocromático laser que atravessa a dispersão coloidal. Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 90° após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®). Os resultados foram expressos como média de três determinações de três lotes preparados.

Determinação da viscosidade

A viscosidade das amostras foi determinada através da técnica de viscosimetria capilar, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira 4ª. Edição, em viscosímetro de Ostwald. Para a determinação propriamente dita, foi transferido para o viscosímetro, um volume total de 5 mL de cada nanoemulsão. As análises foram realizadas à temperatura de 20°C, levando-se em conta o tempo de escoamento da amostra através do capilar e a viscosidade relativa foi determinada através da equação 1:

$$\eta = k.t.\rho \quad (\text{equação 1})$$

onde,

η = viscosidade absoluta (cP)

k = constante do viscosímetro

ρ = densidade do fluido a temperatura de 20°C (g/mL)

t = tempo de escoamento (s)

O valor da constante de Ostwald (k) foi determinado experimentalmente ($k = 0,0212$), medindo-se o tempo de escoamento de um líquido padrão, neste caso a água, e aplicando na fórmula acima o valor da viscosidade da água a temperatura de 20°C (1,0087 cP). Para todas as amostras, a densidade foi determinada experimentalmente, através do uso de picnômetro, sendo de 1 g/mL. Os resultados foram expressos como média de três determinações dos três lotes preparados.

Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55 mV (látex poliestireno carboxilato). Todas as análises foram realizadas após diluição em solução de NaCl 1 mM. Os resultados foram expressos como média de três determinações dos três lotes preparados de cada formulação.

Avaliação morfológica das nanoemulsões

Para avaliar a morfologia das gotículas de nanoemulsões, as diferentes formulações foram diluídas em água na proporção de 1:10 (nanoemulsão:água). Após diluição, as amostras foram adicionadas em suportes metálicos (200 mesh) de cobre com revestimento de carbono e Formvar, sendo o contraste negativo realizado com acetato de uranila a 2%. Em seguida, as amostras foram mantidas armazenadas por um período de 24 horas, e então submetidas à análise através de microscopia eletrônica de transmissão, operando a 80 Kv de voltagem e aumento de 100.000 vezes.

Avaliação da estabilidade das nanoemulsões

A estabilidade das nanoemulsões selecionadas, contendo a concentração de 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DOTAP, foi avaliada em termos de diâmetro de partícula, potencial zeta, viscosidade e pH em função do tempo de armazenamento, conforme as metodologias descritas na seção anterior. As nanoemulsões foram armazenadas em geladeira a 4°C durante 120 dias. Todas as formulações preparadas foram armazenadas em frascos selados de vidro de boro silicato do tipo I.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento do pdT₁₆

Os parâmetros de validação selecionados para o doseamento do pdT₁₆ seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 1996). Desta forma, foram avaliados os parâmetros de linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade e limites de detecção e quantificação.

Seleção do comprimento de onda de leitura

Partindo-se de uma solução contendo uma concentração conhecida do pdT₁₆ (100 µM), foi transferida uma alíquota de 50 µL desta solução para um microtubo tipo eppendorf e completou-se o volume com água destilada até 1 mL, obtendo-se uma solução final com concentração de 5 µM. A partir desta solução foi realizado um espectro de varredura de 200 a 400 nm.

Determinação da linearidade

Para determinar a faixa de linearidade para quantificar o pdT₁₆ foram realizadas três curvas de calibração a cada dia, por três dias consecutivos, cada uma delas contendo seis pontos nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 nmol/mL. O método proposto para a quantificação de ON pdT₁₆ foi desenvolvido utilizando água como solvente. Após tratamento estatístico dos valores de absorvância observados, foi determinado o coeficiente de determinação (R^2), além da determinação da equação da reta. A absorvância foi determinada em um comprimento de onda fixo de 266 nm.

Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária

A avaliação da repetibilidade foi realizada a partir das medidas de absorvância, realizadas em triplicata, a cada dia, para a concentração de 3 µM. Os resultados obtidos foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR) calculado a cada dia, por três dias consecutivos. Para a precisão intermediária foram utilizados como fator de avaliação os três diferentes dias de análise. Para isso, foram medidas as absorvâncias em triplicata para a concentração de 3 µM, conservando-se as mesmas condições experimentais e o mesmo analista a cada dia.

Avaliação da especificidade

Para determinar a especificidade do método analítico utilizado, foram comparados os espectros de absorção para duas soluções contendo ON modelo pdT₁₆ (3 µM), uma em água purificada e outra em água glicerinada a 2,25%.

Determinação do limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados matematicamente utilizando-se os valores de absorvância e os interceptos de três curvas de calibração, conforme preconizado pelo ICH (1996).

Associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões catiônicas

A fim de avaliar a taxa de associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões, utilizando membranas de ultrafiltração, em uma primeira etapa, a taxa de recuperação foi determinada em unidades de ultrafiltração constituídas de celulose regenerada (Ultrafree[®]) de 30 kDa (Millipore[®]). Após a otimização dos parâmetros de centrifugação (tempo e velocidade), soluções aquosas contendo concentrações crescentes do pdT₁₆ (5 a 50 nmol/mL) foram centrifugadas e a quantidade de pdT₁₆ encontrada no ultrafiltrado foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta em um comprimento de onda fixo de 266 nm. Por diferença entre a quantidade inicial e a quantidade detectada foi determinada a taxa de recuperação (%) do pdT₁₆ através da membrana. Os resultados foram expressos como média de três determinações.

Para os estudos de associação, soluções aquosas contendo o pdT₁₆ em concentrações crescentes foram preparadas. As nanoemulsões selecionadas foram então adicionadas às soluções aquosas de pdT₁₆ por mistura simples à temperatura ambiente. Após trinta minutos, as amostras foram colocadas nas unidades de ultrafiltração e então centrifugadas a uma velocidade de 5.000 rpm por 20 minutos. A quantidade de pdT₁₆ não associada recuperada no ultrafiltrado límpido obtido foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta em um comprimento de onda fixo de 266 nm, conforme a metodologia validada na seção anterior. Para todas as amostras foi realizado um espectro de absorção no ultravioleta na faixa de 200 a 400 nm, a fim de verificar a ausência de qualquer pico interferente.

Desta forma, soluções do pdT₁₆ (5, 12,5, 25, 35 e 50 nmol/mL) foram associadas com as nanoemulsões selecionadas EA, OA e DT (2 mM), bem como aquela obtida em ausência de lipídeo catiônico (controle). Em todos os casos, a concentração final do meio de associação foi de 2 mg/mL. Os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes e a quantidade associada por grama de nanoemulsão foi obtida através da equação 2.

$$Qa = \frac{(Ci - Cr) \times 5}{Cne} \quad (\text{equação 2})$$

onde,

Qa = Quantidade de ON associado (mg de ON / g de emulsão)

Ci = Concentração de ON inicial adicionada as nanoemulsões (mg/mL ou nmol/mL)

Cr = Concentração residual de ON recuperada no ultrafiltrado (mg/mL ou nmol/mL)

Cne = Concentração de nanoemulsão no meio de associação (mg/mL)

Propriedades físico-químicas após a associação do pdT₁₆

A fim de avaliar a influência do pdT₁₆ nas propriedades físico-químicas, as nanoemulsões selecionadas foram adicionadas de soluções aquosas de pdT₁₆ (0,125, 1,25, 12,5, 25, 35 e 50 nmol/mL) nas mesmas condições empregadas na determinação da quantidade de pdT₁₆ associado. O diâmetro de gotícula, potencial zeta, viscosidade e pH foram determinados conforme as metodologias descritas anteriormente.

Liberção do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões catiônicas

A taxa de liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões foi realizada com base no procedimento de ultrafiltração/centrifugação descrito na seção anterior. Após a realização da associação do pdT₁₆, em condições de totalidade de associação, as nanoemulsões foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4 à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e a quantidade de pdT₁₆ liberada foi determinada no ultrafiltrado por espectrofotometria na região do ultravioleta ($\lambda=266$ nm). Por diferença entre a quantidade inicial e a quantidade determinada no ultrafiltrado os resultados foram expressos em taxa de liberação (%).

Em uma primeira etapa, foi avaliada a liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões selecionadas contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2 mM, bem como da formulação obtida em ausência de lipídeo catiônico (controle). As quatro formulações foram preparadas com a concentração do pdT₁₆ de 12,5 µM e após diluídas (1:20) em tampão fosfato pH 7,4. Os resultados foram expressos como a média de três experimentos.

Em uma segunda etapa, foi realizada a avaliação da influência do tempo, fator de diluição e relação de cargas [+/-] sobre a liberação do pdT₁₆ (12,5 µM) a partir da nanoemulsão contendo o lipídeo catiônico DOTAP. Estudos de liberação do pdT₁₆ foram realizados após a diluição (1:20) da formulação em tampão fosfato durante 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Após, a mesma formulação foi submetida à diluição crescente (1:5, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:100) em tampão fosfato pH 7,4. Para a avaliação da influência da relação de cargas, foram preparados complexos de relações de carga [+/-] de 0,2, 2, 5, 10 e 20.

Análise Estatística

Para comparação dos resultados, foi realizada análise de variância com fator único, análise de variância em blocos casualizados, teste t, regressão linear e teste de comparação múltipla (Tukey). Para isso foram utilizados os programas computacionais Excel[®] versão 2003 (Microsoft, EUA) e Sigmastat[®] versão 2.03 (SPSS Inc., EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados em cinco etapas distintas: (i) Procedimento de emulsificação espontânea; (ii) Propriedades de nanoemulsões catiônicas; (iii) Determinação quantitativa da associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões catiônicas; (iv) Propriedades de nanoemulsões catiônicas após a associação do pdT₁₆; (v) Estudo preliminar de liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões.

Procedimento de Emulsificação Espontânea

Existem atualmente várias técnicas visando à preparação de nanoemulsões catiônicas, como pode ser observado na tabela 1, na revisão da literatura. O emprego de homogeneizadores de alta pressão (BENITA e LEVY, 1993; TADROS et al., 2004), de microfluidizadores (TEIXEIRA et al., 2003) e de ultra-som (PONGCHAROENKIAT et al., 2002; BARUT et al., 2005) tem sido descritos na literatura. Contudo, algumas limitações têm sido relacionadas com os métodos físicos de homogeneização, entre elas, a necessidade de preparação de uma emulsão primária a quente previamente à etapa de homogeneização e a disponibilidade de equipamentos para a produção de nanoemulsões em escala laboratorial (YU et al., 1993).

Nos últimos anos, alguns autores têm descrito a preparação de nanoemulsões através do procedimento de emulsificação espontânea (YU et al., 1993; PARK et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2002). Através dessa técnica é possível preparar nanoemulsões de propriedades físico-químicas similares às nanoemulsões obtidas por métodos físicos, com a vantagem de ser uma técnica mais simples, de menor custo, rápida, e que permite utilizar temperaturas inferiores àsquelas utilizadas pelas outras técnicas, apenas na etapa de retirada do solvente (~ 40°C). Além disso, recentemente, a possibilidade de funcionalização da interface das nanoemulsões, obtidas por emulsificação espontânea, através da nanoprecipitação de polímeros pré-formados de natureza catiônica, foi descrita por TRIMAILLE e colaboradores (2001).

Vários são os fatores que podem influenciar as características físico-químicas de nanoemulsões obtidas pela técnica de emulsificação espontânea, entre eles, a velocidade de migração do solvente orgânico na fase externa aquosa, a concentração de fase oleosa, tensão interfacial, viscosidade da fase interna, estrutura e concentração dos tensoativos utilizados e o volume de cada uma das fases (YU et al., 1993; MOSQUEIRA et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2002; BOUCHEMAL et al., 2004).

Neste estudo, em uma primeira etapa, visando a estabelecer as condições de emulsificação espontânea, foi analisado o efeito da adição de volumes crescentes de fase orgânica/aquosa (10/20 até 40/80 mL), bem como da natureza do solvente orgânico (mistura etanol e acetona ou etanol) utilizado sobre o diâmetro de gotícula de nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico (nanoemulsão controle). Os resultados estão apresentados na figura 6.

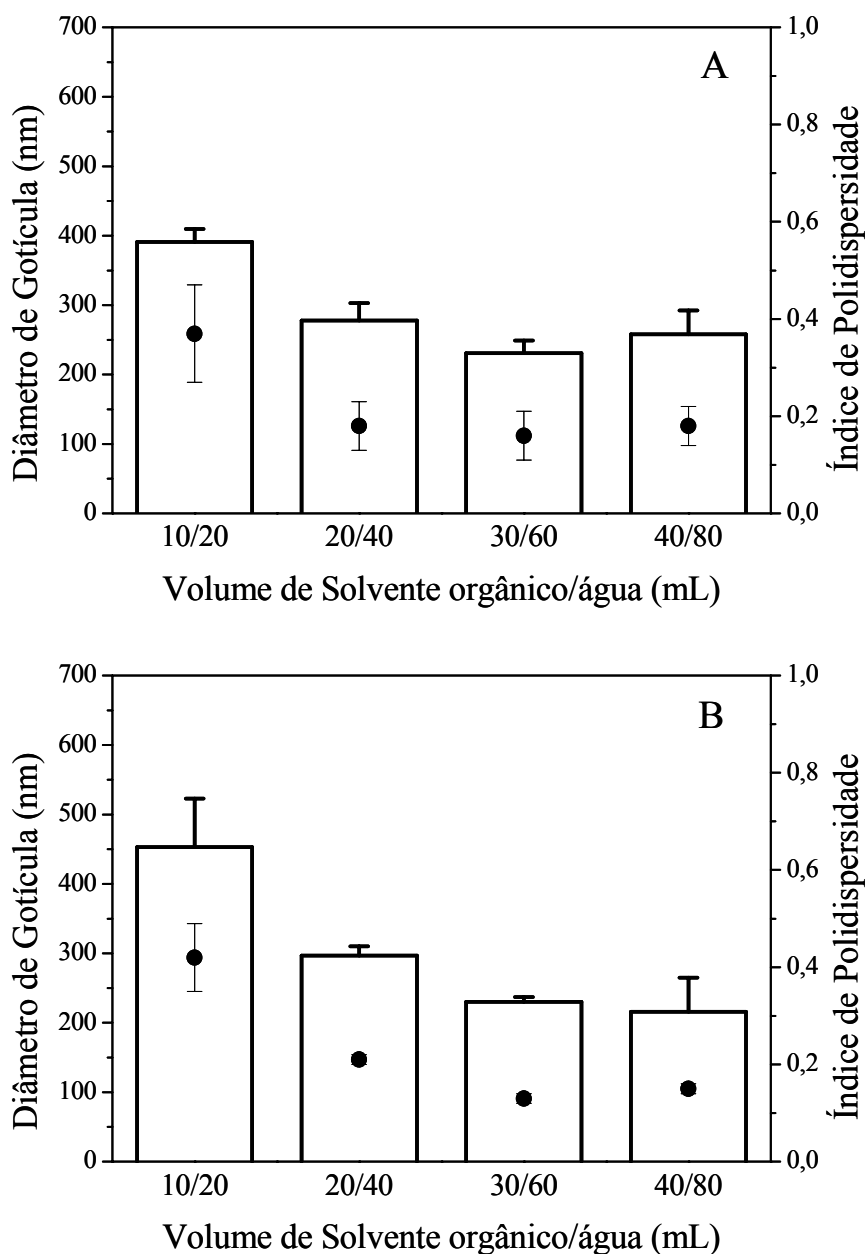


Figura 6. Diâmetro médio de gotícula (barras) e índice de polidispersidade (símbolos) das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico, utilizando a mistura de acetona e etanol 8:2 (A) ou etanol isoladamente (B) como solvente no procedimento de emulsificação espontânea.

