

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS MULTIPAREDES ESTABILIZADAS POR POLISSORBATO 80/LECITINA REVESTIDAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA PARA FUTURA FUNCIONALIZAÇÃO COM ESPÉCIES MOLECULARES.

Márcia Adorne^{1,2*}; Sabrina Buttenbender¹; Sílvia S. Guterres²; Adriana R. Pohlmann^{1,2}

¹Laboratório de Micro e Nanopartículas aplicadas à terapêutica, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química Orgânica, UFRGS; ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Resumo– Neste trabalho, foi realizado um estudo de otimização dos componentes utilizados na estabilização de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e na formação da parede catiônica adicional desses sistemas. O estudo foi dividido em duas partes: a primeira consistiu na otimização da concentração do tensoativo aniônico lecitina e, a segunda, na otimização da concentração de quitosana, utilizada no recobrimento das nanocápsulas. Os sistemas foram caracterizados por diferentes técnicas (difração de laser e espectroscopia de correlação de fótons, para determinação de tamanho das partículas, e “Phase Analysis Light Scattering”, para o potencial zeta). Na primeira fase do estudo, verificou-se a formação de uma monocamada completa de lecitina em torno das nanocápsulas quando a mesma estava na concentração de 9mg/mL (LNC₉); já na segunda parte, obteve-se uma monocamada e um sistema mais estável quando a suspensão LNC₉ foi revestida com quitosana na concentração de 0,7mg/mL (MN_{0,7}). Em conclusão, foi possível a obtenção de um sistema mais estável visando à ligação de diferentes espécies moléculas para aplicação terapêutica.

Palavras-chave: *Nanocápsulas, interação iônica, quitosana.*

Introdução

Nanocápsulas poliméricas são sistemas formados por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica com diâmetro inferior a 1 μ m que tem sido amplamente estudados na veiculação de fármacos e/ou biomoléculas, como hormônios, DNA, iRNAs e anticorpos, formando sistemas híbridos promovendo o aumento da biodisponibilidade, a proteção contra a degradação enzimática, a redução da toxicidade de fármacos em diversas farmacoterapias devido ao seu efeito protetor, a modulação da liberação, além de facilitar o transporte através de barreiras biológicas [1-3]. Além disso, por apresentar uma elevada razão superfície/volume estes materiais são caracterizados por apresentar novas propriedades quando comparados com as substâncias na sua forma *bulk* [5]. Além disso, tais dispositivos podem ainda ter a sua superfície modificada pelo recobrimento de polissacarídeos catiônicos, como a quitosana, de forma a fornecer tanto propriedades diferenciadas às nanocápsulas no meio biológico [4,5], como novas propriedades tecnológicas como a ligação com íons metálicos de forma a fornecer sítios de ligação para complexar com diferentes fármacos e/ou com biomoléculas [6]. Em trabalhos prévios, Prego *et al.* [7] verificaram que o uso de elevadas concentrações de lecitina afetou a quantidade de quitosana associada à superfície das mesmas, além disso, o tamanho das nanocápsulas contendo quitosana em sua superfície foi afetado pelo tamanho da cadeia do polímero catiônico. Dessa forma, este trabalho objetiva a otimização de nanocápsulas de núcleo lipídico variando a concentração de lecitina de soja e seu posterior revestimento utilizando diferentes concentrações de quitosana, visando a obtenção de um sistema estável para futura associação de fármacos e/ou biomoléculas.

Parte Experimental

Preparação das suspensões de LNC

As suspensões de nanocápsulas, LNC, foram produzidas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado [5] variando-se a concentração do tensoativo adicional utilizado, Lipoid S75[®]. Nesse método, uma fase orgânica, previamente solubilizada, constituída pelo polímero (poli(ϵ -caprolactona)), óleo (triglicerídeos de cadeia média), tensoativo de baixo EHL (monoesterato de sorbitano) e tensoativo aniônico (Lipoid S75[®]) foi injetada em uma fase aquosa constituída por um tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80). As formulações de LNC foram nomeadas de acordo com a concentração final de LipoidS75: 3mg/ml (LNC₃), 5mg/ml (LNC₅), 8mg/ml (LNC₈), 9mg/ml (LNC₉), 10mg/ml (LNC₁₀), 12mg/ml (LNC₁₂) e 14mg/ml (LNC₁₄).

