

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CATIÔNICAS PARA USO TÓPICO

Lorena MAIONE-SILVA¹, Kamilla Amaral David ROCHA¹, Stephânia Fleury TAVEIRA¹, Eliana Martins LIMA¹

¹Faculdade de Farmácia – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO - Brasil.

(lorenamaione@hotmail.com)

Palavras-chave: genisteína, cloreto de cetilperidínio, citotoxicidade, pele.

1. Introdução

A genisteína (GEN), uma isoflavona encontrada em abundância na soja, possui ação antitumoral e quimioprotetora (Banerjee et al, 2008) interessante para administração tópica. Porém sua instabilidade química não favorece sua aplicação tópica. Desta forma, a obtenção de nanopartículas catiônicas parece ser uma alternativa viável para administração tópica deste fármaco, visto que nanopartículas carregadas positivamente podem apresentar maior interação com a pele (Taveira et al., 2009).

Nanopartículas com superfície com carga positiva podem ser obtidas pela adição de tensoativos catiônicos à formulação (Vighi et al, 2010). Entre as opções de co-tensoativos disponíveis está o cloreto de cetilperidínio (CPC), o brometo de tetradeciltrimetilamônio (CTAB), o brometo de dimetiloctadecilamônio (DDAB), esterquat 1 (EQ 1), entre outros. Dentre as opções disponíveis o CPC é o mais empregado, porém, apresenta toxicidade considerável (Tabatt et al, 2004). Assim, formulações que contêm CPC devem ter o seu perfil citotóxico avaliado.

O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas catiônicas, para uso tópico, contendo diferentes quantidades de CPC, assim como avaliar o perfil de citotoxicidade destas formulações frente à linhagem celular de câncer de pele.

2. Materiais e métodos

2.1 Preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As nanopartículas brancas foram produzidas pela técnica de diluição de microemulsão. Primeiramente, compritol[®] (2%), tensoativos (1%, sendo a relação

entre Tween80/Span 85 de 7:3) foram aquecidos a 80°C. Em seguida o tensoativo catiônico foi adicionado (0,05 – 0,5%). 250 µL de água a 80°C também foi adicionada para formação da microemulsão. A microemulsão foi gotejada em água gelada (4°C) (na proporção 1:20) totalizando aproximadamente 20 mL de formulação. Homogeneizou-se em ultra-turrax a 14000 rpm por 10 minutos. Por fim, as formulações foram submetidas à ultrassom de agulha por 10 minutos. As formulações contendo NLS carregadas com fármaco foram preparadas com a adição de 8% de fármaco em relação à quantidade total de lipídeos adicionado a formulação. O fármaco foi adicionado na microemulsão antes do gotejamento em água gelada.

2.2 Caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas desenvolvidas

2.2.1 Avaliação do tamanho, Pdl e potencial zeta

A caracterização das nanopartículas obtidas em relação ao tamanho e índice de polidispersividade (Pdl) foi realizada em equipamento ZetaSiser Nano-S pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. A determinação do potencial zeta foi realizada em equipamento ZetaSizer Nano ZS pela medida da velocidade de migração eletroforética das partículas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2 Avaliação da eficiência de encapsulação, carga de fármaco e recuperação

A Eficiência de Encapsulação (EE%) foi avaliada através da diferença entre fármaco total (FT) e fármaco livre (FL) em relação à quantidade de fármaco total, conforme a Equação I.

$$EE\% = \frac{FT - FL}{FT} \times 100 \quad \text{Equação I}$$

Para determinação do fármaco total na formulação, isto é, fármaco livre e fármaco encapsulado, as nanopartículas foram rompidas com o uso de metanol, agitadas em vórtex por 2 minutos, filtradas e analisadas por espectroscopia.

A determinação do fármaco livre foi realizada a partir de ultrafiltração. Para tanto, foi utilizado o sistema de ultrafiltração VivaSpin, composto por dois compartimentos separados por uma membrana de 10.000 Da. Uma amostra de 1 ml foi adicionada no compartimento superior. O dispositivo foi submetido à centrifugação (25°C; 4000G) por 20 minutos. A solução obtida no compartimento inferior, correspondente ao fármaco livre, foi diluída e quantificada.

A carga de fármaco foi determinada através da diferença entre fármaco total (FT) e fármaco livre (FL) em relação à massa de lipídeos (ML) adicionada à formulação, conforme a Equação II.

$$CF\% = \frac{FT-FL}{ML} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

Para determinar a recuperação de fármaco foi calculada a relação entre fármaco total (FT) e fármaco adicionado (FA), de acordo com a Equação III.

$$REC\% = \frac{FT}{FA} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

2.3 Avaliação da citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em linhagem celular de melanoma B16F10, obtida da ATCC (American Type Culture Collection, EUA). As culturas celulares foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolium), realizado em placas de 96 poços. Em cada poço foram adicionadas 1 x 10⁵ células, sob as quais foram colocadas as formulações testadas. As placas foram lidas em espectrofotômetro (ELISA). Os testes foram realizados em triplicata.

