

ESTABILIZAÇÃO DO ÁCIDO LIPOICO VIA ENCAPSULAÇÃO EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PLANEJADAS PARA APLICAÇÃO CUTÂNEA

Irene Clemes Kulkamp

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre – RS; Curso de Farmácia, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira, 787, 88704-375 Tubarão – SC, Brasil

Karina Paese e Sílvia Stanisçuaski Guterres*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre – RS, Brasil

Adriana Raffin Pohlmann

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15003, 91501-970 Porto Alegre – RS, Brasil

Recebido em 23/10/08; aceito em 9/5/09; publicado na web em 30/9/09

STABILIZATION OF LIPOIC ACID BY ENCAPSULATION IN POLYMERIC NANOCAPSULES DESIGNED FOR CUTANEOUS ADMINISTRATION. This work reports the development of polymeric nanocapsules containing lipoic acid prepared by interfacial deposition of poli(ϵ -caprolactona). The suspensions showed acid pH and encapsulation efficiencies from 77 to 90%. Zeta potential values were from -7.42 to -5.43 mV and particle sizes were lower than 340 nm with polydispersion lower than 0.3. The stability of nanocapsules within 28 days was evaluated in terms of pH, lipoic acid content, diameter, size distribution, zeta potential and measurements of relative light backscattering. The stability of formulations containing free lipoic acid was also evaluated. Nanoencapsulation drastically improved the physico-chemical stability of lipoic acid.

Keywords: nanocapsules; lipoic acid; stabilization.

INTRODUÇÃO

O ácido lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico), também conhecido como ácido tioico, é um antioxidante que apresenta a propriedade de reprimir radicais livres tanto em meio lipídico quanto aquoso, o que o diferencia dos demais antioxidantes. O ácido lipoico e sua forma reduzida, o ácido di-hidrolipoico, têm sido referidos como “antioxidantes universais” que atuam tanto na membrana quanto na fase aquosa da célula,^{1,2} protegendo a membrana por interagir com a vitamina C e a glutatona, as quais podem reciclar a vitamina E.^{1,3} As propriedades do ácido lipoico também incluem a capacidade de quelar metais e reter espécies reativas ao oxigênio, regenerar antioxidantes endógenos, além da participação no reparo de sistemas.^{1,3}

Um grande número de trabalhos e estudos clínicos aponta para a utilidade do ácido lipoico como agente terapêutico para diversos distúrbios, como isquemia cerebral e do miocárdio, intoxicação por metais pesados, diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida e distúrbios neurodegenerativos, como mal de Alzheimer e demências relacionadas.^{1,2,4} Esta substância ainda tem sido sugerida para o tratamento de cirrose hepática, arteriosclerose e doença de Chagas.⁵

Recentemente, o ácido lipoico também tem sido proposto como antioxidante para uso dermatológico e cosmético na prevenção do envelhecimento precoce da pele.⁶⁻⁸ Suas propriedades dermatológicas também incluem o aumento da produção de esfingolípídeos,⁹ o aumento da síntese de colágeno incrementando sua deposição na derme,¹⁰ o tratamento de rosácea¹¹ e da acne.¹² Também foi demonstrado que o ácido lipoico e outros antioxidantes previnem a inflamação da pele e a fotocarcinogênese causada pela radiação ultra-violeta.¹³

A aplicabilidade terapêutica do ácido lipoico é, portanto, promissora. No entanto, o ácido lipoico é uma substância lábil e a falta de estabilidade química dificulta a formulação de uma forma farmacêutica adequada para administração tanto oral quanto tópica.¹⁴⁻¹⁶ O ácido

lipoico está sujeito a fenômenos de instabilização por degradação térmica,¹⁴ fotoquímica, degradação em meio ácido e por oxidação.¹⁵

Alguns autores têm estudado e desenvolvido alternativas para solucionar os problemas de instabilidade do ácido lipoico.^{14,16-18} Helmut e Bauer¹⁸ descrevem um processo de preparação de um complexo de ácido lipoico com ciclodextrina. O complexo apresenta maior estabilidade à temperatura e à luz, melhorando a dispersibilidade do ácido lipoico em água, aumentando a biodisponibilidade e reduzindo o seu odor desagradável. Souto e colaboradores¹⁶ desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas para a liberação tópica de ácido lipoico. No entanto, as dispersões aquosas das nanopartículas apresentaram ampla distribuição de tamanho e aumento de tamanho das partículas após duas semanas de armazenamento à temperatura ambiente.