A figura 6 revela que ocorre uma redução no diâmetro de gotícula até cerca de 250 nm com o aumento progressivo do volume de solventes, não existindo diferença significativa ($p < 0,05$) entre as maiores quantidades, 30/60 e 40/80, para ambos sistemas de solventes. Assim, foi selecionada a proporção 30/60 (mL) como condição mais apropriada para a preparação das formulações. Quantidades mais elevadas de solvente orgânico, como é o caso da proporção 40/80, podem aumentar a quantidade de resíduo de solvente orgânico nas formulações após o preparo (PARK et al., 1999). Contudo, a proporção de fases empregada (30/60) na preparação das nanoemulsões é superior àquelas utilizadas por outros autores (YU et al., 1993; CALVO et al., 1996) na obtenção de nanoestruturas de diâmetro equivalente, o que deve estar relacionado com uma maior concentração de fase oleosa das nanoemulsões desenvolvidas neste estudo (10%).

A tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas de nanoemulsões obtidas através da técnica de emulsificação espontânea utilizando a proporção de solvente orgânico/água de 30/60 (mL), para a mistura etanol/acetona e etanol isoladamente.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeos catiônicos com etanol ou a mistura etanol/acetona na proporção 30/60.

	Etanol/acetona (8:2)	Etanol
Diâmetro médio (nm)	231±18	230±7,0
Potencial zeta (mV)	-34,5±1,4	-31,9±2,1
pH	7,1±0,15	7,2±0,10
Viscosidade (cP)	1,47±0,05	1,53±0,02

De acordo com os resultados, fica evidenciado que não existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros diâmetro médio de gotícula, potencial zeta, pH e viscosidade entre as formulações, obtidas a partir dos diferentes sistemas solventes na proporção de 30/60, utilizado no procedimento de preparação das nanoemulsões. Como pode ser observado, para as formulações obtidas a partir de ambos solventes, o diâmetro médio de gotícula é da ordem de aproximadamente 230 nm, enquanto que a viscosidade das nanoemulsões obtidas é de 1,50 cP. Estes valores estão de acordo com os valores publicados por outros autores em termos de diâmetro de gotícula (YU et al., 1993; TRIMAILLE et al., 2001; CHAIX et al., 2003) e viscosidade de nanoemulsões (TAMILVANAN et al., 2001; SILVANDER et al., 2003).

O potencial zeta das nanoemulsões é influenciado pelo tipo e quantidade de tensoativo presente na superfície das gotículas, bem como pela extensão de ionização destas moléculas, que, como é descrito na literatura para as lecitinas, depende do pH das formulações (YANG e BENITA, 2000). Como pode ser observado na tabela 4, independente da natureza do solvente utilizado na obtenção das nanoemulsões, o potencial zeta é negativo, de cerca de -32mV. Esse valor negativo pode ser atribuído à presença de fosfolípídeos ácidos da lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]) carregados negativamente na interface das gotículas, como a fosfatidilserina, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina e fosfatidilinositol (LI e TIAN, 2002; YANG e BENITA, 2000; CHANSIRI et al., 1999), no pH final das formulações que é de aproximadamente 7,0.

Para a seleção do solvente orgânico mais adequado, fatores como capacidade de solubilização dos constituintes da fase orgânica, miscibilidade em água, segurança e toxicidade foram os critérios de escolha. Quanto à toxicidade dos solventes orgânicos, segundo a Farmacopéia Britânica (1999), esses podem ser classificados de acordo com a sua toxicidade em 3 categorias: (I) solventes que devem ser evitados; (II) solventes de utilização limitada; (III) solventes com baixo potencial tóxico. Desta forma, por razões de segurança, foram escolhidos neste estudo somente solventes com baixo potencial tóxico (classe III). Em relação à capacidade de solubilização dos constituintes da fase oleosa, o etanol demonstrou ser o solvente mais adequado, visto que os fosfolípídeos são moléculas facilmente solúveis em álcool e pouco solúveis ou insolúveis em acetona (MOSQUEIRA et al., 2000; SHCHIPUNOV, 2002; BOUCHEMAL et al., 2004).

Em relação à miscibilidade em água, tanto o etanol como a acetona são miscíveis em água, o que permite que, após a mistura da fase orgânica com a fase aquosa, ocorra imediata difusão do solvente em direção da água. Adicionalmente, o etanol apresenta uma maior segurança, visto que a inflamabilidade da acetona é maior, o que limita sua utilização em escala industrial (BOUCHEMAL et al., 2004). Apesar de não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre as propriedades físico-químicas das formulações com ambos os sistemas solventes (tabela 4), a escolha do solvente recai sobre o etanol, devido as suas vantagens em termos de segurança e principalmente solubilização dos constituintes da fase orgânica, como foi comentado anteriormente.

Propriedades de nanoemulsões catiônicas

Os resultados obtidos na primeira etapa do trabalho demonstraram a viabilidade de preparação de nanoemulsões lipídicas através do procedimento de emulsificação espontânea, apresentando-se monodispersas com diâmetro de gotícula próximo a 230 nm. Contudo, o potencial zeta dessas formulações apresenta valores negativos devido a presença de lipídeos carregados negativamente na lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80[®]), como comentado anteriormente. Considerando a elevada hidrofília e caráter polianiônico dos ácidos nucleicos, a sua associação com nanoemulsões requer a modificação da carga de superfície a fim de favorecer a interação com a nanoestrutura (TEIXEIRA et al., 1999, 2001; TRIMAILLE et al., 2001, 2003). Assim, a adição crescente dos lipídeos catiônicos estearilamina (EA), oleilamina (OA) e DOTAP (DT) foi realizada visando a avaliar, em uma primeira etapa, a influência desses compostos nas propriedades físico-químicas das nanoemulsões. A seleção desses lipídeos foi realizada com base na frequência de relatos do uso destes lipídeos na obtenção de nanoemulsões catiônicas. A figura 7 apresenta a estrutura química dos lipídeos catiônicos.

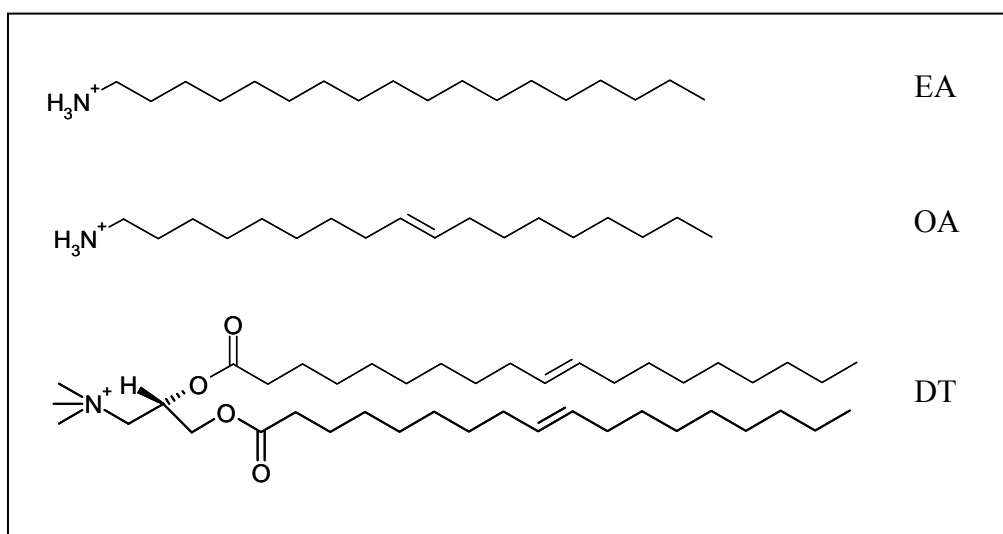


Figura 7. Estrutura química dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.

Nas condições experimentais previamente estabelecidas, nanoemulsões catiônicas contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT foram preparadas utilizando a proporção 30:60 (m/m) de etanol:água. Os resultados relativos à determinação do pH estão apresentados na figura 8.

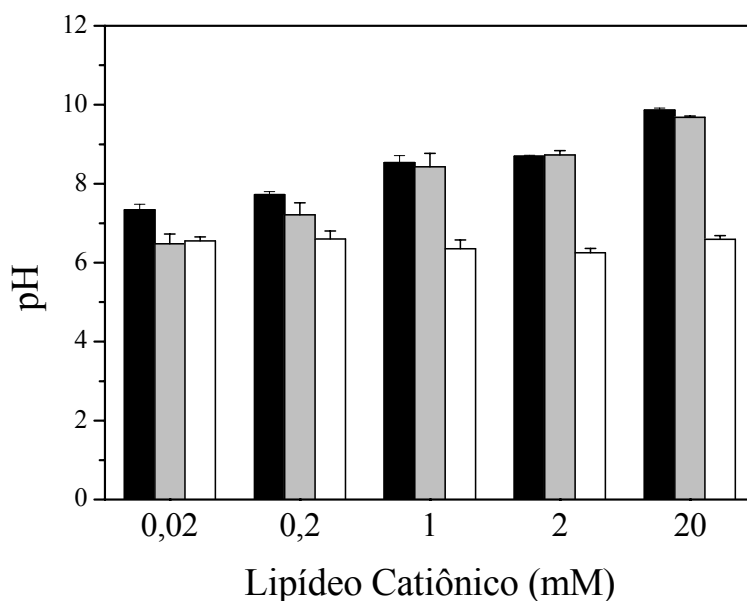


Figura 8. pH das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA (barras pretas), OA (barras cinzas) e DT (barras brancas).

Como pode ser observado na figura 8, a adição crescente dos lipídeos EA, OA e DT conduz a nanoemulsões catiônicas com diferentes valores de pH, influenciados tanto pela concentração (0,02 a 20mM) como pela estrutura química (figura 7) dos lipídeos empregados.

Para as nanoemulsões contendo os lipídeos catiônicos EA e OA, observa-se um aumento progressivo dos valores de pH das nanoemulsões, até cerca de 10, com a adição crescente destes lipídeos, caracterizando a influência do grupamento polar, amina primária, desses lipídeos catiônicos sobre essa propriedade físico-química (ELBAZ et al., 1996; RABINOVICH-GUILATT et al., 2004). Em contrapartida, observa-se um pH constante, compreendido entre 6 e 6,5, para as formulações contendo as diferentes concentrações do lipídeo DT. A presença de uma amina quaternária como grupamento polar deste lipídeo catiônico não exerce influência significativa ($p < 0,05$), como esperado, sobre o pH final das formulações. O pH de todas as formulações foi então ajustado a um valor próximo de 7,4 visando à comparação das propriedades físico-químicas das formulações.

A figura 9 apresenta o diâmetro de gotícula e o índice de polidispersidade das nanoemulsões obtidas na presença de concentrações crescentes dos diferentes lipídeos catiônicos EA, OA e DT.

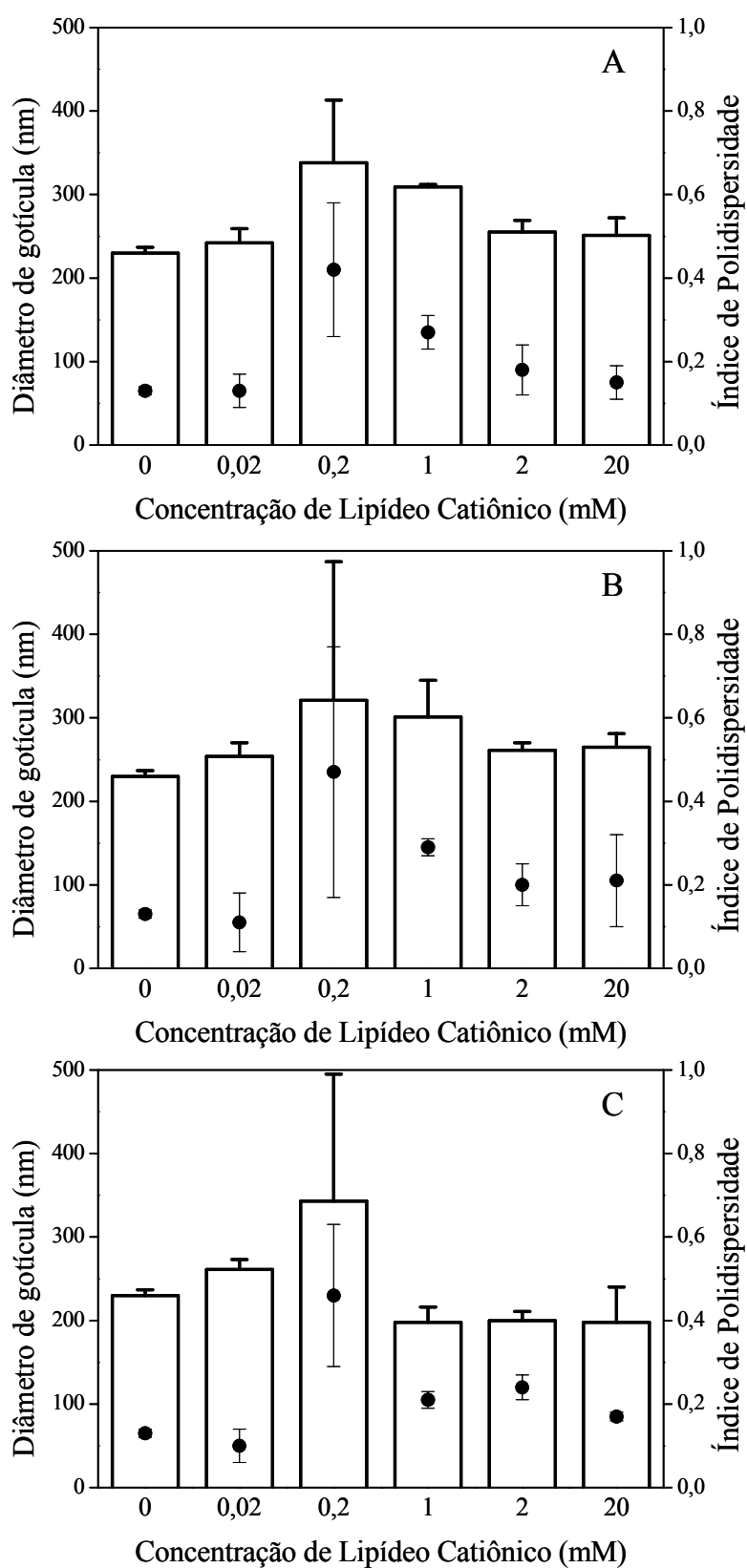


Figura 9. Diâmetro de gotícula (barras) e índice de polidispersidade (símbolos) das formulações contendo os lipídeos catiônicos EA (A), OA (B) e DT (C).

