

Nanopartículas líquido-cristalinas responsivas para liberação controlada de fármacos

Palavras-chave: Fase líquido-cristalina, sistema responsivo, liberação de fármacos

Gabriel Vinicius Zamuner de Oliveira FCF - UNICAMP

Prof. Dr. Watson Loh IQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO

Moléculas anfifílicas, ou seja, que possuem uma cauda apolar e uma cabeça polar têm a capacidade formar sistemas de fases líquido-cristalinas, que dispersas em meio aquoso, estão sendo cada vez mais estudadas como plataforma para liberação de fármacos. **(Lee, K. et al.)** Os surfactantes são os principais constituintes desses sistemas e dependendo da natureza deste, podem apresentar fases lamelar, micelar, cúbica bicontínua, hexagonal, normais ou reversas **(Mezzenga, R et al.)**. Sendo as últimas, as mais recorrentes em estudos com fins biológicos, seja para liberação controlada de fármacos ou aplicação tópica **(Yaghmur, A. et al.)**.

As principais moléculas estudadas para formação dessas estrutura são a monoleína e o fitantriol. A primeira já possui muitas informações na literatura sobre a formação de nanopartículas líquido-cristalina, porém possui um grupo éster que acaba por limitar as aplicações de liberação controlada. Já o fitantriol **(Fig. 1)** não possui o grupo éster, sendo, portanto, mais resistente à ação de enzimas hidrolíticas e da variação de pH.

Em uma ampla faixa de concentrações, o fitantriol forma fases cúbicas bicontínuas reversas, o que torna interessante o uso para aplicações biológicas, e as dispersões destas fases são comumente chamadas de cubossomas. Um estudo recente **(Bessone, C. et al.)** demonstrou que cubossomas carregados com Latanoprost apresentaram um perfil de liberação mais longo e sustentado que o fármaco comercial Louten®. Além disso, as fases cúbicas bicontínuas vêm sendo estudadas para liberação de fármacos tanto apolares quanto polares.

Quando comparamos a liberação de fármacos hidrofílicos, por exemplo, podemos notar uma diferença na taxa de liberação entre as fases cúbica bicontínua e hexagonal, o que abre caminho para estudos de transição de fase acionada por gatilhos como temperatura, pH e enzimas **(Bisset, N. et al.)**.

O uso do pH como gatilho para transição de fase é um dos principais parâmetros estudados, já que ao longo do organismo humano, vemos regiões com diferentes faixas de pH, o que torna interessante do ponto de vista de liberação controlada de fármacos **(Negrini, R. et al.)**. Além de, em certas doenças, como no caso do câncer, haver uma diferenciação no pH em relação as células normais, o que pode ser útil também no caso de terapias mais direcionadas, que contribuem para a diminuição dos efeitos colaterais.

Portanto, sistemas de nanopartículas biorresponsivas, pode ser de grande interesse para fins biológicos, tanto num melhor direcionamento da terapia quanto no caso de liberação controlada de fármacos.

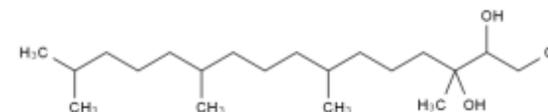


Figura 1. Estrutura química do fitantriol.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Este projeto tem por objetivo avançar na avaliação de gatilhos e seu impacto na liberação controlada de fármacos por sistemas nanoestruturados. Para isto, os objetivos foram:

- sintetizar um pro-fármaco (lauril-diclofenaco) contendo um éster clivável (usando procedimentos já descritos na literatura) e adquirir comercialmente (da empresa Sigma-Merck) os outros dois pro-fármacos (ascorbil-palmitato, lauril-galato), totalizando três sistemas diferentes. (Fig. 2)
- preparar nanopartículas constituídas por fitantriol, um pró-fármaco e estabilizante.
- avaliar a capacidade de resposta desses sistemas utilizando diferentes pHs

METODOLOGIA

Síntese e caracterização das nanopartículas

Os cubossomas foram preparados a partir do método Top-Down (Fig. 3), este utiliza altas energias para dispersão e formação das estrutura líquido-cristalina. O fitantriol foi pesado (200mg) e fundido à 40°C juntamente com um dos pro-fármacos (Fig. 2), então foi adicionado 1,2mL de F127 em solução estoque (5%) em PBS e volume final de 10mL completado com PBS, em seguida foi homogeneizada utilizando SONICS Vibracell VCX 130 (Sonics & Materials Inc., USA) em amplitude de 40% durante 30 minutos (em ciclos de 15s on e 3s off).