3. Resultados e discussão

Estudos preliminares foram realizados para avaliar a influência no tamanho médio e índice de polidispersividade (Pdl) das partículas com e sem utilização do ultrassom de agulha. Observou-se que as partículas obtidas sem o ultrassom de agulha apresentaram tamanho médio de 601 nm (± 46,13) e Pdl de 0,507 (± 0,07), enquanto que aquelas obtidas com sonicação de 10 minutos em ultrassom de agulha apresentaram tamanho de 328 nm (± 36,63) e Pdl de 0,243 (± 0,03). Desta forma, todas as partículas obtidas a partir destes estudos foram submetidas ao processo de sonicação.

A Tabela 1 contém os resultados obtidos a partir da caracterização das nanopartículas com diferentes quantidades de CPC. É possível observar na Tabela 1 que o tamanho e Pdl das nanopartículas se manteve semelhante em todas as formulações. Como era esperado, o valor do potencial zeta diminui à medida que a quantidade de CPC diminui, visto que, devido a sua natureza catiônica, o CPC é o responsável por dar carga positiva à superfície das partículas.

Tabela 1. Tamanho e Pdl das formulações após serem sonicadas

Quantidade de CPC nas NLS (%)	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
0,050	328 ± 36,63	0,243 ± 0,03	29,18 ± 2,77
0,125	337 ± 12,94	0,244 ± 0,01	27,13 ± 0,49
0,250	341 ± 17,11	0,256 ± 0,02	24,55 ± 0,50
0,500	326 ± 14,28	0,232 ± 0,01	22,33 ± 0,52

A citotoxicidade das formulações foi avaliada em cultura de células tumorais (Figura 1). É possível observar que formulações com 0,05 a 0,25% de CPC apresentaram altos valores de toxicidade em cultura de células tumorais, enquanto que a formulação com 0,05% não apresentou citotoxicidade significativa. Outros estudos devem ser realizados a fim de verificar a toxicidade destas formulações através de testes de irritação cutânea, visto que no estudo de citotoxicidade as formulações são colocadas em contato direto com a cultura de células tumorais.

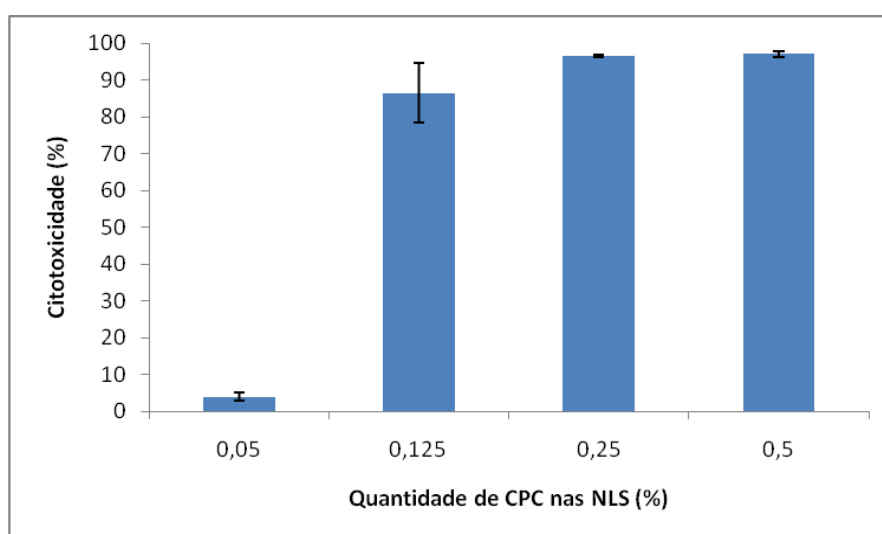


Figura 1. Perfil citotóxico de formulações contendo concentrações crescentes de CPC.

A formulação com 0,05% de CPC foi obtida com o fármaco, genisteína (GEN). A formulação obtida foi caracterizada conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Formulação contendo fármaco com ação antitumoral

Tamanho médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	EE%	REC%	CF%
326,64	0,274	23,01	99,78	6,07	76,06
(± 23,83)	(± 0,02)	(± 2,77)	(± 0,08)	(± 0,65)	(± 8,09)

A formulação contendo GEN apresentou tamanho médio e Pdl semelhantes as partículas sem fármaco, além disso, apresentou alta eficiência de encapsulação e alta carga de fármaco, e portanto, parece ser uma formulação promissora para o tratamento de malignidades cutâneas.

4. Conclusões

A sonicação durante o preparo de formulações de NLS mostrou-se capaz para diminuir o tamanho e o Pdl das partículas. A formulação com 0,05% de CPC não apresentou citotoxicidade contra a linhagem celular testada e mostrou-se eficiente para encapsulação do fármaco antineoplásico genisteína.

Referências Bibliográficas

Banerjee, S. et al. Multi-targeted therapy of cancer by Genistein. *Cancer Letters*, v. 269, p. 226–242, 2008.

Tabatt, K. et al. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 155–162, 2004.

Taveira, S. F., Nomizo, A., Lopez, R. F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. *J. Control Release*, v.134, n.1, p. 35-40, 2009.

Vighi, E. et al. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 389, p. 254–261, 2010.

Agradecimentos

Os autores agradecem o CNPq, CAPES e FAPEG pelo apoio financeiro.