Como pode ser observado na figura 9, as diferentes formulações apresentaram diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade compreendido entre cerca de 200 e 350 nm e 0,2 e 0,45, respectivamente. A comparação desses resultados com aqueles detectados para a formulação controle, obtida em condições experimentais idênticas, na ausência de lipídeo catiônico, indica, de maneira global, que a adição dos lipídeos catiônicos influencia essa propriedade. Esses resultados podem estar relacionados com o efeito exercido pelos lipídeos catiônicos utilizados (natureza e/ou concentração) nos fenômenos envolvidos na formação das nanoestruturas, durante o procedimento de emulsificação espontânea, como por exemplo, a redução da tensão interfacial (PARK et al., 1999; BOUCHEMAL et al., 2004).

Independente da natureza do lipídeo catiônico utilizado observa-se uma influência da sua concentração no diâmetro de gotícula (figura 9). No caso específico da concentração 0,2 mM dos lipídeos EA, OA e DT, a figura 9 demonstra valores de diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade superiores a todas as outras concentrações testadas: 321 a 343 nm e 0,42 a 0,47. Esses resultados poderiam estar relacionados com a carga de superfície detectada para as formulações contendo a concentração de 0,2 mM dos lipídeos catiônicos. Nessa concentração, os estudos de potencial zeta, apresentados a seguir, revelam que as nanoemulsões contendo essa concentração de lipídeo catiônico apresentam um potencial zeta de cerca de -10mV, o que poderia influenciar os fenômenos envolvidos na formação das nanoestruturas durante o procedimento de preparação das nanoemulsões, bem como na estabilidade física das formulações.

Para as concentrações de 1, 2 e 20 mM observa-se um diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade inferior a 300 nm e 0,25, respectivamente, independente do lipídeo catiônico utilizado. Nessas mesmas concentrações, observa-se um menor diâmetro de gotícula ($p < 0,05$) para as formulações contendo o lipídeo catiônico DT, em comparação aquelas contendo EA ou OA. Esses resultados demonstram um efeito da estrutura química deste lipídeo no diâmetro de gotícula, que deve ser provavelmente influenciado pela porção hidrofóbica deste tensoativo (diacil), diferente dos outros lipídeos utilizados. A influência da estrutura química e da concentração de lipídeos catiônicos nas propriedades físico-químicas de nanoemulsões contendo DNA, como sobre o diâmetro de gotícula, tem sido descrita na literatura (CAMPBELL et al., 2001; KIM et al., 2002).

A figura 10 apresenta os resultados obtidos na avaliação do potencial zeta das nanoemulsões contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.

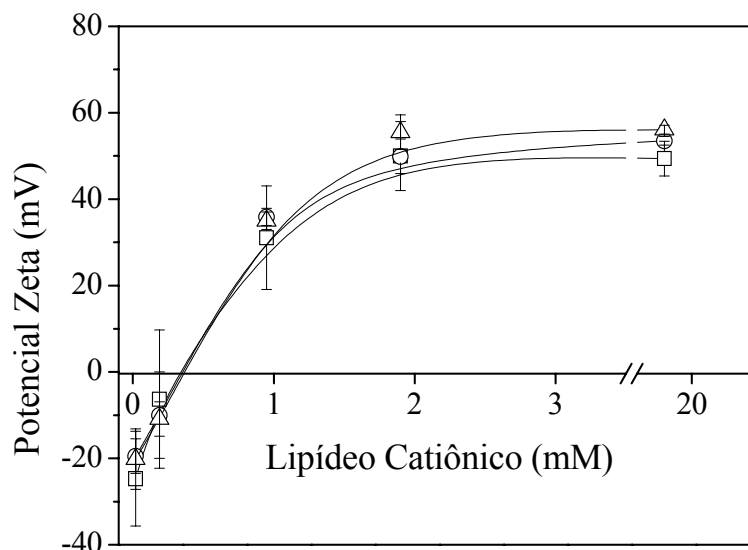


Figura 10. Potencial zeta das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA (□), OA (○) e DT (△).

A adição crescente dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT conduz a um aumento progressivo do potencial zeta até a concentração de 2 mM, indicando a localização dos lipídeos catiônicos na interface O/A das nanoemulsões. Para as formulações contendo as menores concentrações de lipídeo catiônico (0,02 e 0,2 mM), o potencial zeta permanece negativo (~ de -10 a -20 mV), demonstrando que a quantidade de lipídeo catiônico adicionada é inferior àquela dos lipídeos de carga negativa presentes na lecitina de gema de ovo, como demonstrado por outros autores (KLANG et al., 1994). A partir dessas concentrações, contudo, observa-se um aumento do potencial zeta até cerca de 40-50mV (até 2 mM), sem uma influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do tipo de lipídeo catiônico empregado e sem aumento suplementar significativo ($p < 0,05$) com a adição de uma quantidade 10 vezes superior (20 mM). A obtenção de valores de potencial zeta praticamente constantes em nanosistemas catiônicos, a partir de uma determinada concentração, com adição crescente de lipídeos catiônicos, também tem sido observado por outros autores (YANG e BENITA, 2000; YI et al., 2000). Essas observações têm sido atribuídas a diferentes fenômenos incluindo a possibilidade de saturação da interface e a redução da ionização devido ao elevado pH da interface neste tipo de sistema (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004).

A figura 11 apresenta os resultados obtidos nos estudos de avaliação da viscosidade das nanoemulsões contendo concentrações crescentes dos lipídeos EA, OA e DT, determinada por viscosimetria capilar.

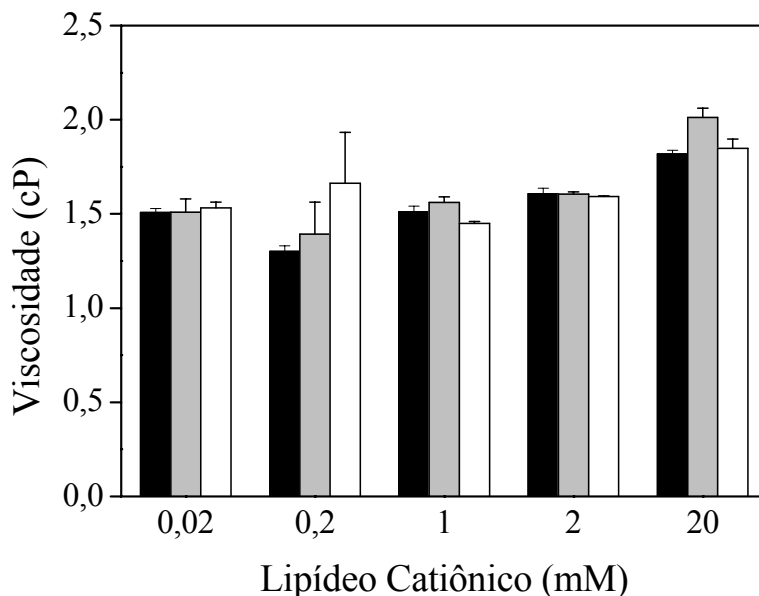


Figura 11. Viscosidade das formulações contendo concentrações crescentes dos lipídeos catiônicos EA (barras pretas), OA (barras cinzas) e DT (barras brancas).

Como pode ser observado na figura 11, não existe influência marcante da concentração e da natureza dos lipídeos catiônicos sobre a viscosidade dos sistemas. Silvander e colaboradores (2003) relataram que a viscosidade de sistemas submicrométricos, como as nanoemulsões, caracteriza-se geralmente, como um sistema de comportamento reológico do tipo newtoniano, sendo que a viscosidade é principalmente influenciada pela concentração de óleo da fase interna e pelo diâmetro de gotícula das formulações. Contrariamente ao esperado, nesse estudo, apesar do diâmetro de gotícula variar de cerca de 200 a 350 nm, não foram detectadas modificações expressivas na viscosidade. Observa-se, contudo, uma tendência significativa ($p < 0,05$) ao aumento da viscosidade, até cerca de 2,0 cP, para a concentração mais elevada dos lipídeos catiônicos (20mM). Alguns autores têm relacionado um aumento na viscosidade de sistemas submicrométricos lipídicos com a presença de elevadas concentrações de tensoativos nas formulações (TAKAMURA et al., 1983; ISHII et al., 1990; JUMAA e MULLER, 1998).

Os resultados obtidos na avaliação das diferentes características físico-químicas das nanoemulsões, sobretudo no que se refere aos resultados de potencial zeta (figura 10),

conduziram este estudo à escolha da formulação contendo a concentração de 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT, para os estudos subseqüentes. De fato, nas condições experimentais utilizadas neste estudo, observou-se o máximo de potencial zeta (40-50 mV) nesta concentração, com diâmetro de partícula e índice de polidispersidade adequados. Além de razões relacionadas com a toxicidade intrínseca dos lipídeos catiônicos (BRAZEAU et al., 1998), considerando-se que a associação dos ON ocorre principalmente através de interações eletrostáticas estabelecidas entre os lipídeos catiônicos e os ON na interface das nanoemulsões (TEIXEIRA et al., 2001A), a concentração selecionada de maior valor de potencial zeta apresenta teoricamente um número de sítios de interação máximo para associação dos ON.

Assim, nos experimentos subseqüentes, apenas as nanoemulsões contendo a concentração de 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT foram utilizadas. Um estudo de avaliação de diâmetro, distribuição e morfologia das gotículas da fase interna das nanoemulsões foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Segundo Haskell (1998), é recomendado que se utilize mais de uma metodologia a fim de verificar o tamanho e distribuição de partículas coloidais. A espectroscopia a laser de autocorrelação de fótons, utilizada neste estudo, além de não fornecer informações sobre a morfologia das gotículas, torna-se uma medida limitada quando são analisadas populações de gotículas polidispersas. Além disso, dependendo do equipamento utilizado, gotículas com diâmetro inferior a 100 nm não são detectadas por este método. Desta forma, várias técnicas de MET têm sido empregadas, como demonstram alguns estudos relativos à caracterização de nanoemulsões lipídicas aniônicas e catiônicas (BENITA e LEVY, 1993; TAMILVANAN et al., 2001; LEE et al., 2005; WESTESEN e WEHLER, 1993).

A figura 12 apresenta as fotomicrografias obtidas por MET das nanoemulsões contendo a concentração de 2 mM de lipídeo catiônico. De maneira global, as fotomicrografias revelam estruturas esféricas de diâmetro na faixa de 200 - 300 nm, com interface definida e sem influência de tipo do lipídeo catiônico empregado ou ausência deste (formulação controle), indicando uma influência preponderante do procedimento de emulsificação espontânea nas propriedades das nanoemulsões. Os resultados confirmam aqueles obtidos pela técnica de espectroscopia a laser de autocorrelação, como demonstrado anteriormente na figura 9.

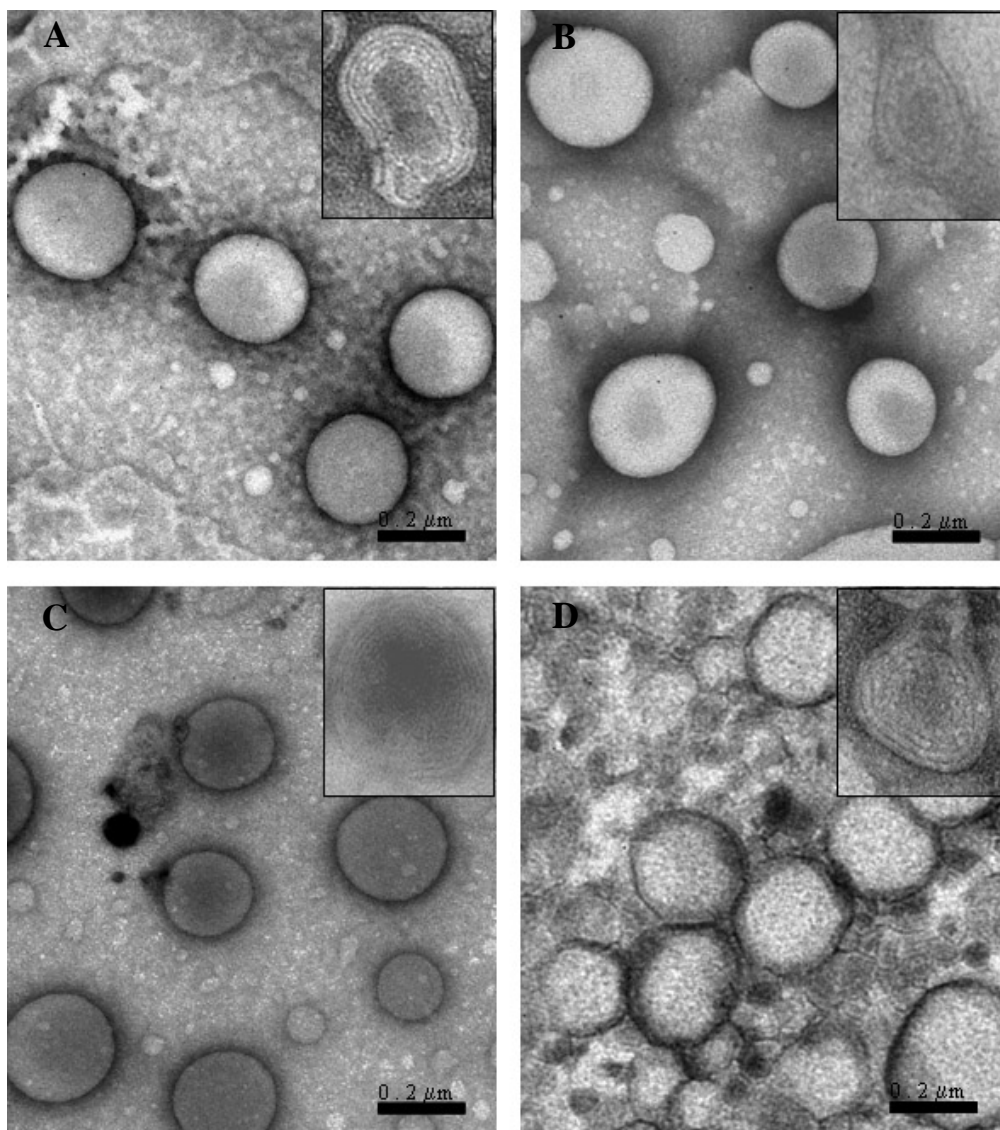


Figura 12. Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões na ausência de lipídeo catiônico (A) e presença dos lipídeos catiônicos EA (B); OA (C) e DT (D) na concentração de 2mM. Aumento de 100.000x. Em destaque a presença de lipossomas nas nanoemulsões.

