

Estudo da Estabilidade de Nanocápsulas Contendo Lupeol.

Diana de Lima Borges², Danielle Guimarães Almeida Diniz¹

Faculdade de Farmácia - UFG, CEP: 74605-220, Brasil

dianalimaborges@gmail.com; dgadiniz@gmail.com

1. Introdução

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) /OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos e, o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. Neste cenário, torna-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle de câncer (BRASIL, 2009).

A administração parenteral de agentes quimioterápicos é o fundamento da terapia convencional do câncer, entretanto, vários fármacos são hidrofóbicos e requerem um sistema solubilizante ou carreador. Tais sistemas devem carregar e reter de forma estável o fármaco neles incluído e ainda apresentar mecanismo de liberação deste fármaco para as células alvo (LUO *et al.*, 2000; VINCENTAND & DUNCAN, 2006).

O desenvolvimento de nanopartículas como sistema transportador de fármacos surgiu em resposta às necessidades terapêuticas de diminuir a toxicidade, o dano tecidual, a resistência aos fármacos e outros efeitos colaterais indesejados provocados em tratamentos como do câncer (BRIGGER *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2007). As nanopartículas possuem propriedades únicas, como o tamanho, área de superfície de contato, propriedades magnéticas e ópticas, que conferem estabilidade adequada, absorção melhorada, liberação controlada do fármaco e, portanto, uma otimização da atividade farmacodinâmica dessas partículas (RABINOW & CHAUBAL, 2006; KHOEE & YAGHOBIAN, 2009).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares com uma cavidade central ou núcleo, preenchido por um meio oleoso onde o fármaco é armazenado. O núcleo é envolto por uma membrana polimérica, a qual se podem associar anticorpos ou outras partículas ligantes que aumentam a especificidade das nanocápsulas (HALEY & FRENKEL, 2008).

Revisado pelo Orientador.

¹Orientadora

²Orientanda

As moléculas bioativas oriundas de plantas medicinais têm sido opções alternativas aos tratamentos convencionais de muitas doenças, inclusive o câncer, e devido a sua enorme biodiversidade, o Brasil apresenta grande potencial de contribuir para a busca de novos produtos (SUNITHA *et al.*, 2001; YAMASHITA *et al.*, 2002).

Os triterpenos são componentes naturais da dieta humana, sendo encontrados em óleos vegetais, frutas, cereais e plantas medicinais. Devido sua ampla atividade farmacológica são compostos cada vez mais estudados (GALLO & SARACHINE 2009; SALEEM, 2009).

O lupeol é um composto triterpênico pentacíclico, isolado de diversas espécies, como da sucupira branca, *Pterodon emarginatus*, árvore símbolo do cerrado goiano. Esta molécula exibe atividade antiinflamatória, antioxidante, antiartítica, anti-diabética, cardioprotetora, antiproliferativa, quimioprotetora e citoprotetora (SUNITHA *et al.*, 2001; YAMASHITA *et al.*, 2002; SIDDIQUE & SALEEM, 2011).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a estabilidade físico-química de nanocápsulas de PLGA contendo lupeol.

3. Metodologia

3.1. Preparo das Nanocápsulas

As nanocápsulas contendo lupeol foram obtidas segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores (1989). Uma preparação oleosa (fase orgânica), diluída em acetona, constituída de PLGA (85/15), fosfolípido de soja, óleo de soja ou miglyol 812 e do lupeol, foi introduzida lentamente em uma solução aquosa (fase aquosa), previamente preparada, constituída de tampão fosfato pH 7,4 e de dois surfactantes hidrofílicos (Lutrol F68 – poloxamer 188 Basf e Pluronic F127 Sigma) e, mantida sob agitação moderada antes e depois da adição da fase orgânica. A nanoemulsão formada, imediatamente após a mistura, permanece sob agitação magnética por um período de 30 minutos e é então rotaevaporada, até retirada completa do solvente orgânico e concentração da dispersão. Após a rotaevaporação obtém-se aproximadamente 10 mL de uma dispersão de nanocápsulas.

3.2. Caracterização das nanocápsulas

O tamanho e o índice de polidispersão (PDI) das nanocápsulas foram mensurados no equipamento Malvern Zetasizer nano-S. Para realização das medidas a dispersão de NC foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em água deionizada. Também foi medido o pH da dispersão em potenciômetro digital (PG 1800 – Gehaka ®), para acompanhamento indireto da degradação polimérica. Na análise do potencial zeta a formulação foi diluída na proporção de 1:150 (v/v) em água mili-Q e a medida foi realizada no equipamento Zetaplus (Brookhaven ®).

