



Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana contendo doxiciclina

Elina Sawa Akioka Ishikawa ¹, Renata de Carvalho Feitosa ¹, Laura Oliveira-Nascimento ¹
¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Latef), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A doxiciclina (DX) é um antimicrobiano sintético pertencente ao grupo das tetraciclinas de amplo espectro e capaz de impedir a nutrição, desenvolvimento e reprodução de bactérias. Esse fármaco é utilizado para diversas patologias, dentre elas a osteonecrose mandibular associada ao uso de medicamentos (MRONJ). Por outro lado, a doxiciclina apresenta algumas limitações, como o efeito de primeira passagem e degradação em meio ácido quando administrada por via oral. (AGUDELO, 2018). Por sua relevância e limitações, novas formas farmacêuticas vêm sendo exploradas, como a nanoencapsulação. As nanopartículas (NPs) à base de quitosana, em especial, são apropriadas para administração de fármacos através de membranas mucosas, devido à sua capacidade de mucoadesão, baixa toxicidade, alta permeabilidade e propriedades físicas ajustáveis. Desta forma, esse trabalho pretende desenvolver uma formulação de nanopartículas de quitosana contendo doxiciclina que possa otimizar entrega de fármacos por via bucal e que tenha potencial para ser utilizada na profilaxia da osteonecrose mandibular. (MOHAMMED, 2017; CRUCHO, 2017).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação do método de quantificação do fármaco

A quantificação da doxiciclina foi feita por espectrofotometria UV/visível (270nm, Multiskan Go - Thermo Scientific). Avaliou-se a linearidade, seletividade, exatidão, precisão e limite de detecção e limite de quantificação do método de acordo com as recomendações da RDC N° 166/ 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). O método foi linear no intervalo especificado (5 - 40 µg/mL), seletivo frente nanopartículas (NPs) de quitosana sem fármaco (brancas), foi exato, com taxa de recuperação de $100 \pm 3,2\%$ e foi preciso, com coeficiente de variação (CV) menor que 5% para todas as concentrações testadas. Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 0,98 µg/mL e 2,96 µg/mL, respectivamente.

3.2. Formulação e caracterização das NPs de quitosana

As NPs de quitosana foram fabricadas a partir do método de gelificação iônica, apresentando tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) satisfatórios (Tabela 1), mas eficiência de encapsulamento (EE) do fármaco baixa. Com o objetivo de aumentar a EE, foram utilizadas diversas estratégias: solubilizar a DX na solução de quitosana (CH), solubilizar a DX na solução de tripolifosfato de sódio (TPP), modificar a proporção fármaco/polímero e alterar o pH das soluções de quitosana e TPP.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das formulações de nanopartículas de quitosana.

Formu- lação	TPP: CH	Conc. final DX (mg/mL)	DX: CH	TP (nm)	IPD	PZ (mV)	EE (%)	pH final
NPB	1:3	-	-	134,7	0,218	+12,3	-	NR
NPDX 1	1:3	3,3	4:1	153,8	0,194	+23,0	0,2	NR
NPDX 2	1:3	1,9	2:1	190,7	0,314	+33,1	8,9	NR
NPB	1:3	-	-	215,8	0,271	+31,0	-	5,15
NPDX 3	1:3	0,25	1:4	207,0	0,265	+32,0	23,5	5,12
NPB	1:3	-	-	240,3	0,232	+23,5	-	5,42
NPDX 4	1:3	0,24	1:4	240,3	0,195	+24,1	8,96	5,48

TPP: tripolifosfato de sódio; CH: quitosana; DX: doxiciclina; TP: tamanho de partícula; IPD: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; EE: eficiência de encapsulamento; NPB: NP de quitosana vazia (branca); NPDX: NP de quitosana com doxiciclina; NR: análise não realizada. As amostras foram diluídas em água purificada (1:10). O correlograma de todas as análises se manteve entre 0,8 - 1.