Além das estruturas características de nanoemulsões, podem-se observar estruturas com uma interface de maior espessura, em especial, na formulação contendo o lipídeo DT, sugerindo a presença de multicamadas dos tensoativos ou ainda bicamadas lipídicas (lipossomas), na interface das nanoestruturas. A existência dessas estruturas diferenciadas foi atribuída à presença de fosfolipídeos em excesso nas formulações, conforme relatado na literatura por vários autores (MOSQUEIRA et al., 2000; TEIXEIRA et al., 1999; 2000; TAMILVANAN, 2004; RAFFOURNIER et al., 2005).

Em uma segunda etapa, uma pesquisa mais detalhada evidenciou claramente a coexistência de estruturas em multicamadas, apresentadas em destaque nas fotomicrografias (figura 12). Apesar de terem sido detectadas apenas algumas estruturas, esse resultado reforça o efeito do excesso de lipídeos nas nanoestruturas formadas, e em especial dos fosfolipídeos, uma vez que tais estruturas foram detectadas inclusive nas nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico (controle). Relatos da formação de estruturas diferenciadas em nanoemulsões contendo diferentes lipídeos catiônicos, entre eles, EA (TEIXEIRA et al., 2000), OA (RAFFOURNIER et al., 2005) e DC-Chol (CHOI et al., 2004), na forma de lipossomas ou de nanoestruturas bicompartimentais, têm sido feitos na literatura. Além da concentração final nas formulações, fatores como o EHL e o grau de insaturação dos fosfolipídeos têm sido relacionados com a formação dessas estruturas (RAFFOURNIER et al., 2005).

Adicionalmente, foram realizados os estudos de estabilidade após 120 dias de armazenamento à temperatura de 4 °C para as formulações contendo a concentração de 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT. Os resultados relativos às propriedades físico-químicas das nanoemulsões estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2 mM logo após o preparo (T₀) e após 120 dias (T₁₂₀) de armazenamento à temperatura de 4 °C.

	EA		OA		DT	
	T ₀	T ₁₂₀	T ₀	T ₁₂₀	T ₀	T ₁₂₀
Diâmetro médio (nm)	255 ± 14	240 ± 24	261 ± 9	247 ± 8	200 ± 11	178 ± 4
Potencial zeta (mV)	50 ± 7,9	42 ± 3,3	49 ± 3,9	34 ± 0,9	55 ± 3,5	45 ± 3,5
pH ^a	8,7 ± 0,02	6,8 ± 0,4	8,7 ± 0,11	6,1 ± 0,01	6,2 ± 0,11	6,4 ± 0,42
Viscosidade (cP)	1,6 ± 0,03	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,01	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,01	1,6 ± 0,02

(^a) O pH das nanoemulsões foi ajustado a cerca de 7,4 antes do armazenamento a 4 °C.

Nanoemulsões podem ser desestabilizadas por diferentes mecanismos como: (1) cremagem ou sedimentação, causado por força gravitacional; (2) floculação, devido a forças de atração do tipo Van der Waals, onde não há repulsão suficiente entre as gotículas e (3) coalescência, levando a separação de fases. Como resultado de sua instabilidade termodinâmica, as

emulsões tendem a sofrer uma redução na sua energia livre total através do aumento do diâmetro de gotícula, com redução de sua área interfacial total (TADROS, 2004). Como pode ser observado na tabela 5, não foram observadas alterações do diâmetro de gotícula (<250 nm) após 4 meses de armazenamento em geladeira, indicando a eficiência do filme interfacial na estabilidade da estrutura coloidal. A viscosidade das formulações também permaneceu inalterada (~1,5 cP) como uma provável consequência da manutenção do diâmetro de gotícula.

Contudo, a tabela 5 demonstra claramente alterações significativas no pH e potencial zeta das formulações. Uma redução de cerca de 1 unidade de pH foi observada para as formulações após 120 dias de armazenamento a 4° C. A formação de ácidos graxos livres tem sido relacionada com a redução do pH de nanoemulsões lipídicas como consequência de fenômenos de oxidação e hidrólise dos fosfolípidos. A principal via de degradação é a hidrólise da diacilfosfatidilcolina e diacilfosfatidiletanolamina (ambas presentes no Lipoid E-80) gerando os derivados correspondentes monoacilados e ácidos graxos livres (figura 5). Ácidos graxos livres podem também se formar pela hidrólise de triglicerídeos de cadeia média, formadores do núcleo oleoso, em seus mono e diglicerídeos correspondentes (BENITA e LEVY, 1993; TAMILVANAN et al., 2001). Recentemente, Rabinovich-Guilatt e colaboradores (2005) quantificaram por CLAE, os ácidos graxos livres envolvidos na hidrólise de nanoemulsões estabilizadas por fosfolípidos após submeter às amostras à autoclavagem e condições térmicas aceleradas (50 °C). De acordo com os autores, os produtos de hidrólise da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina representaram um total de 45% da quantidade total de fosfolípidos após 3 meses.

Uma redução do potencial zeta de cerca de 10 unidades também foi observada para todas as formulações armazenadas durante 120 dias a 4 °C. Essa alteração pode estar relacionada com uma possível neutralização parcial da carga de superfície pelos ácidos graxos geradas pela degradação dos lipídeos componentes das nanoemulsões. Contudo, essa redução no potencial zeta não conduziu a desestabilização da nanoestrutura, indicando a manutenção da sua estabilidade através da repulsão eletrostática aportada pelos lipídeos catiônicos. De fato, a ionização dos lipídeos catiônicos não deve ser fortemente influenciada pelo pH final das formulações, uma vez que lipídeos como a EA e OA apresentam um pK superior a 10 (RABINOVICH-GUILATT et al., 2004) e o lipídeo DT é uma amina quaternária.

Determinação quantitativa da associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões catiônicas

Nesta etapa do trabalho, os parâmetros de validação selecionados para o doseamento do pdT₁₆ seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 1996). Desta forma, foram avaliados os parâmetros de linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade e limites de detecção e quantificação.

A confiança de um método analítico é assegurada através da validação, o qual permite comprovar que o método utilizado é adequado para o fim pelo qual foi desenvolvido. Baseado nas características de um processo de validação e nos seus respectivos requisitos, cada procedimento analítico deve ser validado conforme seus parâmetros mais relevantes. Assim, é de responsabilidade do analista identificar quais são estes parâmetros e desenvolver os estudos de validação (ERMER, 2001). Segundo as diretrizes da USP e do ICH, os testes quantitativos que devem compor um processo de validação incluem a linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade e limites de detecção e quantificação (THE UNITED, 1998; ICH, 1996).

As medidas de absorção na região do UV são simples e sensíveis, por isso podem ser utilizadas na análise de grande variedade de substâncias. A elevada quantidade de substâncias, cujas estruturas apresentam grupamentos cromóforos (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000), como é o caso dos oligonucleotídeos, o relativo baixo custo dos equipamentos, assim como a fácil automatização da análise, facilitam a utilização deste tipo de método. A identificação de uma molécula através da espectrofotometria na região do ultravioleta se dá através das características de absorção de energia em um comprimento de onda especificado. O oligonucleotídeo politimidilato (pdT₁₆) utilizado neste estudo apresenta na sua estrutura 16 nucleotídeos, cada um deles apresentando uma base nitrogenada pirimídica capaz de absorver energia na região do ultravioleta. Estas moléculas apresentam uma absorção máxima em um comprimento de onda de aproximadamente 266 nm, o que é confirmado pela literatura (UNGARO et al, 2003; FATTAL et al, 2004). Assim, todos os ensaios de quantificação do pdT₁₆ foram realizados neste comprimento de onda. A estrutura química e o espectro de absorção do pdT₁₆ estão representados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

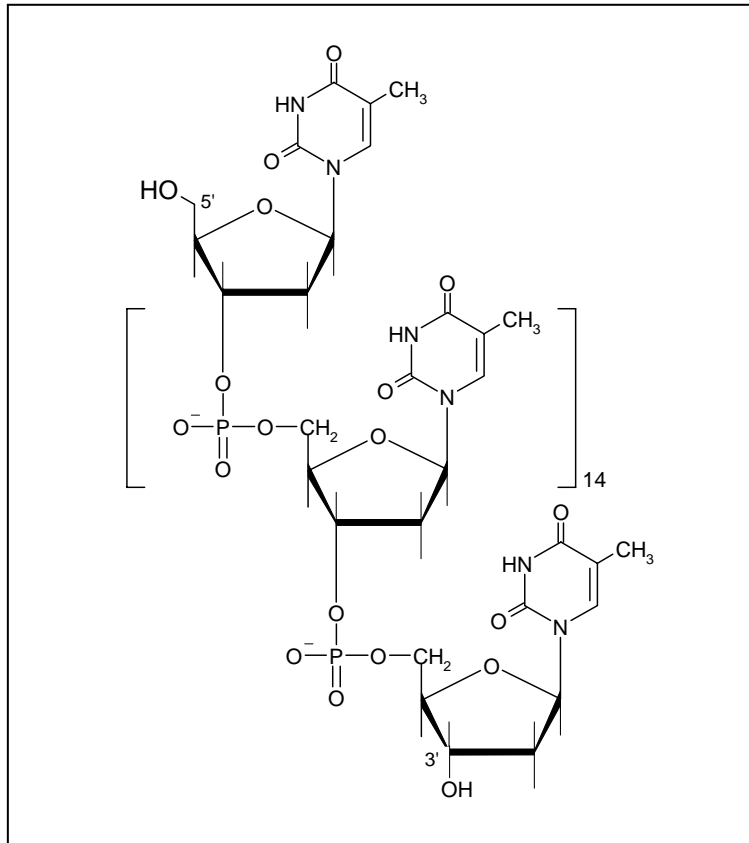


Figura 13. Estrutura química do oligonucleotídeo modelo pdT₁₆.

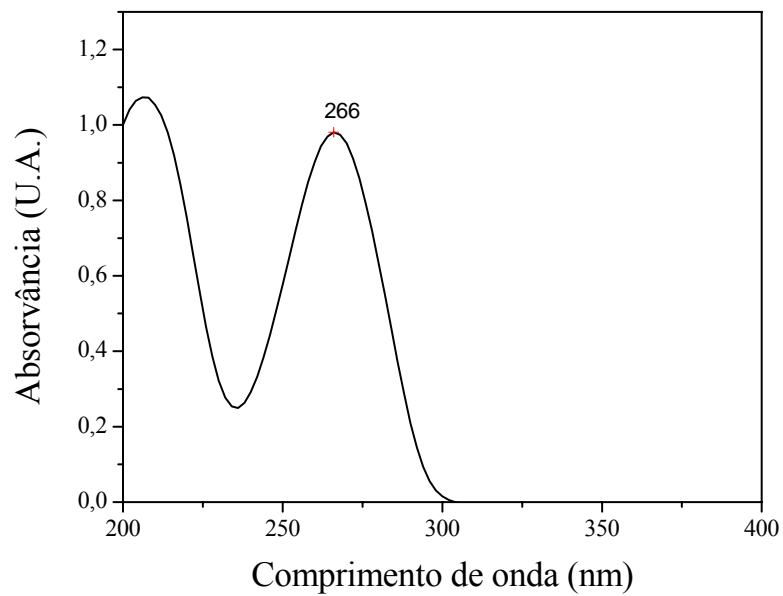


Figura 14. Espectro de absorção do oligonucleotídeo modelo pdT₁₆.

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. Representa a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esta verificação é realizada através da elaboração de uma curva de calibração e da análise estatística da linearidade, através da análise de regressão linear (BRASIL, 2003).

A Figura 15 apresenta o gráfico da curva padrão através de espectrofotometria na região do ultravioleta com λ de 266 nm. A equação da reta obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = 0,1897x + 0,0233$) e o coeficiente de determinação para a curva padrão ($R^2 = 0,9974$), demonstram a elevada relação existente entre a concentração de ON pdT₁₆ e a absorvância observada. Os resultados obtidos demonstraram que a avaliação da linearidade é estatisticamente válida, pois apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), com valores de $F_{\text{calculado}}$ igual a 1801,48 e $F_{\text{crítico}}$ igual a $1,84 \cdot 10^{-6}$.

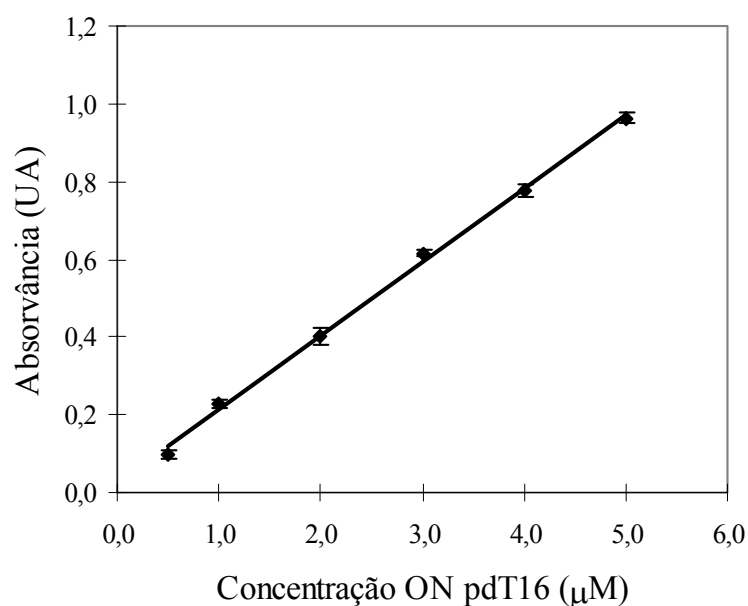


Figura 15. Representação gráfica da curva padrão através de espectrofotometria na região do ultravioleta com λ de 266 nm.