3.3. Método Cromatográfico

Para o método CLAE, desenvolvido e validado, foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo Varian ® Pro Star acoplado com Detector UV-Visível (Pro Star 310); e os dados processados pelo programa Galaxie – versão 1.9. As condições cromatográficas do método foram: comprimento de onda de 210 nm, coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 com dimensões 250 mm x 4.6 mm x 5µm, mantida sob temperatura de 40°C. Fase móvel com fluxo de 1,2 mL/min constituída de Acetonitrila: Metanol acidificado 0,1% com ácido acético, na proporção 95:5.

3.4. Análise da Eficiência de Encapsulação das Formulações

Na avaliação da eficiência de encapsulação separou-se o lupeol livre do encapsulado através de filtração (filtro 0,45 µm). Após separação as NC foram rompidas com etanol, na proporção de 1:8, a dispersão foi submetida à agitação no vortex por 1 minuto, e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e este foi quantificado por CLAE para determinação da eficiência de encapsulação (EE). A quantidade de lupeol encapsulado foi determinada através da quantificação do total de ativo na formulação e do encapsulado. A EE foi calculada pela fórmula(1):

$$EE = \frac{LE}{LT} \times 100 \quad (1)$$

Sendo,

LE: quantidade de lupeol encapsulado;

LT: quantidade total de lupeol na formulação.

3.5. Estabilidade Físico-Química da Formulação

As formulações foram mantidas a 4°C em frasco âmbar e avaliadas nos tempos 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias em relação ao pH, tamanho das nanocápsulas (no equipamento Malvern Zetasizer nano-S), índice de polidispersão (PDI) (no equipamento Malvern Zetasizer nano-S), eficiência de encapsulação e potencial zeta (no equipamento Zeta Potential Analyzer Plus). A avaliação macroscópica foi realizada acompanhando visualmente as amostras armazenadas.

4. Resultados

Foram desenvolvidas duas formulações de nanocápsulas com o intuito de chegar a uma formulação com tamanho, eficiência de encapsulação e estabilidade ideal. A principal variação da formulação foi o tipo e a concentração de óleo utilizado como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Formulações das nanocápsulas e suas principais características.

Formulação	Quantidade de óleo	Quantidade de Lupeol	Tamanho	PDI	Eficiência de Encapsulação
NS 1	1,25%	0,05%	210 nm	0,16	97%
NS 2	1,25%	0,07%	210 nm	0,18	98%
NS 3	1,50%	0,10%	256 nm	0,27	97%
NS 4	1,50%	0,11%	320 nm	0,46	97%
NM 1	1,50%	0,08%	190 nm	0,17	100%
NM 2	1,50%	0,09%	190 nm	0,20	91%
NM 3	1,75%	0,13%	188 nm	0,15	100%

* NS: Nanocápsulas com óleo de soja

* NM: Nanocápsulas com miglyol 812 (NM)

Após análise dos resultados obtidos em relação a eficiência de encapsulação e distribuição de tamanho, para o ensaio de estabilidade a formulação de escolha foi aquela que apresentou frente ao aumento da quantidade de ativo incorporado, menor distribuição de tamanho e maior eficiência de encapsulação do ativo. Os resultados do ensaio de estabilidade da NM 3 estão demonstrados na Tabela 2:

Tabela 2: Ensaio de estabilidade da NM 3.

Tempo	Tamanho (nm)	PDI	pH
Dia 0	175	0,15	7,21
Dia 1	175	0,12	7,21
Dia 5	175	0,12	7,18
Dia 10	177	0,10	7,18
Dia 15	176,2	0,14	7,18
Dia 20	174,5	0,15	7,14
Dia 30	175,4	0,15	7,06
Dia 45	174,1	0,15	7,03
Dia 60	174,2	0,15	7,05
Média	175,1	0,14	7,14
Desvio Padrão	0,94	0,02	0,07

Para avaliar a influencia do fármaco na estabilidade da formulação, uma formulação de nanocápsulas composta por miglyol 812 e sem o ativo, foi avaliada sob os mesmos critérios de estabilidade adotados para as nanocápsulas contendo o ativo, os resultados são apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Ensaio de estabilidade das nanocápsulas brancas (NB).