Revestimento superficial das LNCs com quitosana

Foram preparadas nove suspensões de LNC revestidas com diferentes concentrações de quitosana (MN). Para isso, foram preparadas soluções de quitosanas com concentrações de 5mg/ml, 7mg/ml, 8mg/ml, 9mg/ml, 10mg/ml, 11mg/ml, 12mg/ml, 13mg/ml e 14mg/ml em solução de ácido acético à 2%(v/v). Após a solubilização, as diferentes soluções foram filtradas utilizando-se unidade filtrante com diâmetro de poro de 45µm (Millipore®). 1mL dessas soluções foram adicionadas, gota a gota, em 9 ml da suspensão LNC₉, sob agitação magnética elevada e assim permanecendo durante 2 horas. As formulações recobertas com quitosana foram nomeadas segundo a concentração final do polímero catiônico; por exemplo, a formulação LNC₉ revestida com solução de quitosana 0,5mg/ml é referenciada como MN_{0,5}.

Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados

Os perfis de distribuição granulométrica das formulações de nanocápsulas foram obtidos por difração de laser e espectroscopia de correlação de fótons e os valores de potencial zeta foram obtidos por “Phase Analysis Light Scattering”.

Estabilidade das formulações antes e após o recobrimento com quitosana

Para verificar a influência da concentração de Lipoid S75® e quitosana na estabilidade das nanocápsulas, as formulações de LNC contendo diferentes concentrações de lecitina de soja e as formulações revestidas com diferentes concentrações de quitosana (série MN) foram submetidas a testes de estabilidade acelerada utilizando metodologias preconizadas pela ANVISA. Cada amostra foi armazenada em câmara climática e submetida à temperatura de 40 °C ± 2 °C e sua distribuição granulométrica foi em função do tempo por difratometria de laser. Um segundo teste de estabilidade foi realizado para as suspensões de nanocápsulas MN_{0,5}, MN_{0,7} e MN_{1,4} estocando as formulações a temperatura de 5 °C ± 3 °C e o perfil granulométrico monitorado em função do tempo pela técnica de difração de laser.

Resultados e Discussão

As suspensões de LNC com concentração de lecitina de soja entre 3 mg/mL e 9 mg/mL mostraram de D[4.3] entre 121nm ± 3nm e 127nm ± 2nm e uma estreita distribuição de tamanho, evidenciado pelo valor de SPAN próximo a 1; enquanto que as formulações com maiores concentrações de lecitina de soja mostraram partículas com tamanho maior que 1µm e uma ampla distribuição de tamanho, com valores de SPAN próximos entre 9,8 (LNC12) e 56,1 (LNC14). Tal resultado pode ser atribuído ao excesso do tensoativo aniônico, resultando na formação adicional de estruturas micrométricas. Os valores de potencial zeta mostraram-se negativos e com uma tendência a redução com aumento da concentração de Lipoid S75® (Fig. 1), além disso, verifica-se a partir da concentração de 9 mg/mL de Lipoid S75® a formação de um platô, a partir do qual não há redução significativa dos valores do potencial zeta. Sabendo-se que a quantidade máxima de moléculas de lecitina adsorvidas à superfície das nanopartículas forma uma monocamada completa. Em cada uma dessas regiões, foram ajustadas equações lineares, cuja intersecção corresponde à concentração a partir da qual ocorra a saturação dos sítios de adsorção disponíveis na superfície das nanocápsulas para a formação de uma monocamada composta por moléculas de lecitina.

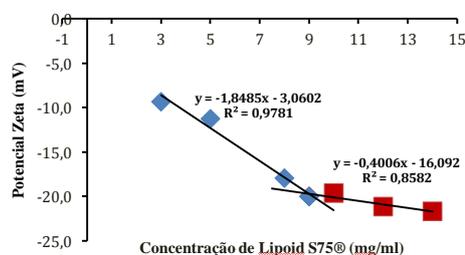


Fig 1. Valores de potencial zeta em função da concentração de Lipoid S75® utilizada nas suspensões de LNC.

