



Encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos em nanoestruturas do tipo polimerossomos

Mayra C.C. Câmara^{*}; Mariana A. Noronha, Natália A. D'Angelo,
André M. Lopes^{*}

^{*}Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (FCF/Unicamp), Campinas, SP, Brasil.

Resumo

O presente projeto de pesquisa pretende investigar e potencializar a ação de compostos por combinação de quimioterápicos (abordagem coterápica). Desse modo, nosso grupo estudou dois fármacos: (i) um modelo de amplo espectro para a terapia do câncer (Doxorrubicina – DOX) e (ii) uma promissora molécula empregada na terapia de melanoma (Vemurafenibe – VEM). Neste trabalho, nosso grupo estudou a implementação de um protocolo para a encapsulação dos fármacos em polimerossomos (Ps) compostos de poli(óxido de etileno-*b*- ϵ -caprolactona) (PEG₄₅PCL₄₄, PEG₁₁₄PCL₉₈ e PEG₁₁₄PCL₁₁₄). Nossos resultados mostraram que foi possível encapsular, individualmente, ambos os fármacos (taxa de encapsulação de 2,5 – 3,0% e 5,0 – 7,5% para DOX e VEM, respectivamente), e obter nanoestruturas vesiculares com diâmetro médio hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) de 215 – 226 nm e 0,100 – 0.150, respectivamente. Em termos gerais, o presente estudo é extremamente importante para o desenvolvimento de estratégias inovadoras que superem as limitações atuais (*i.e.*, administração de fármacos livres na corrente sanguínea – quimioterapia), constituindo-se em possível alternativa para a terapia do câncer.

Palavras-chave: Polimerossomos, Doxorrubicina e Vemurafenibe.



Introdução & objetivo da pesquisa

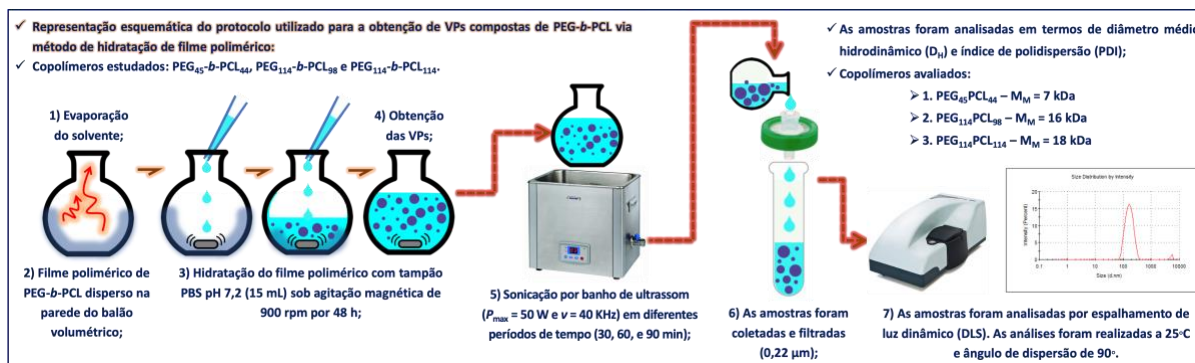
Especial atenção vem sendo dada às nanoestruturas do tipo polimerossomos (Ps). Os Ps são vesículas poliméricas de interior aquoso formadas por uma membrana (bicamada) de copolímeros anfifílicos. Os Ps são muito semelhantes (do ponto de vista estrutural) aos lipossomas. Assim como estes últimos, os Ps são formados por autoagregação, entretanto, enquanto os lipossomas são constituídos por fosfolídeos, os Ps são uma classe de vesículas compostas a partir de copolímeros anfifílicos em bloco (dibloco, tribloco, etc). Essa característica confere aos Ps inúmeras vantagens, quando comparados aos lipossomas, como, por exemplo, maior estabilidade (e, conseqüentemente, maior tempo de circulação), maior robustez e maior controle de tamanho, devido à possibilidade de se trabalhar com diferentes tamanhos de copolímeros anfifílicos. Outra propriedade importante refere-se à facilidade de controle de suas propriedades, como volume interior e espessura da membrana polimérica, o que permite a encapsulação de moléculas de tamanho considerável (e.g., biomoléculas). Além disso, devido sua estrutura, podem permitir a encapsulação de moléculas hidrofílicas (no interior aquoso) e/ou hidrofóbicas (na bicamada) (Pachioni-Vasconcelos et al., 2020). Por isso, estudos sobre a coencapsulação (ou coterapia) de fármacos em nanoestruturas tem apresentado resultados bastante promissores contra doenças crônicas (e.g., câncer), como efeito sinérgico e aumento da eficácia terapêutica (Yuan et al., 2016).