Ao gotear a DX na solução de quitosana (anteriormente à adição do TPP), obteve-se uma baixa EE (NPDX 1 = 0,2%) pelo fato do grupo catiônico dimetilamônio ($pK_a= 9,5$) do fármaco estar ionizado positivamente em pH abaixo de 5,0 (figura 1), resultando em um efeito repulsivo para com a carga também positiva da quitosana. Por outro lado, ao gotear a DX no pH básico da solução de TPP (maior que 9,0), tal efeito repulsivo foi amenizado. Desta forma, obteve-se uma eficiência de encapsulação maior (NPDX 2 = 8,9%).

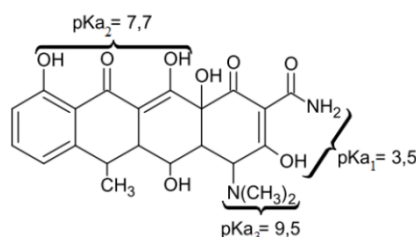


Figura 1 - Estrutura molecular da doxiciclina e seus pK_a s (adaptada de BORGHI, 2013).

Nos experimentos seguintes, buscou-se modificar a proporção DX:CH para aumentar a massa de quitosana disponível para formação das nanopartículas e encapsulamento do fármaco. Obteve-se como resultado uma EE de 23,5% (NPDX 3), corroborando com os estudos de SOBHANI et al (2017).

A modificação dos pHs das soluções (quitosana = 5,5 e TPP = 9,7), com o objetivo de possibilitar que a molécula do fármaco adquirisse carga total negativa e evitasse repulsão com a quitosana, obteve-se um baixo encapsulamento (NPDX 4 = 8,96%). É provável que a DX

que estava solubilizada na solução de TPP em pH básico (carga total negativa) tenha protonado novamente ao ser gotejada na solução de quitosana (pH mais ácido), gerando repulsão de carga.

3.3. Formulação e caracterização das NPs de alginato-quitosana

Uma vez que a EE das NPs de quitosana não foi satisfatória, buscou-se realizar um novo protocolo para formular NPs de alginato de sódio (SA) e quitosana. Já que o alginato é um polímero aniônico, considerou-se a possibilidade da carga catiônica da DX interagir com essa matriz, aumentando a EE. O método utilizado foi a gelificação iônica associada ao *crosslinking* policatiônico. Na primeira formulação (SACHDX 1) utilizou-se a proporção de 1:1 (DX:SA), obtendo-se 22,1% de EE. Em seguida, preparou-se uma formulação utilizando a proporção DX:SA de 1:2 (SACHDX 2) visando a diminuição da massa de fármaco em relação à massa de polímero. A EE aumentou para 26,6% (tabela 2). Os resultados de tamanho de partícula mostraram-se superiores a 400 nm, entretanto, entende-se que essa não é uma limitação para a formulação, uma vez que se almeja administração por via bucal.

Apesar de se encontrar eletricamente neutra no pH do experimento, a molécula de DX se apresenta na forma de *zwitterion*. Ou seja, ela possui um grupo ionizado positivamente e outro negativamente. Sendo assim, ainda existe uma certa repulsão de cargas entre as moléculas de fármaco e polímeros que compõem a matriz (quitosana e alginato), interferindo no encapsulamento.

Tabela 2. Propriedades físico-química das formulações de nanopartículas de alginato de sódio e quitosana.

Formulação	DX:SA	Conc. final DX (mg/mL)	TP (nm)	IPD	PZ (mV)	EE (%)	pH final
SACHB	-	-	565,4	0,315	-40,9	-	4,80
SACHDX 1	1:1	0,42	571,2	0,287	-41,3	22,1	4,77
SACHB	-	-	474,4	0,391	-44,3	-	4,83
SACHDX 2	1:2	0,25	403,5	0,270	-47,3	26,6	4,80

DX: doxiciclina; SA: alginato de sódio; TP: tamanho de partícula; IPD: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; EE: eficiência de encapsulamento; SACHB: NP de quitosana vazia (branca); SACHDX: NP de quitosana com doxiciclina. As amostras foram diluídas em água purificada (1:10). O correlograma de todas as análises se manteve entre 0,8 - 1.