O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) calculados através da curva de calibração obtida indicam que o método apresenta sensibilidade com valores de LD = 0,1525 e LQ = 0,4621 nmol/mL.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade, precisão intermediária ou repetibilidade de um método analítico sob condições normais de operação. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias, por diferentes analistas e em diferentes equipamentos. A precisão intermediária expressa o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas e equipamentos. A repetibilidade, por sua vez, é medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições em um curto intervalo de tempo (ICH, 1996).

A Farmacopéia Americana (THE UNITED, 2004) estabelece a repetibilidade como o principal parâmetro a ser tomado em consideração para a análise de dados para a validação de métodos analíticos. A reprodutibilidade (precisão intermediária) é avaliada quando se deseja uma análise mais detalhada dos dados. A precisão ou repetibilidade do método foi avaliada em três diferentes dias e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da avaliação da repetibilidade para doseamento de soluções aquosas de pdT₁₆ na concentração de 3nmol/mL.

Dia	Absorvância (U.A)	pdT ₁₆ (µM)	Teor (%)	DPR (%)
DIA 1	0,614520	3,020942	100,70	1,95
	0,636220	3,127618	104,25	
	0,615980	3,028119	100,94	
DIA 2	0,626480	3,079737	102,66	2,05
	0,602290	2,960820	98,69	
	0,620640	3,051027	101,70	
DIA 3	0,612000	3,008554	100,29	0,66
	0,612370	3,010373	100,35	
	0,605180	2,975027	99,17	

Considerando-se que nos três dias de experimento foram obtidos valores de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) inferiores a 2,5%, e que o DPR entre os dias (precisão intermediária) também foi inferior a 1,70%, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida apresenta repetibilidade e precisão intermediária dentro dos limites especificados nos códigos oficiais (ICH, 1996; THE UNITED, 1998).

A especificidade indica a capacidade do método de avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e adjuvantes. A especificidade do método pode ser comprovada, por exemplo, mediante a comparação dos espectros de absorção do analito na presença e ausência da mistura de adjuvantes que podem interferir na análise, bem como através de espectros de absorção obtidos com a mistura de adjuvantes empregados (ICH, 1996). Nesse estudo, a especificidade foi realizada através da comparação dos espectros de absorção do pdT₁₆ em uma solução aquosa na ausência e presença de glicerol (figura 16). De fato, o glicerol (2,25%), adicionado na fase externa das nanoemulsões, é o agente isotonzante das formulações e a quantificação do pdT₁₆ foi realizada na presença desse adjuvante, como descrito no material e métodos.

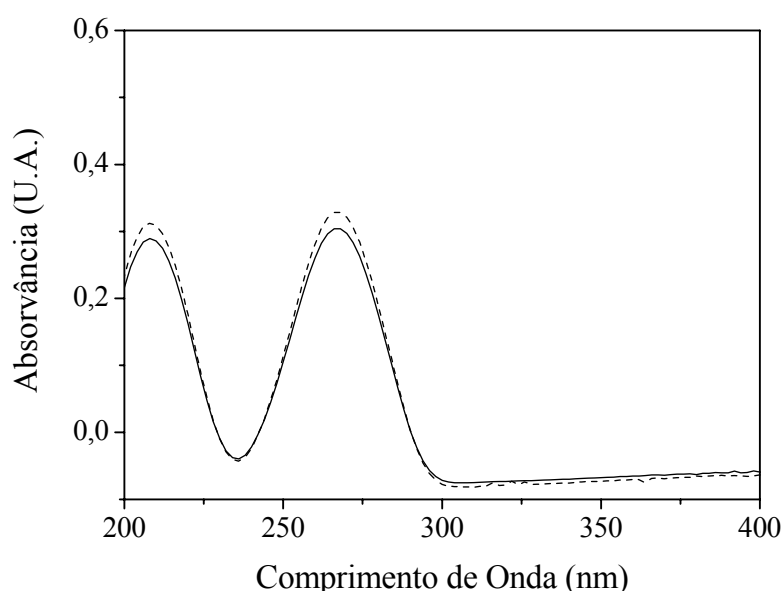


Figura 16. Espectro de absorção do pdT₁₆ em água (linha) e em solução de glicerina a 2,25% (linha tracejada).

A figura 16 indica a sobreposição dos espectros de absorção do pdT₁₆ tanto em água pura como em uma solução aquosa contendo glicerol (2,25%), indicando que esse adjuvante não interfere no espectro de absorção do pdT₁₆, podendo este ser quantificado em presença do adjuvante. Não foram realizados estudos de especificidade na presença dos componentes da fase interna das nanoemulsões, uma vez que todas as determinações do pdT₁₆ foram realizadas na fase aquosa externa das nanoemulsões, após separação de uma fração desta através de membranas de ultrafiltração (UF). A capacidade das membranas de UF em separar as fases de nanoemulsões catiônicas foi descrita anteriormente por Teixeira e colaboradores (2001), através do uso de um marcador do núcleo oleoso, o ³H-oleato de colesterila.

A determinação quantitativa da taxa de associação de ácidos nucleicos com nanoemulsões catiônicas tem sido realizada de maneira indireta. De fato, a concentração de ácido nucleico é determinada na fase aquosa externa das nanoemulsões, após a sua separação por centrifugação (OTT et al., 2002) ou ultrafiltração/centrifugação (TEIXEIRA et al., 2001A; TRIMAILLE et al., 2003). A associação dos ácidos nucleicos é então estimada pela diferença entre a quantidade adicionada e aquela determinada quantitativamente na fase aquosa externa. O uso de membranas de UF/centrifugação tem sido correntemente descrito na literatura, uma vez que permite a obtenção de um ultrafiltrado límpido, sem a presença de interferentes, para a quantificação dos ácidos nucleicos (TEIXEIRA et al., 2001A).

A determinação da recuperação dos ácidos nucleicos através das membranas representa uma etapa prévia fundamental a fim de avaliar se a membrana não representa um fator limitante à passagem do oligonucleotídeo solúvel na fase aquosa externa. Com o objetivo de avaliar a associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões selecionadas, a taxa de recuperação do pdT₁₆ em solução aquosa, através de unidades de UF (membranas de 30 kDa), foi realizada. Os resultados obtidos para as taxas de recuperação do pdT₁₆ em solução aquosa estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Taxa de recuperação de concentrações crescentes do pdT₁₆ em solução aquosa no ultrafiltrado após ultrafiltração/centrifugação.

pdT ₁₆ (μM)	Quantidade recuperada (μM)	Taxa de recuperação (%)
1,25	1,23 ± 0,01	98,00 ± 0,57
5	4,94 ± 0,01	98,72 ± 0,29
12,5	12,42 ± 0,18	99,33 ± 1,44
25	24,76 ± 0,25	99,03 ± 1,01
35	34,78 ± 0,57	99,36 ± 1,65
50	49,72 ± 0,27	99,43 ± 0,58

A tabela 7 demonstra que para todas as concentrações de pdT₁₆ testadas, a taxa de recuperação é superior a 98%, o que comprova que a membrana de UF selecionada não representa um fator limitante para a passagem do pdT₁₆. Assim, essas membranas podem ser utilizadas para a separação da fase externa das nanoemulsões visando à determinação do pdT₁₆ associado. A figura 17 apresenta os resultados obtidos para os estudos de associação do pdT₁₆ às diferentes nanoemulsões selecionadas para essa etapa do trabalho.

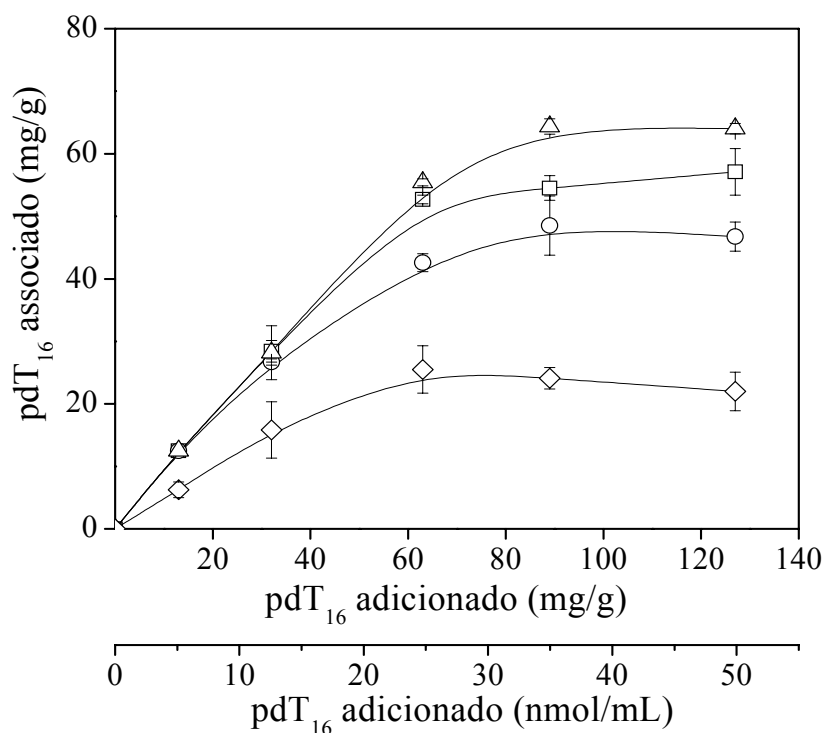


Figura 17. Quantidade de ON pdT₁₆ adsorvido (mg/g) em função da concentração do pdT₁₆ adicionado (mg/g ou nmol/mL) com as nanoemulsões obtidas em ausência de lipídeo catiônico (◇) ou com 2 mM de EA (□), OA (○) ou DT (△).

A figura 17 demonstra duas séries de curvas. A primeira de reduzida taxa de associação, refere-se à quantidade de pdT₁₆ associado com a nanoemulsão obtida em ausência de lipídeo catiônico (controle), para a qual uma associação máxima de 20 mg de pdT₁₆ por grama de fase interna foi observada. De fato, essa reduzida taxa de associação pode ser relacionada com as propriedades de superfície dessas formulações. Como apresentado na tabela 4 (pagina 55), o potencial zeta negativo das nanoemulsões, obtidas em ausência de lipídeo catiônico, limita o acesso dos ON a interface devido a fenômenos de repulsão eletrostática. Através de estudos de transferência de energia de fluorescência, TEIXEIRA e colaboradores (2001B) relataram resultados similares em relação à associação de ON com nanoemulsões lipídicas. Contudo, em comparação a associação de ON com nanoemulsões contendo lipídeos catiônicos, a associação dos ON ocorre através de interações fracas distante do filme interfacial.

As propriedades da interface de nanoemulsões podem ser modificadas de acordo com a natureza e concentração dos agentes tensoativos utilizados. A existência de uma interface carregada positivamente, como atestado pelos valores de potencial zeta (figura 10), atribuída à

presença dos lipídeos catiônicos EA, OA ou DT, conduz a um aumento significativo da associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões. Independente do lipídeo catiônico empregado, a figura 17 demonstra que a curva de associação é dividida em 2 etapas de adsorção. Na primeira etapa, ocorre um aumento progressivo da quantidade de ON associado até um máximo característico para cada lipídeo catiônico (até ~ 70 mg/g para a formulação DT). Nessa etapa, a associação é independente da quantidade de ON adicionado, devido à elevada afinidade das cargas positivas das gotículas pelos grupamentos fosfato carregados negativamente dos ON. Esses resultados indicam que a presença do lipídeo catiônico na interface das nanoemulsões aumenta substancialmente a capacidade de adsorção do pdT₁₆, através de interações eletrostáticas (TEIXEIRA et al., 2001). Após, quantidades suplementares de pdT₁₆ não alteram a quantidade de pdT₁₆ associado. Um fenômeno similar foi observado por outros autores (TRIMAILLE et al., 2003) e pode estar relacionado com a saturação dos sítios de interação carregados positivamente dos lipídeos catiônicos para a associação dos ON com as nanoemulsões.

Muito embora o potencial zeta (figura 10) das formulações contendo EA, OA e DT (2 mM) não apresente diferenças significativas antes da associação com ON, um comportamento diferenciado foi observado para cada lipídeo catiônico, em termos de taxa de associação, indicando que, além da carga de superfície, outros fatores podem modular a quantidade de ON associado com as nanoemulsões. No caso específico da formulação contendo o lipídeo catiônico DT, observa-se uma taxa de associação significativamente superior em relação às formulações contendo os lipídeos catiônicos EA e OA (até ~ 70 mg/g). Visando avaliar a influência da área disponível para associação do pdT₁₆, o cálculo da superfície total disponível foi realizado, conforme descrito por Ansel e colaboradores (2000) (tabela 8).

Tabela 8. Superfície total (S_T) apresentada pelas nanoemulsões obtidas na presença dos lipídeos EA, OA e DT na concentração de 2 mM e na ausência de lipídeo catiônico (controle).

Formulação	Diâmetro (nm)	V (mL)	N	S _g (nm ²)	S _T (nm ²)
EA	255	$8,68 \times 10^{-15}$	$9,22 \times 10^{13}$	$2,04 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{12}$
OA	261	$9,30 \times 10^{-15}$	$8,60 \times 10^{13}$	$2,14 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{12}$
DT	200	$4,19 \times 10^{-15}$	$1,91 \times 10^{14}$	$1,26 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{12}$
Controle	225	$5,96 \times 10^{-15}$	$1,34 \times 10^{14}$	$1,59 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{12}$

Nota: V = volume de cada glóbulo; N = número de gotículas; S_g = Superfície de cada gotícula; S_T = Superfície de todos os glóbulos em 10 mL de nanoemulsão.

De acordo com a tabela 8, as nanoemulsões preparadas com o lipídeo catiônico DT apresentam uma superfície total para a associação do pdT₁₆ cerca de 25 a 30% superior aquelas contendo os lipídeos catiônicos EA e OA. Além disso, foi evidenciada a existência de interações hidrofóbicas suplementares entre o ON pdT₁₆ e monocamadas constituídas da mistura binária fosfolipídeo/DOTAP em comparação com aquelas constituídas de fosfolipídeo /EA (TEIXEIRA et al., 2001). Nesse estudo, ambos os fatores, uma maior superfície disponível e interações hidrofóbicas suplementares entre o pdT₁₆ e a interface das nanoemulsões constituídas de fosfolipídeos e DT, devem ter contribuído para uma maior taxa de associação observada para a formulação contendo esse lipídeo catiônico.

Influência do pdT₁₆ nas propriedades de nanoemulsões

Após a demonstração da associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões, em continuidade, nessa etapa do trabalho, foi investigada a influência do ON sobre as propriedades físico-químicas (i.e. pH, viscosidade, diâmetro de gotícula e potencial zeta) e morfologia das nanoemulsões. O diâmetro de gotícula das nanoemulsões catiônicas EA, OA e DT contendo concentrações crescentes de pdT₁₆, determinado por espectroscopia a laser de autocorrelação de fótons, está apresentado na figura 18.