Tempo	Tamanho (nm)	PDI	pH
Dia 0	200,9	0,20	7,24
Dia 1	187,1	0,10	7,18
Dia 5	184,9	0,14	7,3
Dia 10	184,3	0,13	7,24
Dia 15	184,2	0,15	7,17
Dia 20	184,8	0,11	7,16
Dia 30	184,1	0,15	7,24
Dia 45	184,6	0,13	7,21
Dia 60	195,6	0,11	7,22
Média	187,8	0,13	7,21
Desvio Padrão	6,1	0,03	0,04

É possível notar pelos resultados apresentados pelas tabelas 2 e 3, e pela figura 1, que tanto as nanocápsulas com lupeol quanto as brancas, ambas compostas por miglyol 812, apresentaram-se estáveis por até 60 dias, demonstrando não haver influência do fármaco na estabilidade da formulação.

Os resultados obtidos na medida do potencial zeta foram de -21,39 e -47,52, para NM3 E NB respectivamente.

Na análise macroscópica foi observada uma dispersão de cor branca e homogênea sem a presença de sedimentos, formação de nata ou *creaming*, durante todo o ensaio de estabilidade.

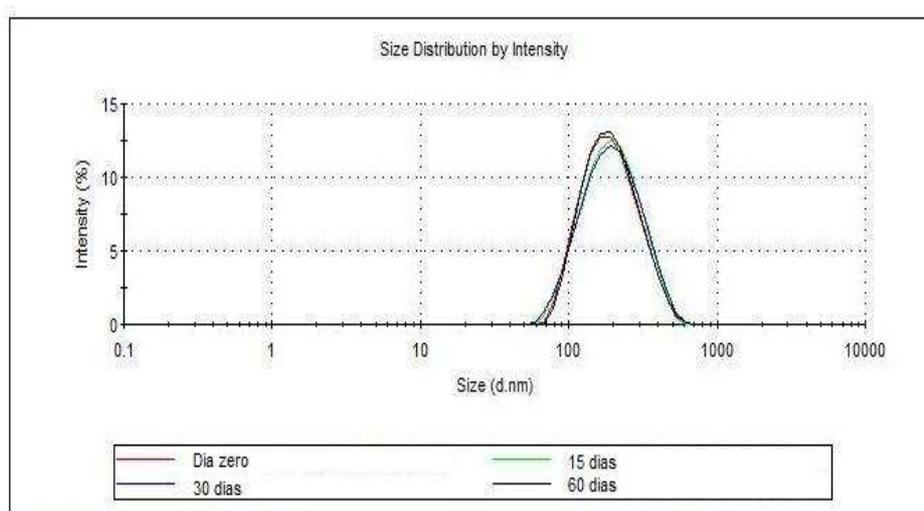


FIGURA 1: Gráfico da variação de tamanho das nanocápsulas da NM3 ao longo do ensaio de estabilidade nos dias 0, 15, 30 e 60.

5. Discussão

A escolha da formulação para a realização do ensaio de estabilidade foi baseada na distribuição de tamanho e na eficiência de encapsulação das nanocápsulas obtidas.

Segundo Song *et al.* (2008), as nanopartículas maiores de 200 nm pode ser mecanicamente filtradas pelo baço, enquanto as menores que 100 nm deixam os vasos sanguíneos através fenestrações no revestimento endotelial. Assim, para levar o fármaco até os tumores, são desejadas nanopartículas com tamanho de 100-200 nm. Então, como todas as formulações citadas apresentaram valores de eficiência de encapsulação semelhantes

escolheu-se, para o ensaio de estabilidade, a formulação cujo tamanho médio das partículas melhor se encaixava nesse intervalo (100-200nm).

O potencial zeta é um fator que também pode indicar a estabilidade de uma formulação de nanocápsulas. Moraes *et al.* (2010), afirmam que valores de potencial zeta em torno de (+/-) 30 mV caracterizam dispersões estáveis devido à repulsão entre as partículas evitando agregação das mesmas. Sendo assim, considerando-se que os valores de potencial zeta para as nanocápsulas com lupeol e as nanocápsulas brancas foram respectivamente - 21,39 e -47,52, pode-se sugerir que as nanocápsulas obtidas apresentam-se estáveis. Além disso, a diferença nos potenciais sugere que o lupeol não se apresenta somente no interior das nanocápsulas, mas pode também estar adsorvido na superfície das mesmas, interferindo no seu potencial zeta.