Resultados & discussão

Os dados apresentados aqui são considerados preliminares, uma vez que o presente projeto encontra-se em andamento. De forma geral, estudamos a encapsulação individual dos fármacos (Doxorrubicina – DOX e Vemurafenibe – VEM) em Ps compostos pelos copolímeros: PEG₄₅PCL₄₄, PEG₁₁₄PCL₉₈ e PEG₁₁₄PCL₁₁₄. O protocolo de encapsulação dos fármacos foi baseado exatamente conforme o Fluxograma 1, com as seguintes observações: os fármacos (10 mg), individualmente, foram solubilizados em clorofórmio (10 mL), juntamente com cada um dos copolímeros (5 mg), os passos seguintes do processo foram exatamente iguais aos destacados no Fluxograma 1 (sonicação por 30 min à 25°C).



Os dados obtidos para a encapsulação dos fármacos podem ser observados na Tabela 1.



Fluxograma 1. Esquema representativo resumido do protocolo, as etapas 1 à 7 foram empregadas para o desenvolvimento do protocolo de obtenção dos polimerossomos (copolímeros PEG₄₅PCL₄₄, PEG₁₁₄PCL₉₈ e PEG₁₁₄PCL₁₁₄).

Tabela 1. Parâmetros analisados para a encapsulação de Doxorrubicina e Vemurafenibe em polimerossomos compostos de PEG-*b*-PCL. d corresponde ao diâmetro médio hidrodinâmico (nm), PDI ao índice de polidispersão, ζ ao potencial zeta (mV) e %TE à taxa de encapsulação. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores médios calculados.

Doxorrubicina				
Copolímero	d (nm)	PDI	ζ (mV)	%TE
PEG ₄₅ PCL ₄₄	226	0,150	-18	2,5
PEG ₁₁₄ PCL ₉₈	217	0,110	-20	2,0
PEG ₁₁₄ PCL ₁₁₄	222	0,100	-21	3,0
Vemurafenibe				
PEG ₄₅ PCL ₄₄	220	0,120	-20	5,0
PEG ₁₁₄ PCL ₉₈	215	0,100	-20	5,8
PEG ₁₁₄ PCL ₁₁₄	216	0,130	-22	7,5

De acordo com os dados obtidos, tanto os valores para d , quanto para PDI, mostraram-se dentro do que foi previamente obtido nos ensaios de determinação dos Ps (fase inicial do projeto – dados não reportados). Os valores de potencial zeta (ζ), para os dois fármacos avaliados, em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2, mostraram valores próximos entre si, os valores variaram entre -18 à -22 mV, o que demonstra que, dentro das condições avaliadas, a encapsulação de ambos os fármacos não influenciou o valor de potencial ζ . Estes valores, podem ser considerados com moderada estabilidade para as formulações.

A taxa de encapsulação (%TE) foi calculada com base na seguinte equação (1):



$$\%TE = \left(\frac{m_{\text{fármaco}}}{m_{\text{copolímero}}} \right) * 100\%$$

Equação 1

onde, $m_{\text{fármaco}}$ e $m_{\text{copolímero}}$ correspondem à massa de fármaco (*i.e.*, DOX ou VEM) encapsulado nos Ps e à massa de copolímero empregado no processo de obtenção dos Ps, respectivamente. A quantificação da concentração de VEM e DOX foram realizadas utilizando leitor de microplacas, modelo Spectramax[®] Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), através de absorvância nos comprimentos de onda: 249 e 490 nm, respectivamente. Os valores de absorvância obtidos a partir das amostras analisadas foram correlacionados com as curvas de calibração, previamente obtidas para ambos os fármacos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO).