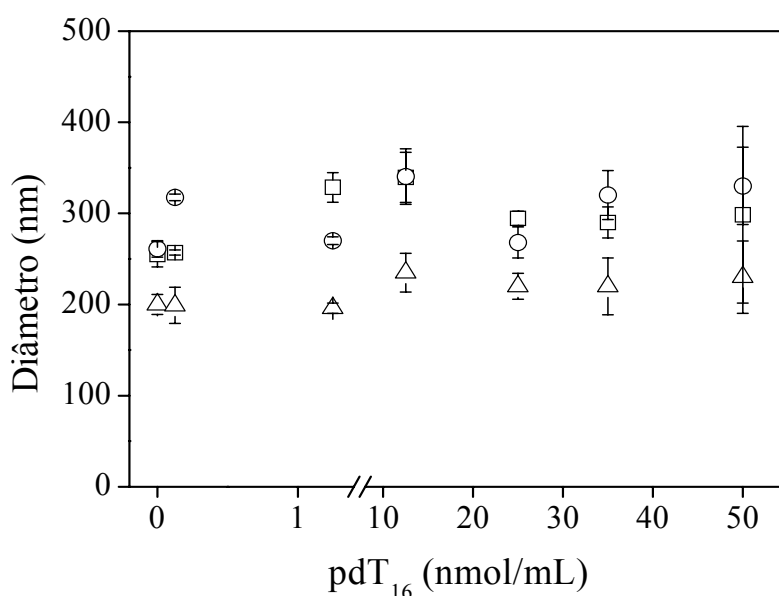


Figura 18. Diâmetro de gotícula das formulações contendo EA (□), OA (○) e DT (△) na concentração de 2 mM após adição de quantidades crescentes do pdT₁₆.

Como pode ser observado na figura 18, a adição de quantidades crescentes do pdT₁₆ conduz a um aumento do diâmetro de gotícula de todas as formulações em relação aos valores originais, antes da adição do pdT₁₆. Não se observa uma tendência de aumento relacionada com o aumento progressivo da concentração do pdT₁₆. Contudo, mesmo para a concentração de pdT₁₆ mais elevada, 50 μ M, o diâmetro de gotícula permanece próximo a 300 nm. Cabe ainda ressaltar que a mesma tendência de diâmetro de gotícula foi observada para as formulações em ausência de pdT₁₆, ou seja, as nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT apresentam diâmetro de gotícula inferior àquelas obtidas na presença dos lipídeos catiônicos EA e OA.

A avaliação da morfologia, através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), foi realizada após associação do pdT₁₆ na concentração de 25 μM. Essa concentração foi selecionada por estar próxima ao valor máximo de associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões contendo os lipídeos catiônicos EA, OA e DT, conforme demonstrado anteriormente nos estudos de associação (figura 17). As fotomicrografias obtidas para as nanoemulsões catiônicas e controle estão apresentadas na figura 19.

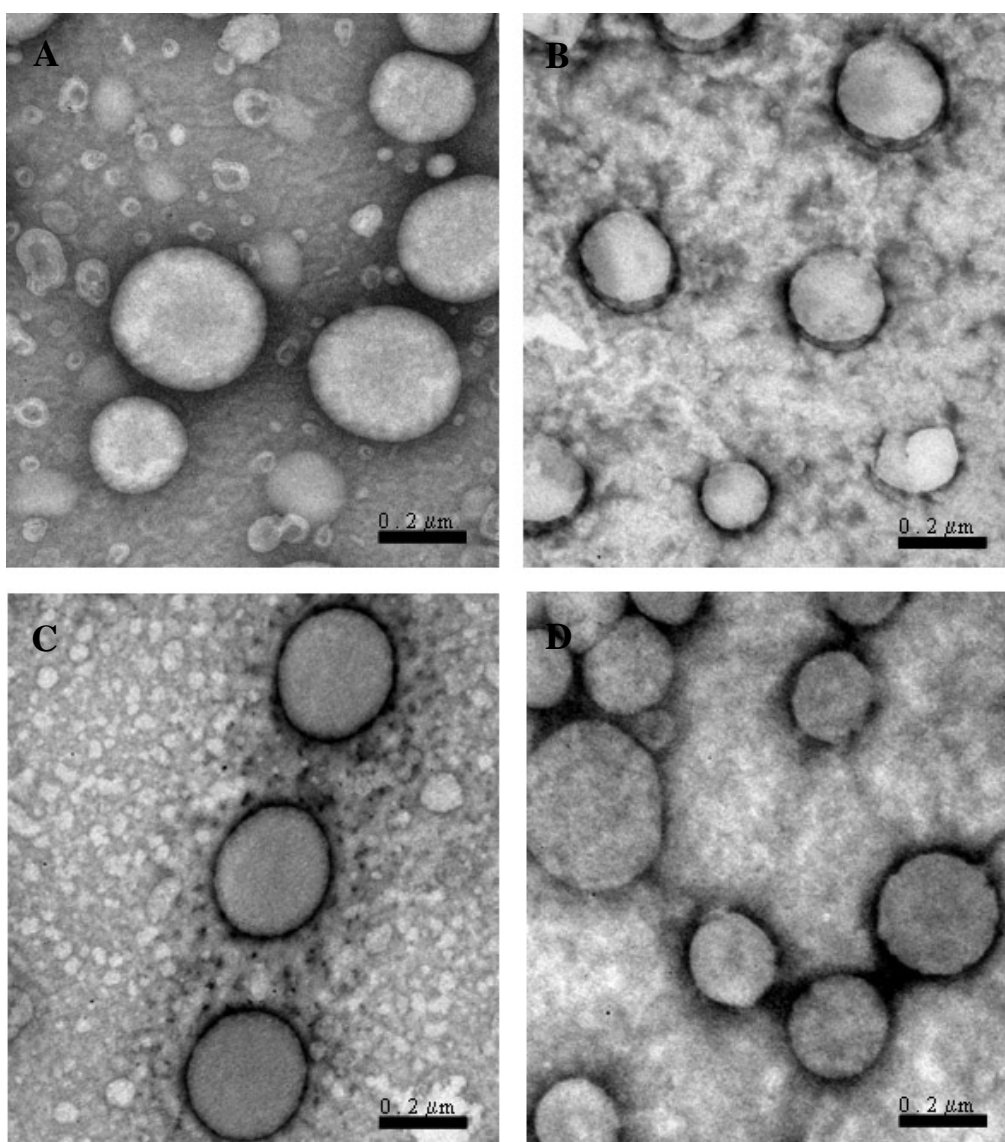


Figura 19. Fotomicrografias (MET) de nanoemulsões contendo pdT₁₆ na concentração de 25 μM na ausência de lipídeo catiônico (A) e presença dos lipídeos catiônicos EA (B), OA (C) e DT (D) na concentração de 2 mM. Aumento de 100.000x.

As fotomicrografias apresentadas demonstram que o diâmetro de gotícula parece não sofrer influência marcante após adição do pdT₁₆, sendo próximos aos valores observados através dessa técnica antes da associação do ON (figura 12). Em contrapartida, os resultados sugerem a formação de uma camada mais espessa no limite das gotículas oleosas, podendo indicar a presença do pdT₁₆ associado à interface das nanoemulsões, corroborando os resultados obtidos na associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões (figura 17). Assim, as áreas mais escuras observadas na interface das gotículas poderiam ser atribuídas à elevada afinidade do acetato de uranila pelos ácidos nucléicos (TARAHOVSKY et al., 1996). Segundo Chevallier e colaboradores (2004), as cargas positivas presentes no acetato de uranila se ligam irreversivelmente aos ácidos nucléicos, permitindo assim sua visualização por MET.

A viscosidade das nanoemulsões catiônicas em função da adição de quantidades crescentes de pdT₁₆ também foi avaliada. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Viscosidade das nanoemulsões catiônicas contendo 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT após a adição de quantidades crescentes de pdT₁₆.

pdT ₁₆ (nmol/mL)	Viscosidade (cP±d.p.)		
	EA	OA	DT
0 ^a	1,60 ± 0,030	1,60 ± 0,010	1,59 ± 0,010
0,125	1,00 ± 0,007	1,01 ± 0,005	1,00 ± 0,012
1,25	1,00 ± 0,090	1,01 ± 0,011	1,01 ± 0,008
12,5	1,00 ± 0,008	1,01 ± 0,009	1,00 ± 0,011
25	1,01 ± 0,009	1,01 ± 0,010	1,00 ± 0,004
35	1,01 ± 0,009	1,01 ± 0,005	1,01 ± 0,010
50	1,01 ± 0,008	1,01 ± 0,010	1,01 ± 0,011

(^a) Valores determinados antes da associação do pdT₁₆ (100 mg/mL de fase interna)

Apesar das diferenças em relação ao diâmetro de gotícula (figura 18), os resultados demonstram que não existe influência da concentração de ON e do tipo de lipídeo catiônico utilizado nessa propriedade. Contudo, observa-se uma redução de cerca de 50% na viscosidade em comparação aos valores obtidos antes da associação dos ON, indicando a influência da concentração de fase interna (2 mg/mL) nas condições experimentais utilizadas para associação do pdT₁₆, sobre esse parâmetro. O efeito do volume de fase interna de emulsões na viscosidade tem sido descrito na literatura (TADROS et al., 2004).

Em uma última etapa de caracterização físico-química, foi avaliado o efeito da adição de quantidades crescentes de pdT₁₆ (de 0,125 a 50 nmol/mL) sobre o pH e o potencial zeta das formulações. Todas as formulações, contendo concentrações crescentes de pdT₁₆, apresentaram valores de pH variando entre 6,3 e 6,8 (tabela 10), demonstrando não ocorrer variações deste parâmetro, ou seja, a adição de pdT₁₆ não influenciou no pH final das formulações. Esta faixa de pH garante que os lipídeos catiônicos estejam ionizados, conferindo carga positiva à interface das nanoemulsões, garantindo a associação do pdT₁₆, através de interações eletrostáticas.

Tabela 10. pH das nanoemulsões catiônicas contendo 2 mM dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT após a adição de quantidades crescentes de pdT₁₆.

pdT ₁₆ (nmol/mL)	pH±d.p.		
	EA	OA	DT
0,125	6,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,1
1,25	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,6 ± 0,2
12,5	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1
25	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,3	6,6 ± 0,2
35	6,7 ± 0,3	6,6 ± 0,2	6,5 ± 0,1
50	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,2

Nessas condições de pH, a associação do ON com as nanoemulsões catiônicas pode ser acompanhada através das alterações do potencial zeta (figura 20). Independente da natureza do lipídeo catiônico (EA, OA ou DT) empregado, a adição de quantidades crescentes de pdT₁₆ conduz a uma redução do potencial zeta das nanoemulsões. O potencial zeta das nanoemulsões apresenta inicialmente um valor positivo de cerca de 40-50 mV. Após a adição das menores concentrações de pdT₁₆, observa-se uma redução no potencial zeta até cerca de 20 – 30 mV. Após, rapidamente, as concentrações suplementares (12,5 a 50 mM) conduzem a uma inversão completa do potencial zeta original a valores negativos de cerca de -30 mV, indicando a neutralização das cargas positivas dos lipídeos catiônicos na interface das nanoemulsões. Fenômenos similares têm sido relatados em outros estudos (TRIMAILLE et al., 2001, 2003). De fato, nas condições experimentais utilizadas, a relação de cargas [+/-] varia de 20 até 0,01 em concordância com os resultados de potencial zeta observados.

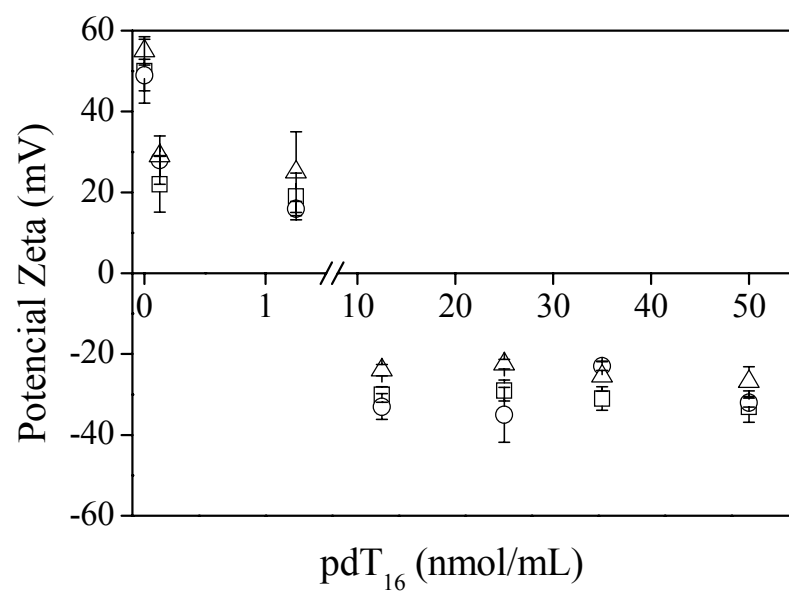


Figura 20. Potencial zeta das formulações contendo EA (□), OA (○) e DT (△) na concentração de 2 mM após adição de quantidades crescentes do pdT₁₆.

Estudos de Liberação do pdT₁₆ a partir de nanoemulsões catiônicas

Após avaliação da influência da adição do ON nas propriedades de nanoemulsões catiônicas, foi realizado um estudo preliminar de liberação do pdT₁₆ após diluição das amostras em tampão fosfato pH 7,4. A concentração de pdT₁₆ para os estudos de liberação foi selecionada a partir dos estudos de associação. Na concentração de 12,5 µM, a totalidade do pdT₁₆ está associada com as nanoemulsões catiônicas. Nessa etapa do trabalho foram avaliadas preliminarmente a influência da composição, do tempo, do fator de diluição e da relação de cargas [+/-] sobre a liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões.

Em um primeiro momento, foi avaliada a influência da presença dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT na concentração de 2 mM no perfil de liberação do pdT₁₆ a partir das gotículas de nanoemulsões. Como experimento controle, a liberação do pdT₁₆ a partir de uma formulação em ausência de lipídeo catiônico foi realizada. Nesta etapa, todas as amostras foram diluídas 1:20 em tampão-fosfato pH 7,4 e a quantidade de pdT₁₆ foi determinada após 15 minutos de diluição. Os resultados estão apresentados na figura 21.