A medida do pH da dispersão de nanocápsulas também é um indicativo de estabilidade da formulação, já que a degradação do polímero em meio aquoso (PLGA) forma monômeros, como o ácido lático e glicólico, que acidificam a dispersão e conseqüentemente observa-se a diminuição da eficiência de encapsulação e a liberação do ativo para o meio (MELO *et al.*, 2010). Neste trabalho não foram observadas variações de pH nas formulações analisadas, o que reforça sua estabilidade.

O peso molecular do polímero utilizado no preparo das nanocápsulas influencia diretamente no tamanho e na estabilidade das mesmas. Segundo Mosqueira *et al.* (2000), polímeros com massa molecular menor que 42 kD formam nanocápsulas menores e mais estáveis. Baseados no trabalho de Mosqueira e colaboradores podemos sugerir que a utilização de PLGA de baixo peso molecular, como o utilizado no preparo das formulações deste trabalho (10kD), contribui para a estabilidade da formulação.

O índice de polidispersão (PDI), bem como, a distribuição de tamanho das partículas influenciam significativamente na estabilidade da dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Moraes *et al.* (2010) afirma que índices inferiores a 0,2 são considerados excelentes e que o aumento do PDI ao longo do tempo de armazenamento da formulação indica agregação das partículas. A NM 3 apresentou PDI de 0,14 ($\pm 0,02$) e tamanho médio de 175,1 nm ($\pm 0,94$) (Tabela 3) durante os 60 dias de análise. As nanocápsulas brancas apresentaram comportamento semelhante, logo os resultados estão de acordo com o observado pelos autores anteriormente citados.

6. Conclusões

A obtenção de novas e mais eficientes formas de tratamentos para o câncer estão sendo cada vez mais pesquisados. Nesse âmbito, nanocápsulas contendo ativos naturais como o Lupeol é uma estratégia promissora neste tipo de tratamento.

As nanocápsulas obtidas apresentaram-se estáveis e encapsulando altas taxas do ativo por 60 dias, indicando a possibilidade de mais testes, *in vitro* e *in vivo*, para a obtenção de resultados mais concretos.

7. Referências Bibliográficas

Brasil. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 54, p 631-651, 2002.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J Pharm.**, Amsterdam, v 55, n 1, p 1-4, 1989.

GALLO, M.B.C.; SARACHINE, M.J. Biological Activities of Lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 46-66, 2009.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v 26, p 57-64, 2008.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 44, p 2392–2399, 2009.

LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles, **Int. J. Cancer**, v 120, p 2527-2537, 2007.

LUO, Y.; ZIEBBEL, M.R.; PRESTWICH, G.D. A Hyaluronic Acid-Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted To Cancer Cells. **Biomacromolecules**, 1, p. 208-218, 2000.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; DIAS, N.L.F.; PAULA, E.; ARAÚJO, D.R. Desenvolvimento E Caracterização De Nanocápsulas De Poli (L-Lactídeo) Contendo Benzocaína. **Quim. Nova**, v 33, n 1, p 65-69, 2010.

MORAES, C.M.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Physicochemical Stability of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocapsules Containing the Local Anesthetic Bupivacaine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v 21, n 6, p 995-1000, 2010.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 89, n 5, 2000.

RABINOW, B.; CHAUBAL, M.V. Injectable nanoparticles for efficient drug delivery. *In*: GUPTA R.B.; KOMPELLA U.B.; **Nanoparticle technology for drug delivery**. New York, NY: Taylor & Francis Group, v. 159, p 199-229, 2006.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, p. 109-115, 2009.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S; FREITAS, L.L; POHLMANN, A.R. Caracterização E Estabilidade Físico-Química De Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração De Fármacos. **Quim. Nova**, v 26, n 5, p 726-737, 2003.

SIDIQQE, H.R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of Lupeol triterpene: A review of preclinical studies. **Life Sciences**, v.88, p.285-293, 2011.

SONG, X.; ZHAO, Y.; HOU, S.; XU, F.; ZHAO, R.; HE, J.; CAI, Z.; LI, Y.; CHEN, Q. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p.445–453, 2008.

SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia**, v. 72, p. 516-523, 2001.

VINCENTAND, M. J.; DUNCAN, R. Polymer Conjugates: Nanosized Medicines For Treating Cancer. **Trends Biotechnol.**, v. 24, p. 39-47, 2006.

YAMASHITA, K.; LU, H.; LU, J.; CHENG, G.; YOKOYAMA, T.; SAGARA, Y.; MANABE, M.; KODAMA, H. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. **Clin. Chim. Acta.**, v. 325, p. 91-96, 2002.