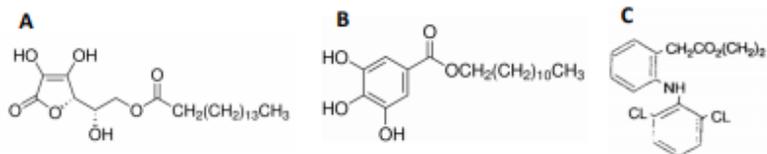


Figura 2. Estrutura dos pró-fármacos. A) Ascorbil-Palmitato; B) Lauril-Galato; C) Lauril-Diclofenaco

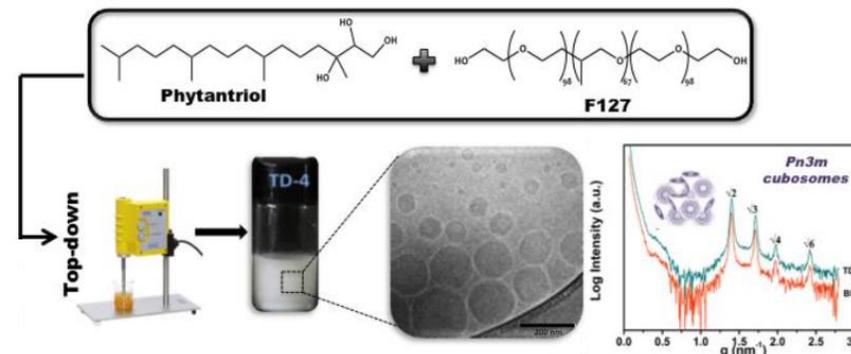


Figura 3. Esquema do método Top-Down. Adaptado de Akhlaghi, S. P.; Ribeiro, I. R.; Boyd, B. J.; Loh, W., Colloids Surf B, 2016.

Para caracterização da estabilidade e tamanho das nanopartículas, foi utilizado a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com equipamento ZetasizerNano (Zs-Zen3600, Marlvern® - Reino Unido), ângulo de detecção de 173° e modo automático. Para cada amostra, foi medido o diâmetro hidrodinâmico a 37°C, em triplicata.

Síntese e caracterização do pró-fármaco

O diclofenaco de sódio (3g) foi suspenso em 10mL DMF seco e reagido com bromoalquil (1-bromo-dodecano) (1.3g, 0.01mol) sob agitação mecânica por 24 horas à temperatura ambiente. Etil-acetato (30mL) foi adicionado para retirada de impurezas sólidas. A solução foi lavada com 60mL de solução aquosa saturada com NaCl, seca com MgSO₄ anidro e filtrada. O solvente, então foi evaporado à vácuo. Para caracterização dos produtos obtidos na síntese foi empregado a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H).

Ensaio de liberação

Para realização dos ensaios de liberação, foram preparados tampões referentes aos diferentes pHs encontrados no corpo humano para avaliar a hidrólise do pro-drug em diferentes faixas de pH.

As amostras com pró-fármaco foram colocadas em cada um dos tampões utilizando membranas de diálise para coletar somente os produtos de hidrólise, que no caso, seriam o ativos. Todas amostras ficaram sob agitação e temperatura constante de 37°C.

Alíquotas de cada amostra foram coletadas algumas vezes e analisadas posteriormente por HPLC.

RESULTADOS

Caracterização das nanopartículas

Ao longo do projeto foram preparadas nanopartículas com diversas concentrações de pró-fármaco em relação ao fitantriol, desde 1% a 20% (m/m). Porém, de acordo com estudos prévios (Fig. 4) e artigos de apoio (Tran, N. et al.), observamos que seria interessante se concentrar na região de 4% de pró-fármaco em relação ao fitantriol.

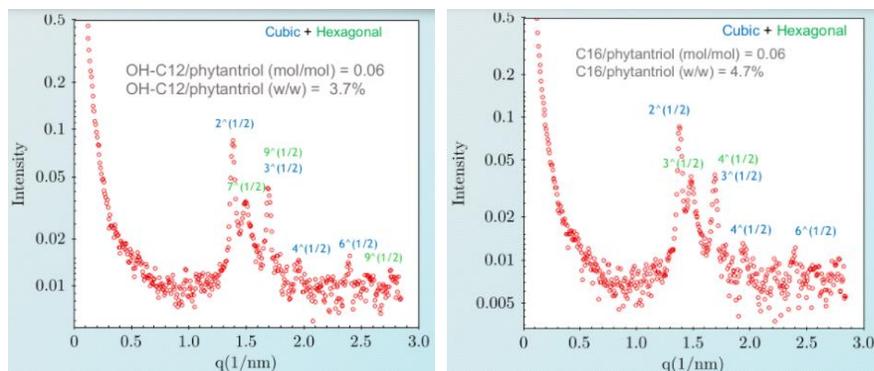


Figura 4. Dados de SAXS da nanopartícula composta por 1-Dodecanol e Ácido Palmítico, respectivamente.