As formulações LNC apresentando tamanho nanométrico foram submetidas a um teste preliminar de estabilidade com o objetivo de avaliar a influência da formação de uma monocamada completa de lecitina de soja na estabilidade das nanocápsulas. A partir dos perfis de distribuição de tamanho (Fig. 2), verificou-se, para a suspensão LNC₃, o surgimento de partículas micrométricas a partir do 7° dia; no entanto, tal desestabilização mostra-se reversível, devido à volta do sistema ao seu estado inicial até o 35° dia. Por outro lado, as formulações LNC₅ e LNC₈ mostraram alterações irreversíveis a partir do 7° dia, devido ao surgimento de agregados micrométricos durante todo período de monitoramento. De forma diferente das demais formulações, a suspensão LNC₉ manteve seu perfil inicial ao longo dos 42 dias, tal fato pode ser atribuído ao maior grau de estabilização por mecanismo eletrostático nessa formulação em comparação às demais. Como a formulação LNC₃ apresentou até o 35° dia somente alterações reversíveis, pode-se afirmar que sua estabilidade seja semelhante à LNC₉, no entanto, o mecanismo de estabilização predominante em cada uma dessas duas formulações é diferente, sendo o mecanismo estérico para LNC₃. Dessa forma, por apresentar maior densidade de carga negativa em sua superfície e a formação de uma monocamada completa do tensoativo aniônico (demonstrado pelo perfil do potencial zeta em função da concentração de lecitina de soja na superfície das partículas), a suspensão LNC₉ foi selecionada para o revestimento superficial com o polímero catiônico quitosana.

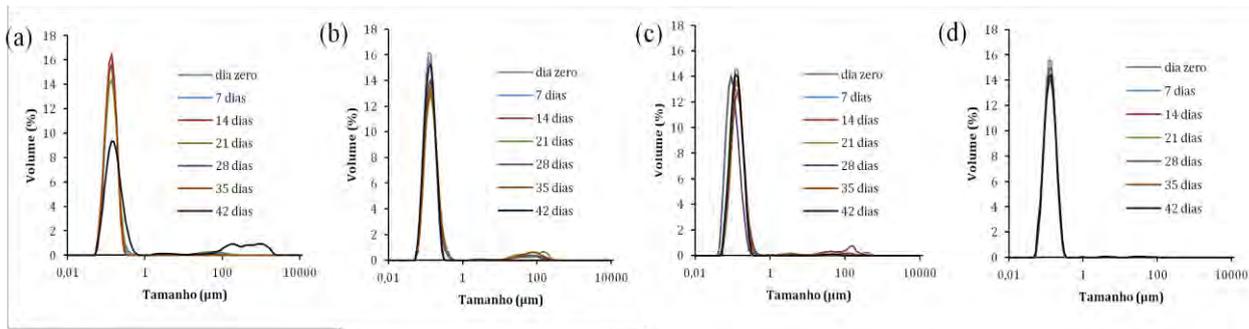


Fig 2. Perfis de distribuição de tamanho obtidos pela técnica de difração de laser. Em (a), LNC₃; (b), LNC₅; (c), LNC₈ e (d), LNC₉.

O revestimento da suspensão LNC₉ com quitosana foi verificado pelo aumento de tamanho médio (Z-Average) e reversão do potencial zeta (Fig. 4a e 4b, respectivamente). Além disso, a partir dos valores de potencial zeta em função da concentração de quitosana utilizada no recobrimento da formulação LNC₉, observa-se a formação de um platô, a partir do qual não ocorre variação significativa dos valores de potencial zeta. A cada uma dessas regiões foi ajustada uma equação da reta, obtendo-se correlação linear; após igualar as duas equações obteve-se o valor de concentração de quitosana necessária para obtenção de uma monocamada completa do polímero catiônico em torno das partículas foi determinado como sendo 0,7mg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para os valores de diâmetro médio em função da concentração de quitosana obtendo-se o mesmo resultado corroborando com a hipótese para a formação de uma monocamada.

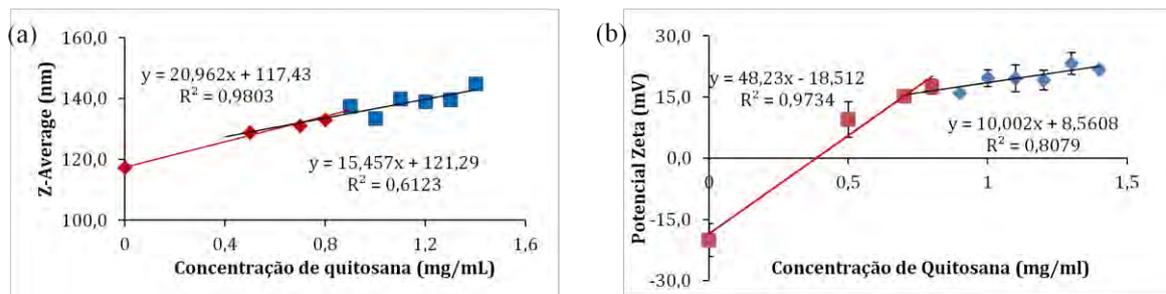


Fig 4. Em (a) valores de diâmetro médio (Z-Average) das LNC₉ revestidas com diferentes concentrações de quitosana pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons e, em (b), valores de potencial zeta em função da concentração de quitosana obtidos pela técnica de “Phase Analysis Light Scattering”.