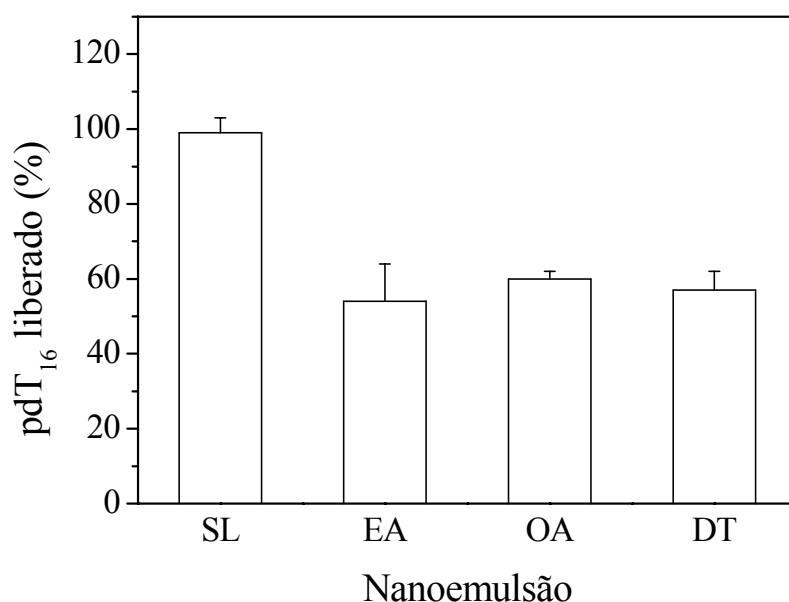


Figura 21. Quantidade de ON pdT₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões obtidas em presença dos lipídeos catiônicos EA, OA ou DT (2 mM) ou isenta de lipídeo catiônico (SL), 15 minutos após a diluição 1:20.

Como pode ser observado na figura 21, após a diluição da nanoemulsão isenta de lipídeo catiônico, em tampão fosfato, uma liberação total do pdT₁₆ foi observada. Esse resultado indica uma fraca interação dos ON com a nanoestrutura, como comentado anteriormente. Para as formulações contendo os diferentes lipídeos catiônicos, observa-se, contudo, uma taxa de liberação de aproximadamente 55-60 %, sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre as formulações, indicando a influência da presença dos lipídeos catiônicos na interface, sem um efeito da sua estrutura química, sobre a liberação dos ON. Esses resultados iniciais indicam que as interações eletrostáticas estabelecidas entre os ON e os lipídeos catiônicos são suficientes fortes para evitar que o pdT₁₆ seja liberado das nanoemulsões. Nas condições experimentais utilizadas, a relação de cargas [+/-] é de 2, ou seja, existe o dobro de cargas positivas em relação às cargas negativas do pdT₁₆.

Em uma segunda etapa, foi avaliada a influência do tempo e do fator de diluição sobre a liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões. Para tanto, foi selecionada apenas a formulação contendo o lipídeo catiônico DT, em virtude de ser o a formulação a qual o diâmetro de gotícula permanece inalterado após a associação do pdT₁₆ (figura 18), apresenta maior taxa de associação (figura 17) e liberação equivalente a EA e OA. As figuras 22 e 23 apresentam os resultados relativos à liberação (%) do pdT₁₆ em função do tempo e fator de diluição, respectivamente.

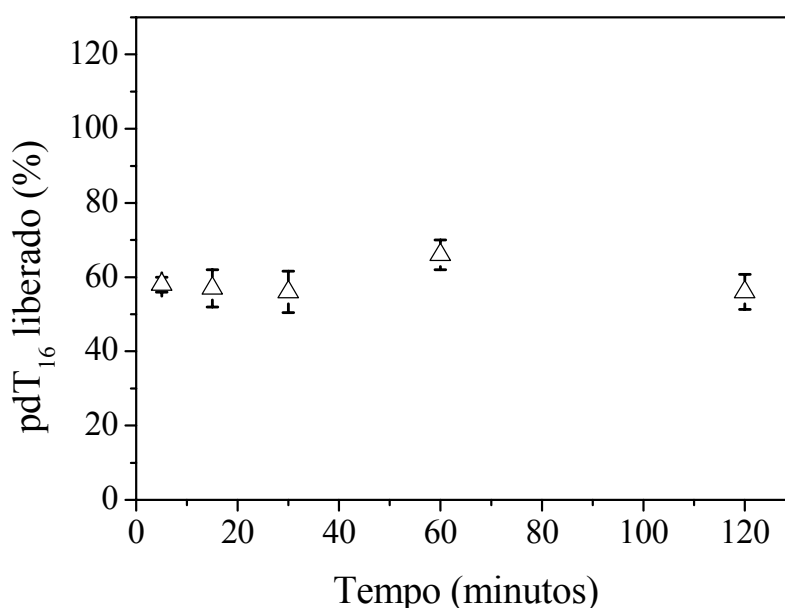


Figura 22. Quantidade de pdT₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2 mM, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a diluição na proporção 1/20.

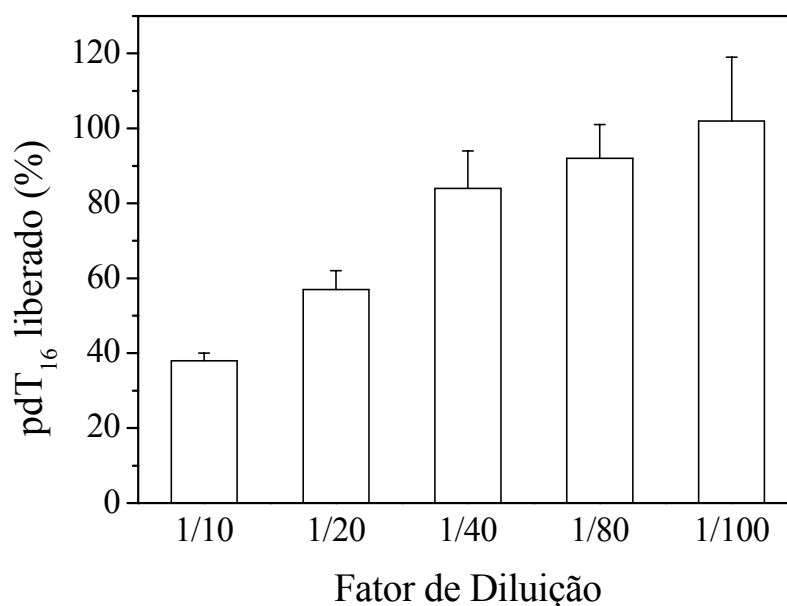


Figura 23. Quantidade de pdT₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2 mM, 15 minutos após a diluição nos fatores de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 e 1/100.

A figura 22 demonstra o percentual de pdT₁₆ liberado a partir das nanoemulsões em função do tempo. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na taxa de liberação do pdT₁₆ após 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a diluição das nanoemulsões contendo o pdT₁₆ na diluição 1/20. Esse resultado indica que o equilíbrio entre a fração associada e aquela liberada é rapidamente estabelecido e não apresenta uma influência significativa do tempo de diluição, nas condições experimentais testadas. Contudo, de acordo com a figura 23, pode-se observar que à medida que aumenta o fator de diluição, aumenta significativamente ($p < 0,05$) a taxa de liberação do pdT₁₆, chegando a ocorrer uma taxa de liberação de cerca de 100% para o maior fator, de 1/100. Estes resultados demonstram que o complexo eletrostático formado entre o lipídeo catiônico e o pdT₁₆ na interface das gotículas se desfaz com o aumento do fator de diluição. Teixeira e colaboradores (1999) descreveram que os fenômenos de competição que ocorrem na presença de íons, presentes no meio de diluição, como é o caso do tampão-fosfato pH 7,4, favorece a descomplexação do pdT₁₆ da interface das gotículas.

Em uma última etapa, a investigação do efeito de diferentes relações de cargas [+/-] (lipídeo catiônico/ON), sobre a liberação do pdT₁₆ a partir da nanoemulsão contendo o lipídeo DOTAP foi realizada. A figura 24 apresenta os resultados obtidos.

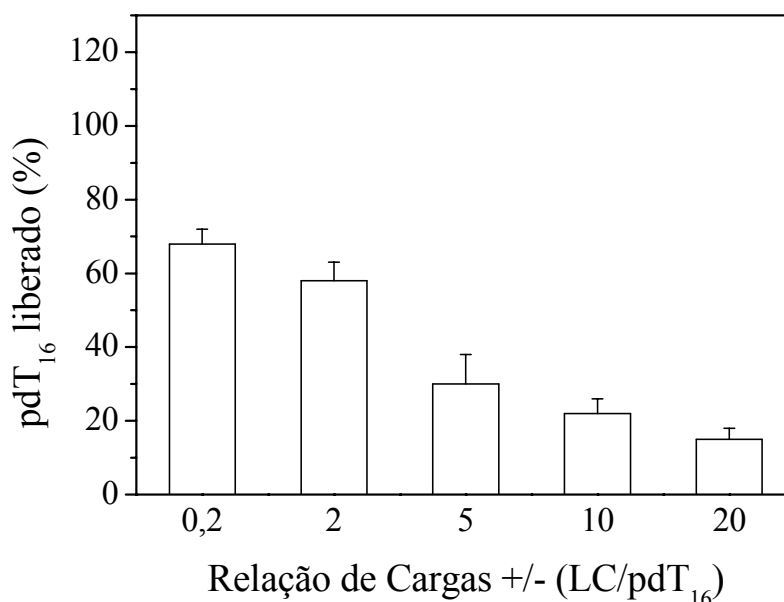


Figura 24. Quantidade de ON pdT₁₆ liberado (%) a partir das nanoemulsões contendo o lipídeo catiônico DT na concentração de 2 mM, após 15 minutos de diluição na proporção 1/20, nas relações de carga [+/-] de 0,2, 2, 5, 10 e 20.

De acordo com a figura 24, pode-se observar que à medida que aumenta a relação de cargas [+/-] diminui a quantidade de pdT₁₆ liberado, o que evidencia que a taxa de liberação é fortemente influenciada pelas interações eletrostáticas estabelecidas entre os lipídeos catiônicos e ON. Para a relação de cargas 0,2, por exemplo, observa-se uma taxa de liberação de aproximadamente 70%. Neste caso, existe predominância de cargas negativas, não havendo sítios de interação de carga positiva suficiente para complexar todo o pdT₁₆. Um maior número de sítios de interação de cargas positivas conduz geralmente a uma redução na descomplexação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões. Quando a relação de cargas é igual a 2 ou 5 observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de liberação do pdT₁₆. Entretanto, para as maiores relações de cargas, de 10 e 20, não foi detectada diferença significativa em termos de liberação ($p < 0,05$). O conjunto dos resultados indica a influência da relação de cargas na liberação do ON, e por outro lado, que a partir de uma determinada relação de cargas esse parâmetro não mais influencia significativamente a liberação.

CONCLUSÕES

- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado à obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro de gotícula de cerca de 230 nm, utilizando a proporção de solventes de 30/60 (etanol/água).
- As propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea podem ser influenciadas tanto pela concentração como pela natureza dos lipídeos catiônicos EA, OA e DT.
- Com base nos resultados obtidos, as nanoemulsões contendo a concentração 2 mM dos diferentes lipídeos catiônicos foram selecionadas como as mais adequadas, uma vez que apresentam um diâmetro de gotícula de cerca de 200-250 nm e um valor máximo de potencial zeta positivo, de cerca de 40-50 mV.
- A eficiência de associação do pdT₁₆ demonstrou ser influenciada pela composição da interface das nanoemulsões, sendo que o maior valor observado foi para a nanoemulsão contendo o lipídeo catiônico DT (cerca de 70 mg/g), indicando o efeito da estrutura do lipídeo catiônico na associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões.
- Os resultados obtidos na avaliação do efeito da adição de quantidades crescentes do pdT₁₆ sobre o potencial zeta das nanoemulsões, diâmetro médio e morfologia permitiu caracterizar a associação do pdT₁₆ com as nanoemulsões.
- Os resultados preliminares de liberação do pdT₁₆ a partir das nanoemulsões catiônicas evidenciaram que o fator de diluição e a relação de cargas [+/-] são os principais fatores que governam a liberação dos ON a partir das nanoemulsões.
- O conjunto dos resultados obtidos demonstra a influência da concentração e da natureza dos lipídeos catiônicos empregados nas propriedades físico-químicas de nanoemulsões como sistema de liberação de oligonucleotídeos.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Jr. **Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ARII, K.; FUKUTA, Y.; KAI, T.; KOKUBA, Y. Preparation of fine emulsified fat particles without glycerol for intravenous nutrition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.9, p.67-73, 1999.

BANKOWSKI, M. J.; ANDERSON, S. M. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. **Clinical microbiology newsletter**, vol.26, no.2, p9-15, 2004.

BARUT, K. D.; COSKUN ARI, F. F.; ÖNER, F. Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system. **Turkish Journal of Chemistry**, vol.29, p.27-40, 2005.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.82, no.11, p.1069-1079, 1993.

BEREZHNA, S.; SCHAEFER, S.; HEINTZMANN, R.; JAHNZ, M.; BOESE, G.; DENIZ, A.; SCHWILLE, P. New effects in polynucleotide release from cationic lipid carriers revealed by confocal imaging, fluorescence cross-correlation spectroscopy and single particle tracking. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1669, p.193-207, 2005.

BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMELJN, S.; VAN MEIJGAARDEN, C.; KOERTEN, H.; VAN DER MEULEN, H.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; JUNGINGER, H.; BORCHARD, G. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **Journal of Controlled Release**, vol. 100: 145-155, 2004.

BOLDYREV, V. V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol.2, no.2, p.143-145, 1995.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.280, p.241-251, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRAZEAU, G.; ATTIA, S.; POXON, S.; HUGUES, J. In vitro myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non-viral gene delivery. **Pharmaceutical Research**, vol.15, p.680-684, 1998.

BRITISH Pharmacopoeia. 3. ed. London: The Stationery Office, 1999. CD Version.

BROWN, M. D.; SCHÄTZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.229, p.1-21, 2001.