Como podemos observar, a estrutura das nanopartículas após hidrólise dos ativos, nessa faixa de concentração de 4% em relação ao fitantriol, teríamos uma estrutura líquido-cristalina numa mistura entre a fase cúbica bicontínua e hexagonal. Por isso, a escolha de trabalhar nessas concentrações.

Na figura abaixo, podemos ver um exemplo da distribuição da nanopartícula de fitantriol com a adição do lauril galato:

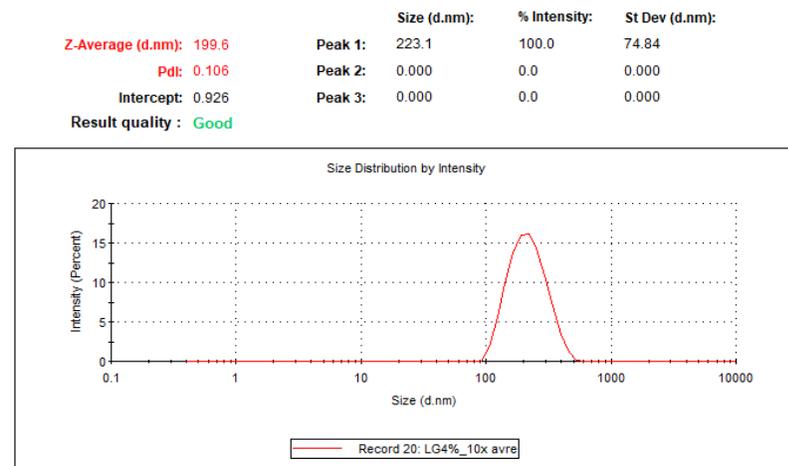


Figura 5. Distribuição do tamanho das partículas por intensidade

Com um tamanho médio de aproximadamente 200nm, o que é compatível com os trabalhos já publicados sobre cubossomas, podemos inferir que temos a formação de uma estrutura líquido-cristalina, mas que só poderia ser elucidada com o auxílio de SAXS (que não foi possível ainda, devido a situação da pandemia).

Na tabela abaixo, podemos ver o tamanho médio das partículas compostas pelo fitantriol e os pró-fármacos comerciais que havíamos propostos (Lauril Galato e Ascorbil Palmitato). Também foi medido o tamanho das nanopartículas simulando que houvesse 100% de hidrólise dos pró-fármacos, com isso teríamos o 1-Dodecanol e o Ácido palmítico, respectivamente.

Composição	Diâmetro (média)	PDI
Fitantriol + Lauril Galato	199.6	0.098
Fitantriol + Ascorbil Palmitato	203.6	0.113
Fitantriol + 1-Dodecanol	216.3	0.132
Fitantriol + Ácido palmítico	226.1	0.17

Tabela 1. Distribuição do tamanho de acordo com a composição da nanopartícula

Caracterização do pró-fármaco

A síntese de pró-fármaco foi feita utilizando o bromohexadecanol ao invés do bromododecanol proposto, porém os resultados foram satisfatórios, a partir do espectro de RMN abaixo, pudemos confirmar a formação do pró-fármaco, a partir da formação de um éster.