As nove suspensões da série MN foram submetidas a teste de estabilidade acelerada (a temperatura de 40 °C ± 2 °C) com o objetivo de acelerar possíveis processos de instabilidade. A partir dos perfis de distribuição granulométrica, verificou-se que todas as formulações apresentaram a formação de aglomerados a partir da primeira análise (ocorrida sete dias após estocagem em câmara climática), com exceção das suspensões MN_{0,5}, MN_{0,7}, MN_{1,4}, que mostraram a formação de aglomerados a partir do décimo quarto dia. Dessa forma, um teste adicional de estabilidade a 5 °C foi realizado com as três formulações mais estáveis, visando verificar a influência da formação de uma monocamada completa de quitosana na estabilidade dos diferentes sistemas. Por meio desse teste verificou-se que a formulação com a formação de uma parede adicional de quitosana em monocamada foi capaz de permanecer estável por mais tempo (Fig. 5) em comparação à MN_{0,5} e MN_{1,4}, as quais apresentavam, respectivamente, uma monocamada incompleta e um excesso de quitosana adsorvido à superfície das partículas.

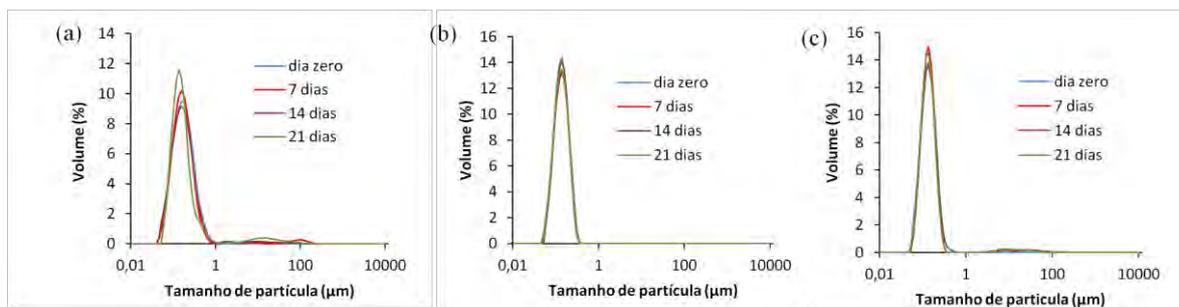


Fig 5. Perfis de distribuição de tamanho obtidos pela técnica de difração de laser. Em (a), MN_{0,5}; (b), MN_{0,7} e (c), MN_{1,4}.

Conclusão

A partir dos estudos de caracterização físico-química foi possível a determinação quantidade de lecitina de soja necessária para a formação de uma monocamada completa desse tensoativo em torno das nanocápsulas, de forma a obter uma estabilização mais efetiva das LNC e um sítio para interação iônica adequada para ligação com o polímero catiônico quitosana. Adicionalmente, por meio da ligação de diferentes concentrações de quitosana à superfície da LNC com concentração otimizada de Lipoid S75[®] foi determinado a concentração necessária para a formação de uma monocamada do polímero catiônico, obtendo-se, assim, um sistema com superfície mais homogênea e estável para futura aplicação na encapsulação de fármacos e, também, como sítio de ligação para espécie macromoleculares.

Agradecimentos

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FAURGS e INCT.

Referências

1. S. Dhar; F.X. Gu; R. Langer; O.C. Farokhzad; S.J. Lippard. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105, 17356-17361.
2. M.J. Alonso. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004, 58, 168–172.
3. S.R. Schaffazick; S.S. Guterres; L.L. Freitas; A.R. Pohlmann. *Quim. Nova* **26**, 2003, 726–737.
4. N.M. Siqueira; R.V. Contri; K. Pease; R.C.R. Beck; A.R. Pohlmann; S.S. Guterres. *Skin Pharmacology and Physiology*. DOI: 10.1159/000323273.
5. E.A. Bender; M.D. Adorne; L.M. Colomé; D.S.P. Ababdalla; S.S. Guterres; A.R. Pohlmann. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, 426, 271-279.
6. F. Reynaud; N. Tsapis; M. Deyme; T.G. Vasconcelos; C. Gueutin; S.S. Guterres; A.R. Pohlmann; E. Fattal. *Soft Matter*. 2011, 7, 7304-7312.
7. C. Prego; M. Fabre; D.Torres; M.J. Alonso. *Pharm. Res*. 2006, 23, 549–556.