Uma possível alternativa até então não explorada para a estabilização do ácido lipoico é o emprego de nanocápsulas poliméricas, as quais consistem em sistemas vesiculares nanoestruturados carreadores de substâncias que apresentam diâmetros entre 200 e 300 nm e baixa polidispersão, e que se destacam devido às suas potencialidades no controle da liberação de substâncias e à capacidade de estabilizarem fármacos lábeis tanto no armazenamento quanto nos fluidos biológicos.¹⁹⁻²¹

O uso de nanocápsulas é relatado para proteção de diferentes sistemas para aplicações farmacêuticas ou cosméticas, especialmente para substâncias que degradam em temperaturas acima de 40 °C ou são sensíveis à oxidação em presença de água, por variação de pH ou por efeito de luz ultravioleta.^{20,22} Um estudo recentemente realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou o aumento da estabilidade frente à fotodegradação do metoxicinamato de octila e da quercetina promovido pela conanoencapsulação destas substâncias.²³ A membrana polimérica presente nas nanocápsulas possui efeito protetor de substâncias contra danos causados por agentes externos, prevenindo a sua degradação.²³⁻²⁷

Considerando a potencialidade do emprego da nanoencapsulação para aumentar a estabilidade do ácido lipoico frente à oxidação, o objetivo deste trabalho foi, primeiramente, desenvolver nanocápsulas

*e-mail: silvia.guterres@ufrgs.br

poliméricas contendo ácido lipoico em diferentes concentrações. Adicionalmente, foi avaliada a estabilidade físico-química das nanocápsulas poliméricas, comparando-as com formulações preparadas e armazenadas sob as mesmas condições, contendo ácido lipoico livre. Até o momento, não há relatos referentes tanto à veiculação de ácido lipoico em nanocápsulas poliméricas, quanto qualquer estudo sobre a estabilização físico-química do ácido lipoico empregando-se essa estratégia de nanoencapsulação.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Todos os materiais utilizados na preparação das suspensões de nanocápsulas foram utilizados como recebidos. Acetona (Nuclear) e acetonitrila (Merck) apresentaram grau analítico e cromatográfico, respectivamente, e os demais materiais utilizados foram de grau farmacêutico. Para preparação das formulações empregaram-se mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (Brasquim), poli(ϵ -caprolactona) ($M_n = 42.500$ e $M_w = 65.000$) e monoesterato de sorbitano (Sigma Aldrich), polissorbato 80 (Synth), Carbopol 940® (Henrifarma) e ácido lipoico (Pharma Nostra), acetona (Nuclear), diazolidinilureia (Sarfam) e butil-hidroxitolueno (Via Farma).

Preparação das nanocápsulas

Foram preparadas formulações de nanocápsulas pela técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados.²⁸ As formulações denominadas de A, B e C continham ácido lipoico nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL, respectivamente. O fármaco foi dissolvido na fase orgânica composta por triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (0,33 mL), monoesterato de sorbitano (76,6 mg), poli(ϵ -caprolactona) (100 mg), acetona (26,7 mL) e butil-hidroxitolueno (0,01 g). A fase orgânica foi vertida sobre uma fase aquosa contendo polissorbato 80 (76,6 mg), diazolidinilureia (0,01 g) e água Milli-Q® (53,3 mL), através de funil e mantida sob agitação magnética durante 10 min. As formulações foram preparadas ao abrigo da luz e evaporadas em rotavapor Büchi R-114 sob a temperatura de aproximadamente 35 °C até o volume final de 10 mL. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Foi também preparada uma formulação contendo todos os componentes da formulação, exceto o ácido lipoico, denominada formulação N.