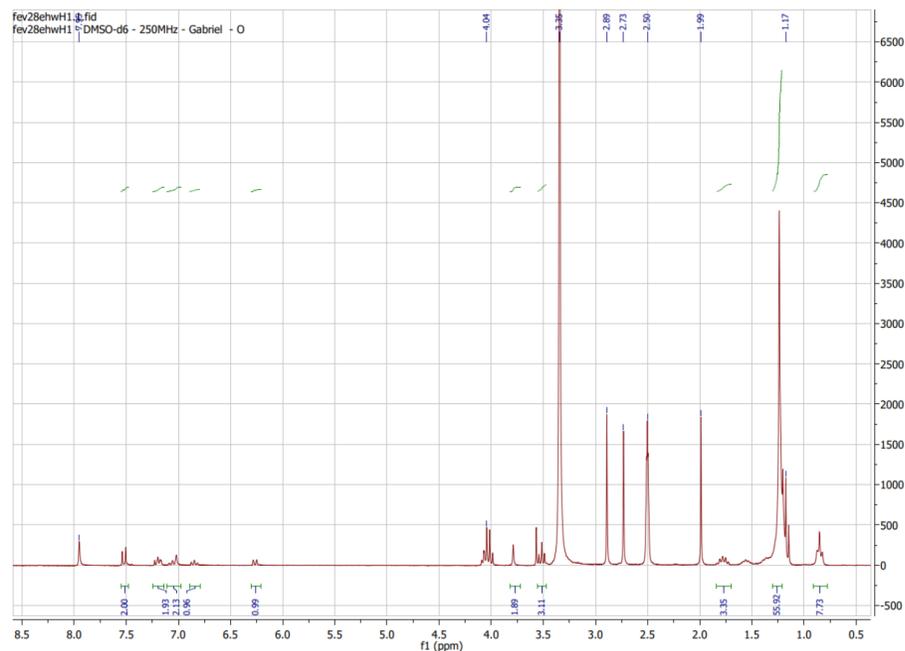


Figura 6. Espectro de RMN 1H do palmitato de diclofenaco.

No espectro de RMN podemos observar os picos dos resíduos dos solventes utilizados, entre eles, DMSO (2,5ppm), água (3,35ppm), acetato de etila (1,99 e 4,04ppm) e DMF (7,9ppm), além disso podemos observar que houve formação do pró-fármaco como era esperado e resíduos dos reagentes (diclofenaco de sódio e bromohexadecanol), os picos referentes aos hidrogênios aromáticos do diclofenaco estão entre 6 e 7,5ppm, já os picos referente a cadeia alquílica estão entre 0,7 e 1,25ppm e os picos entre 3,5 e 3,75 são referentes aos hidrogênios próximo a carbonila.

Ensaio de liberação

Algumas tentativas de liberação foram realizadas, porém, até o momento, não foi possível otimizar as condições de pH para induzir a hidrólise, condições estas que continuam em investigação. Com isso, está sendo considerado o uso de enzimas para a hidrólise

CONCLUSÕES

Devido a pandemia da COVID-19, não foi possível a execução de alguns experimentos e análises, que dependiam de laboratórios externos, como o uso de SAXS e os ensaios de liberação com enzimas. Porém, o tempo restante que foi possível para idas ao laboratório foram de extrema importância para aprendizado e desenvolvimento próprio.

Além disso, foi possível realizar a síntese do pró-fármaco com êxito, porém utilizando o ácido graxo de 16 carbonos (bromohexadecanol)

A síntese das nanopartículas puderam ser executadas, e na medida possível das análises, pudemos inferir, baseado na literatura já existente, que foram formadas estruturas líquido-cristalinas, com tamanho médio de 200 nanômetros.

Com a readequação do cronograma em fevereiro de 2021, os ensaios com enzimas haviam sido excluídos por conta do menor tempo disponível para realização do projeto, porém com a dificuldade em otimizar as condições para liberação e hidrólise a partir do pH, apenas, está sendo considerado o uso de enzimas para a hidrólise.

BIBLIOGRAFIA

1. Lee, K. W. Y.; Nguyen, T.-H.; Hanley, T.; Boyd, B. J., Nanostructure of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *365* (1), 190-199.
2. Mezzenga, R.; Seddon, J. M.; Drummond, C. J.; Boyd, B. J.; Schröder-Turk, G. E.; Sagalowicz, L., Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. *Advanced Materials* **2019**, *31* (35), 1900818
3. Yagmur, A.; Glatter, O., Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *147-148*, 333-342.
3. Bessone, C. D. V.; Akhlaghi, S. P.; Tártara, L. I.; Quinteros, D. A.; Loh, W.; Allemandi, D. A., Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *160*, 105748.
4. Bisset, N. B.; Boyd, B. J.; Dong, Y.-D., Tailoring liquid crystalline lipid nanomaterials for controlled release of macromolecules. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *495* (1), 241-248.
5. Negrini, R.; Mezzenga, R., pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. *Langmuir* **2011**, *27* (9), 5296-5303.
6. Akhlaghi, S. P.; Ribeiro, I. R.; Boyd, B. J.; Loh, W., Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriol-Pluronic® F127 cubosomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *145*, 845-853.
7. Tran, N.; Mulet, X.; Hawley, A. M.; Fong, C.; Zhai, J.; Le, T. C.; Ratcliffe, J.; Drummond, C. J., Manipulating the Ordered Nanostructure of Self-Assembled Monoolein and Phytantriol Nanoparticles with Unsaturated Fatty Acids. *Langmuir* **2018**, *34* (8), 2764-2773.