- CALVO, P.; ALONSO, M. J.; VILA-JATO, J. L.; ROBINSON, J. R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.48, no.11, p.1147-1152, 1996.
- CAMPBELL, R. B.; BALASUBRAMANIAN, S. V.; STRAUBINGER, R. M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1512, p.27-39, 2001.
- CHAIX, C.; PACARD, E.; ELAÏSSARI, A.; HILAIRE, J. F.; PICHOT, C. Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: colloidal characterization and peptide immobilization. **Colloids and Surfaces**, vol.29, p.39-52, 2003.
- CHANSIRI, G.; LYONS, R. T.; PATEL, M. V.; HEM, S. L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.88, no.4, p.454-458, 1999.
- CHESNOY, S.; HUANG, L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, vol.29, p.27-47, 2000.
- CHESNOY, S.; DURAND, D.; DOUCET, J.; SLOTZ, D. B.; HUANG, L. Improved DNA/Emulsion complex stabilized by poly(ethylene glycol) conjugated phospholipid. **Pharmaceutical Research**, vol.18, no.10, p.1480-1484, 2001.
- CHEVAILLIER, P. Étude au microscope électronique de l'interaction de l'acide désoxyribonucléique et des polyamines. **Experimental Cell Research**, vol.58, p.213-224, 2004.
- CHOI, B. Y.; CHUNG, J. W.; PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, Y. I.; KOH, Y. H.; KWON, J. W.; LEE, K. H.; CHOI, H. J.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Gene Delivery to the rat liver using cationic lipid emulsion/DNA complex: comparison between intra-arterial, intraportal and intravenous administration. **Korean Journal of Radiology**, vol.3, p.194-198, 2002.
- CHOI, W. -J.; KIM, J. -K.; CHOI, S. -H.; PARK, J. -S.; AHN, W. -S.; KIM, C. -K. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. **Biomaterials**, vol.25, p.5893-5903, 2004.
- CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, vol.71, p.339-350, 2001.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.
- COUVREUR, P.; MALVY, C. **Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides**. London: Taylor & Francis, 2000.

DELAIR, T. DNA Interactions with functionalized emulsions. In: SCHWARZ, J. A.; CONTESCU, C. I.; PUTYERA, K. (Ed.). **Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2004.

EASTMAN, S. J.; SIEGEL, C.; TOUSIGNANT, J.; SMITH, A. E.; CHENG, S. H.; SCHEULE, R. K. Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1325, p.41-62, 1997.

ELBAZ, E.; ZEEVI, A.; KLANG, S.; BENITA, S. Positively charged submicron emulsions - a new type of colloidal drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.96, p.R1-R6, 1996.

ENGELS, J. W.; UHLMANN, E. Pharmaceutical aspects of oligonucleotides. **Chemistry of Oligonucleotides**, vol.2, p.35-78, 1999.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol.24, p.755-767, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt.1. cap. V.2.7.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; AYNIE, Y.; NAKADA, Y.; LAMBERT, G.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. **Journal of Controlled Release**, vol.53, p.137-143, 1998.

FATTAL, E.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Liposome-based formulations for the delivery of oligonucleotides. **S.T.P Pharma Sciences**, vol.11, no.1, p.31-44, 2001.

FATTAL, E.; DE ROSA, G.; BOCHOT, A. Gel and solid matrix systems for the controlled delivery of drug carrier-associated nucleic acids. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.277, p.25-30, 2004.

FELGNER, P. L.; GADEK, T. R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.84, p.7413-7417, 1987.

FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, vol.2, no.4, p.134-143, 1999.

GAO, X.; HUANG, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p.280-285, 1991.

HARA, T.; LIU, F.; LIU, D.; HUANG, L. Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.24, p.265-271, 1997.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical Methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.87, no.2, p.125-129, 1998.

HÉLÈNE, C.; TOULMÉ, J. J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigen nucleic acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1049, no.2, p.99-125, 1990.

HUGHES, M. D.; HUSSAIN, M.; NAWAZ, Q.; SAYYED, P.; AKHTAR, S. The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. **Drug Discovery Today**, vol.6, no.6, p.303-315, 2001.

HUNG, C. -H.; HWANG, T. -L.; CHANG, C. -C.; FANG, J. -Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.289, p.197-208, 2005.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. In: **Validation of analytical procedures**, Methodology. Topic Q2B, 1996. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 1996.

ISHII, F.; SASAKI, I.; OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.42, p.513-515, 1990.

JAASKELAINEN, I.; URTTI, A. Cell membranes as barriers for the use of antisense therapeutic agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, vol.2, no.4, p.307-318, 2002.

JUMAA, M.; MÜLLER B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.163, p.81-89, 1998.

JUMAA, M.; MÜLLER B. W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.183, p.175-184, 1999.

JURKIEWICZ, P.; OKRUSZEK, A.; HOF, M.; LANGNER, M. Associating oligonucleotides with positively charged liposomes. **Cellular & Molecular Biology Letters**, vol.8, p.77-84, 2003.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. In vivo gene transfer to the mouse nasal cavity mucosa using a stable cationic lipid emulsion. **Molecules and Cells**, vol.10, no.2, p.142-147, 2000.

KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as *in vitro* and *in vivo* transfection agents. **Pharmaceutical Research**, vol.18, no.1, p.54-60, 2001.

KIM, T. W.; KIM, Y. J.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer. **Journal of Controlled Release**, vol.82, p.455-465, 2002.

KIM, Y. J.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.252, p.241-252, 2003.

- KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; SHIN, B. C.; JEONG, S. Y. Polycations enhance emulsion-mediated in vitro and in vivo transfection. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.295, p.35-45, 2005.
- KLANG, S.; FRUCHT-PERY, J.; HOFFMAN, A.; BENITA, S. Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.46, p.986-993, 1994.
- KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. (Ed.). **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s.l.]: Harwood academic publishers, 1998.
- KRIEG, A. M.; STEIN, C. A. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or antiprotein? **Antisense Research and Development**, vol.5, p.241, 1995.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. Vol. II. 1517 p.
- LAM, K.; TIMMERMAN, H. The use of nucleic acids tools for target validation in central nervous system therapy. **Drug Discovery Today: Technologies**, vol.1, no.2, p.85-91, 2004.
- LAMBERT, G.; FATTAL, E.; COUVREUR, P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.47, p.99-112, 2001.
- LAPPALAINEN, K.; URTTI, A.; SÖDERLING, E.; JÄÄSKELÄINEN, I.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol.1196, p.201-208, 1994.
- LEE, M.-K.; CHUN, S.-K.; CHOI, W.-J.; KIM, J.-K.; CHOI, S.-H.; KIM, A.; OUNGBHO, K.; PARK, J.-S.; AHN, W. S.; KIM, C.-K. The use of chitosan as a condensing agent to enhance emulsion-mediated gene transfer. **Biomaterials**, vol.26, p.2147-2156, 2005.
- LI, L. C.; TIAN, Y. Zeta potential. In: JAMES, S.; JAMES C. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.
- LIANG, E.; AJMANI, P. S.; HUGHES, J. A. Oligonucleotide delivery: a cellular prospective. **Pharmazie**, vol.54, p.559-566, 1999.
- LIEDTKE, S.; WISSING, S.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.196, p.183-185, 2000.
- LIU, F.; YANG, J.; HUANG, L.; LIU, D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. **Pharmaceutical Research**, vol.13, no.11, p.1642-1646, 1996.

- MAA, Y. -F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development and Technology**, vol.4, no.2, p.233-240, 1999.
- MATTE, U.S.; GIUGLIANI, R. Terapia Gênica- Aspectos Técnicos. In: BINSFELD, P.C. (ed.). **Biossegurança em Biotecnologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004.
- MIN, K. A.; LEE, S. K.; KIM, C. -K. Improved gene expression pattern using Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid and cationic emulsion. **Biomaterials**, vol.26, p.1063-1070, 2005.
- MIZUKOSHI, Y.; NAKAMURA, H.; BANDOW, H.; MAEDA, Y.; NAGATA, Y. Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate. **Ultrasonics sonochemistry**, vol.6, p.203-209, 1999.
- MÖNKKÖNEN, J.; URTTI, A. Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.34, p.37-49, 1998.
- MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.89, no.5, p.614-626, 2000.
- MUCHTAR, S. BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophthalmic use. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol.91, p.181-190, 1994.
- NAINI, V.; SINGH, S. Homogenization and homogenizers. In: JAMES, S.; JAMES C. B. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2.ed. USA: Marcel Dekker Inc., 2002.
- NAIRN, J. G. Solutions, emulsions, suspensions, and extracts. In: GENNARO, A. R. (Ed.). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20.ed. Easton: Mack, 2000. p. 741-744.
- OPALINSKA, J. B.; GEWIRTZ, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. **Nature Publishing Group**, vol.1, p.503-514, 2002.
- OTT, G.; SINGH, M.; KAZAZ, J.; BRIONES, M.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; O'HAGAN, D. T. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. **Journal of Controlled Release**, vol.79, p.1-5, 2002.
- PARK, K. -M.; LEE, M. -K.; HWANG, K. -J.; KIM, C. -K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.183, p.145-154, 1999.
- PIROLLO, K. F.; RAIT, A.; SLEER, L. S.; CHANG, E. H. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. **Pharmacology & Therapeutics**, vol.99, no.1, p.55-77, 2003.
- PONGCHAROENKIAT, N.; NARSIMHAN, G.; LYONS, R. T.; HEM, S. L. The effect of surface charge and partition coefficient on the chemical stability of solutes in O/W emulsions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.91, no.2, p.559-570, 2002.

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; GOLDSTEIN, D.; BENITA, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol.131, p.1-13, 2004.

RABINOVICH-GUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K.; LAMBERT, G.; COUVREUR, P.; CHAMINADE, P. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, In Poof, p.1-8, 2005.

RAFFOURNIER, C.; SAULNIER, P.; BOURY, F.; PROUST, J. E.; LEPAULT, J.; ERK, I.; OLLIVON, M.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. Oil/water "hand-bag like structures": how interfacial rheology can help to understand their formation? **Journal of Drug Delivery Science And Technology**, vol.15, no.1, p.3-9, 2005.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.263, p.85-94, 2003.

SCANLON, K. J.; OHTA, Y.; ISHIDA, H.; KIJIMA, H.; OHKAWA, T.; KAMINSKI, A.; TSAI, J.; HORNG, G.; KASHANI-SABET, M. Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. **The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, vol.9, no.13, p.1288-1296, 1995.

SHCHIPUNOV, Y. A. Lecithin. In: HUBBARD, A. T. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.

SILVA, C. A. **Caracterização de Nanoemulsões Catiônicas Lipídicas como Sistemas de Liberação para Oligonucleotídeos**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAESSION, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions--effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.252, p.123-132, 2003.

SORGI, F. L.; HUANG, L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.144, p.131-139, 1996.

SRINIVASAN, S. K.; IVERSEN, P. Review of in vivo pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, vol.9, no.2, p.129-137, 1995.

STAHEL, R. A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy - an overview. **Lung Cancer**, vol.41, Suppl.1, p.S81-S88, 2003.

STORM, G.; CROMMELIN, J. A. Liposomes: quo vadis? **Focus**, vol.1, p.19-31, 1998.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol.108-109, p.227-258, 2004.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol.108-109, p.303-318, 2004.

TAKAMURA, A.; ISHII, F.; NORO, S.; KOISHI, M. Effect of homogenization conditions on the physicochemical properties of emulsion bases. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, vol.31, p.2786-2792, 1983.

TAMILVANAN, S.; KHOURY, K.; GILHAR, D.; BENITA, S. Ocular delivery of cyclosporin A I. Design and characterization of cyclosporin A-loaded positively-charged submicron emulsion. **S.T.P Pharma Sciences**, vol.11, no.6, p.421-426, 2001.

TAMILVANAN, S. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. **Progress in lipid research**, vol. 43, p.489-533, 2004.

TARAHOVSKI, T. S.; KHUSAINOVA, R. S.; GORELOV, A. V.; NICOLAEVA, T. I.; DEEV, A. A.; DAWSON, A. K.; IVANITSKY, V. R. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. **FEBS Letters**, vol.390, no.2, p.133-136, 1996.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, vol.16, no.1, p.30-36, 1999.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; ROSILIO, V.; BENITA, S.; LEPAULT, J.; ERK, I.; COUVREUR, P. New Bicompartimental Structures Are Observed When Stearylamine is Mixed with Triglyceride Emulsions. **Pharmaceutical Research**, vol.17, no.10, p.1329-1332, 2000.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; DEVERRE, J. R.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Factors influences the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. **Journal of Controlled Release**, vol.70, p.243-255, 2001^a.

TEIXEIRA, H.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; LEPAULT, J.; ERK, I.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. Characterization of oligonucleotide / lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. **Biophysical Chemistry**, vol.92, p.169-181, 2001^b.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos *antisense* através de técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, vol.18, no.2, p.89-93, 2002.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICH, L.; BOUTET, T.; DEVERRE, J. R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. **Journal of Controlled Release**, vol.89, no.3, p.473-482, 2003.

THE UNITED States Pharmacopoeia. The National Formulary. United States Pharmacopoeial convention. Rockville MD. 28 ed. Washington, DC, 2004. CD Version

TIAN, Y.; LI, L. C. Light-scattering method in particle size analysis of parenteral emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol.24, no.3, p.275-280, 1998.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, vol.279, p.784-792, 2001.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol.258, p.135-45, 2003.

UNGARO, F.; DE ROSA, G.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol.31, p.143-149, 2003.

WADE, A.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 2.ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994.

WAGNER, E.; KIRCHEIS, R.; WALKER, G. F. Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol.58, p.152-161, 2004.

WASHINGTON, C.; DAVIS, C. C. The production of parenteral feeding emulsions by microfluidizer. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.44, p.169-176, 1988.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.20, p.131-145, 1996.

WESTESEN, K.; WEHLER, T. Particle size determination of a submicron-sized emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol.78, p.125-132, 1993.

YANG, S. C.; BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. **Drug Development Research**, vol.50, p.476-486, 2000.

YI, S. W.; YUNE, T. Y.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; CHOI, Y. W.; KWON, I. C.; LEE, E. B.; JEONG, S. Y. A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. **Pharmaceutical Research**, vol.17, no.3, p.314-320, 2000.

YOO, H. S.; KWON, S. M.; KIM, Y. J.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; KIM, J.; JEONG, S. Y. Cationic lipid emulsion containing heavy oils for the transfection of adherent cells. **Journal of Controlled Release**, vol.98, p.179-188, 2004.

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E. S.; BARRAT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol.89, p.139-146, 1993.

ZELPHATI, O.; SZOKA, F. C. Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotide: a real or magic bullet? **Journal of Controlled Release**, vol.41, p.99-119, 1996.

ZHANG, S.; XU, Y.; WANG, B.; QIAO, W.; LIU, D.; LI, Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. **Journal of Controlled Release**, vol.100, p.165-180, 2004.

ZHDANOV, R. I.; PODOBED, O. V.; VLASSOV, V. V. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. **Bioelectrochemistry**, vol.58, p.53-64, 2002.

ZOBEL, H. -P.; WERNER, D.; GILBERT, M.; NOE, C. R.; STIENEKER, F.; KREUTER, J.; ZIMMER, A. Effect of ultrasonication on the stability of oligonucleotides adsorbed on nanoparticles and liposomes. **Journal of Microencapsulation**, vol.16, no.4, p.501-509, 1999.