Como controles, também foram preparadas as formulações A', B' e C', contendo ácido lipoico livre nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL e butil-hidroxitolueno (0,01 g), dissolvidos em acetona (26,7 mL). Esta solução foi vertida sobre água Milli-Q® (53,3 mL) e mantida sob agitação magnética durante 10 min. As preparações foram manipuladas e evaporadas sob as mesmas condições experimentais às quais as nanocápsulas foram submetidas.

A partir das formulações A, B, C e N, foram produzidas formulações semi-sólidas pelo espessamento das suspensões aquosas com Carbopol 940® (0,35% p/V) e neutralização com trietanolamina (pH 7), denominadas FA, FB, FC e FN, respectivamente.

Caracterização físico-química das formulações

A caracterização físico-química das formulações foi realizada imediatamente após a preparação. As formulações A, B e C (três lotes de cada) foram avaliadas com relação aos aspectos macroscópicos, tamanho de partícula, polidispersão, potencial zeta, pH, teor e taxa de encapsulação de ácido lipoico, bem como morfologia. A formulação N foi caracterizada quanto aos aspectos macroscópicos, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta, enquanto que as formulações

A', B' e C' foram avaliadas em relação aos aspectos macroscópicos, pH e teor de ácido lipoico.

Análise macroscópica

Cada formulação (2,5 mL) foi acondicionada em tubo de vidro transparente e avaliada visualmente com relação à cor, odor, presença de precipitados ou separação de fases, sob luz natural.

Análise de pH

As medidas de pH foram efetuadas diretamente nas amostras utilizando-se potenciômetro Denver Instrument VB-10, previamente calibrado com soluções tampão para calibração pH 4 e 7 (Merck, Alemanha).

Validação do método cromatográfico

O doseamento do ácido lipoico nas amostras foi realizado empregando-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência Perkin Elmer, com detector UV em 332 nm. Foi utilizada coluna Waters Nova Pak C18 4 μ m (3,9 x 150 mm), volume de injeção de 30 μ L e tempo de análise de 4 min. A fase móvel isocrática consistiu de acetonitrila:ácido fosfórico 0,01M (60:40, v/v) e o fluxo empregado foi 1 mL/min. Foi preparada uma solução mãe contendo 1000 μ g/mL de ácido lipoico, a partir da qual foram tomadas alíquotas e diluídas na faixa de 30 a 120 μ g/mL para a curva padrão.

A especificidade do método foi avaliada através da injeção de amostras de nanocápsulas, sem ácido lipoico, preparadas e diluídas nas mesmas condições que as formulações testadas. Para verificar a possível coeluição de produtos de degradação, preparou-se uma solução S1 contendo 1000 μ g/mL de ácido lipoico em acetonitrila e manteve-se esta solução em frasco de vidro transparente durante 15 dias recebendo luz natural, induzindo assim sua degradação. Imediatamente antes da análise preparou-se outra solução S2 de ácido lipoico na mesma concentração que a solução inicial. A pureza do pico cromatográfico foi avaliada através da injeção das amostras S1 e S2 sob as mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas, em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co.) composto por uma bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-2A, injetor automático SIL-10ADvp e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10A.

Determinação de teor e taxa de associação de ácido lipoico às nanocápsulas

Para doseamento do ácido lipoico nas formulações, as mesmas foram diluídas de forma a se obter concentração teórica final do mesmo de 50 μ g/mL. Assim, foram tomadas alíquotas de 250, 100 e 50 μ L das formulações A, B e C, e A', B' e C', respectivamente, e diluídas a 5 mL com acetonitrila. As amostras foram filtradas (Millipore 0,45 μ m) e injetadas (20 μ L).