Para %TE, os valores obtidos foram relativamente baixos, variando de 2,0 – 3,0% para a DOX, entre os três copolímeros avaliados. Para o VEM, os valores de %TE foram um pouco superiores em relação aos obtidos com a DOX, variando de 5,0 – 7,5%, entre os três copolímeros avaliados. No entanto, merece destaque o valor de 7,5% para o copolímero PEG₁₁₄PCL₁₁₄, pois esse valor, apesar do desvio padrão, até o momento da redação deste resumo, não ter sido calculado, pode provavelmente, apresentar diferença estatística significativa entre os dados analisados. Uma provável explicação para esse valor é que este copolímero apresenta o maior bloco hidrofóbico (*i.e.*, PCL ~ 13.000 Da) e, conseqüentemente, a bicamada hidrofóbica do Ps formado por este copolímero deverá também ser maior e, portanto, poderá acomodar maior concentração de fármaco hidrofóbico (*i.e.*, VEM).

De acordo com Chen et al. (2010), estudando a encapsulação simultânea de dois fármacos (um hidrofóbico e um hidrofílico) em Ps de copolímeros dibloco (compostas por PEG-PTMBPEC), observaram que a %TE para o fármaco hidrofóbico avaliado (paclitaxel) variou de 3,0 – 7,5% e, para DOX, de 2,0 – 8,0%. O que demonstra que, apesar de baixos, os valores obtidos por nosso grupo estão muito próximos aos obtidos por outros grupos de pesquisa.

Conclusões parciais

Nossos dados (ainda que preliminares) mostram o quanto é desafiador o processo de encapsulação de fármacos em Ps. Os baixos valores de %TE obtidos

podem estar relacionados com o método de encapsulação empregado, ou então, com o processo de formação dos Ps em ambiente aquoso. Bleul et al. (2015) propuseram dois mecanismos para explicar a formação dos Ps. O primeiro sugere que ocorre o crescimento de micelas poliméricas em bicamadas, que por sua vez se auto-organizam em Ps; o outro mecanismo também se embasa no crescimento de micelas, entretanto acrescenta que ocorreria a difusão de solvente dentro destas micelas e, em seguida, a formação dos Ps. Dessa forma, tem sido considerado por alguns autores que micelas esféricas seriam nanoestruturas dos quais se formariam os demais tipos de agregados como: micelas cilíndricas; polimerossomos; entre outros (Mai e Eisenberg, 2012).

Tal observação reflete que se realmente esse é o caso, uma possível hipótese pode ser considerada, isto é, se as primeiras nanoestruturas formadas em ambiente aquoso são micelas, possuem núcleo hidrofóbico, e, portanto, fármacos mais hidrofílicos, como é o caso da DOX teriam menor probabilidade de serem encapsuladas no interior aquoso quando da formação (posterior) de Ps. Por outro lado, moléculas de caráter hidrofóbico (*i.e.*, VEM) poderiam ter maior probabilidade de serem encapsuladas quando da formação de Ps (*i.e.*, encapsulação do fármaco na bicamada), em termos de valores, nossos resultados parecem mostrar esse comportamento (maiores valores de %TE para VEM do que para DOX).

Os estudos de encapsulação simultânea de ambos fármacos estão em andamento, e, futuramente, serão apresentados por nosso grupo de pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP e CNPq por meio dos seguintes processos: #2017/10789-1; #2018/10799-0; #2019/08549-8; #2020/03727-2 e PIBIC #123483/2020-4, respectivamente.

Referências

- Bleul, R., Thiermann, R., Maskos, M. Techniques to control polymersome size. *Macromolecules*, 48 (20), 7396-409, 2015.
- Mai, Y., Eisenberg, A. Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, 41 (2011), 5969, 2012.
- Pachioni-Vasconcelos, J.D.A., Apolinário, A.C., Lopes, A.M., Pessoa Jr, A., Barbosa, L.R.S., Rangel-Yagui, C.O. Compartmentalization of therapeutic proteins into semi-crystalline PEG-PCL polymersomes. *Soft Materials*, 1-9, 2020.
- Yuan, M., Qiu, Y., Zhang, L., Gao, H., He, Q. Targeted delivery of transferrin and TAT co-modified liposomes encapsulating both paclitaxel and doxorubicin for melanoma. *Drug Delivery*, 23 (4), 1171-1183, 2016.