3.4. Análise de ionização do fármaco

DX possui três grupos ionizáveis de distintos pKas (Figura 1): o grupo tricarbonilmetano ($pK_{a1} = 3,5$), a dicetona fenólica ($pK_{a2} = 7,7$) e o cátion dimetilamônio ($pK_{a3} = 9,5$). Foi conduzido então um estudo de análise de potencial zeta da DX em soluções aquosas de diferentes pHs (2,5; 5,0; 8,5 e 10,0) para avaliar seu estado iônico em cada situação. Constatou-se que em meio ácido a DX tende a estar em sua forma protonada; em pH neutro atinge sua forma de *zwitterion* e, em pH básico, tende a desprotonar (adquirindo carga total negativa). Os resultados que estão de acordo com o relatado por Jin *et al.* 2007. Esse comportamento da DX explica a dificuldade de encapsulamento em polímeros iônicos, a qual é justificada pela repulsão de cargas elétricas entre a molécula do fármaco e a matriz

polimérica. Como a molécula se encontra ionizada em toda a faixa de pH (de 0 a 14), é necessário mascarar, atenuar ou complexar essas cargas, de modo a permitir sua incorporação.

3. CONCLUSÃO

As nanopartículas de quitosana e alginato-quitosana contendo doxiciclina foram obtidas com sucesso, apresentando TP, IPD e PZ satisfatórios. No entanto, a maior EE foi de 23,5% para NPs de quitosana e 26,6% para NPs de alginato-quitosana. Diferentes estratégias foram implementadas a fim de aumentar a EE do fármaco. A partir da condução de um estudo que avaliou a ionização da molécula de DX em diferentes pHs foi possível constatar que ela se encontra ionizada em toda a faixa de pH (de 0 a 14). Por isso, provavelmente ocorre repulsão de cargas entre o fármaco e os polímeros utilizados para compor a matriz das NPs, interferindo negativamente no encapsulamento da DX. Estudos em andamento incluem a complexação de DX com HP-b-CD para posterior incorporação na NP de quitosana, visando mascarar a carga positiva da DX, evitar a repulsão com o polímero e aumentar a taxa de encapsulação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, R. R.; et al. Hybrid Nanofibers Based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite Nanoparticles-Loaded Doxycycline: Effective Anti-Tumoral and Antibacterial Activity. *Materials Science and Engineering: C*. Volume 83, 1 February 2018, Pages 25-34.

BORGHI, A. A. Degradação de Cloridrato de Doxiciclina pelo Processo Fenton Degradação de Cloridrato de Doxiciclina pelo Processo Fenton. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos. [s.l: s.n.].

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science & Engineering C*, v. 80, p. 771–784, 2017.

FIGUEIREDO, F. A. T. Estudo da ação da doxiciclina em diferentes modelos de osteopenia. Tese de doutorado - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017.

JIN, L. et al. Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophysical Chemistry*, v. 128, p. 185–196, 2007.

MOHAMMED, M. A. et al. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, v. 9, n. 4, 2017.

PERARO, C. R.; et al. Formation of β -Cyclodextrin inclusion compound with doxycycline: A theoretical approach. *Chemical Physics Letters*. Volume 692, 16 January 2018, Pages 140-145.

SOBHANI, Z.; et al. Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and antimicrobial activity. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017 Sep; 7(3): 427–432.

YADAV, M.; et al. Brain targeted oral delivery of doxycycline hydrochloride encapsulated Tween 80 coated chitosan nanoparticles against ketamine induced psychosis: behavioral, biochemical, neurochemical and histological alterations in mice. *Drug Delivery*, 24:1, 1429-1440, 2017, DOI: [10.1080/10717544.2017.1377315](https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1377315).