A determinação da taxa de encapsulação foi realizada com alíquotas de 400 μ L das formulações, as quais foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação, utilizando-se membranas Microcon (10.000 MWCO, Millipore), através de filtração em centrífuga Eppendorf 5417R durante 5 min a 4.500 rpm e 24 °C. O ultrafiltrado foi injetado no cromatógrafo para determinar a quantidade de ácido lipoico livre no meio. O percentual de encapsulação (E) foi determinado a partir da razão entre a diferença da concentração total de ácido lipoico na amostra (CT) e a concentração de ácido lipoico livre (CL) e a concentração total, multiplicada por 100 (Equação 1).

$$E = \frac{CT - CL}{CT} \times 100 \quad (1)$$

Determinação de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e a polidispersão das partículas em suspensão foram determinados através de espalhamento de luz dinâmico utilizando-se equipamento Zetasizer Nano series Nano-Zs (Malvern Instruments). As amostras A, B, C e N foram diluídas na proporção de 1:500 (v/v) em água Milli-Q® e a distribuição de tamanho (por intensidade) foi avaliada efetuando-se três leituras para cada amostra. As amostras FA, FB, FC e FN foram diluídas na proporção de 1:2000 (v/v) em água Milli-Q®, determinados o tamanho e a polidispersão pela mesma técnica descrita anteriormente, comparando-se os resultados obtidos com as suspensões de nanocápsulas (A, B, C e N) e as formulações semi-sólidas contendo as nanocápsulas (FA, FB, FC e FN).

Utilizando-se o mesmo equipamento, o potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética. As amostras foram diluídas na proporção de 1:500 (v/v) de NaCl 10 mM e as leituras efetuadas em triplicata.

Avaliação morfológica

A morfologia das amostras A, B e C foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL (Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS) operando em 120 kV, com um aumento de 120.000 vezes. As suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em água Milli-Q®, e depositadas diretamente nos *grids* utilizados para a observação das amostras utilizando como contraste solução de acetato de uranila (2% m/v).

Estudo de estabilidade

Para estudo da estabilidade das formulações A, B e C foram monitorados os parâmetros pH, teor total de ácido lipoico, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta nos tempos 0, 7, 14 e 28 dias. Os aspectos macroscópicos, o pH e o teor total de ácido lipoico também foram avaliados para as formulações A', B' e C'. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e do calor.

A estabilidade das formulações A, B e C também foi avaliada através de caracterização óptica através de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAB, Formulaction Co., França). Foram adicionados 25 mL de cada amostra recém-preparada em uma célula de vidro borossilicato, cilíndrica, de 25 mm de diâmetro e 55 mm de altura, mantida sob temperatura constante de 25 °C. A amostra foi submetida à varredura por um feixe de luz composto por um diodo eletro-luminescente na região do infravermelho próximo (850 nm). Dois sensores ópticos detectaram a luz transmitida através da amostra (180° a partir da luz incidente) e a luz retroespalhada pela amostra (45° da radiação incidente). A leitura óptica varreu todo o comprimento da amostra ao longo da célula (até 55 mm), obtendo os dados de transmissão e de retroespalhamento a cada 40 µm, em função da altura da amostra em mm. A aquisição dos dados foi repetida a cada 5 min por um período de tempo de 6 h, totalizando 72 leituras para cada amostra. O perfil obtido ao longo das análises permite detectar fenômenos de migração de partículas e tendência à desestabilização do sistema a partir da variação nos sinais obtidos da luz transmitida ou retroespalhada. As análises gráficas da luz retroespalhada relativa em função do tempo de análise foram efetuadas utilizando o software computacional Turbiscan LAB.

Análises estatísticas

Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), considerando-se o nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química das formulações

Análise macroscópica

Após a preparação, as suspensões de nanocápsulas (A, B, C e N) resultaram em formulações com aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente. As suspensões apresentaram reflexo azulado, resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão. O aspecto visual das suspensões de nanocápsulas foi semelhante ao descrito na literatura para diferentes sistemas de nanocápsulas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados.²⁹⁻³² A formulação A' apresentou aspecto de solução aquosa, enquanto que nas formulações B' e C' observou-se a presença de ligeira precipitação do fármaco após o processo de evaporação dos solventes, porém, redispersíveis. Observou-se acentuado odor característico de compostos sulfurosos nas formulações A', B' e C', enquanto que nas formulações A, B e C o odor sulfuroso se apresentou praticamente imperceptível. A formulação N não apresentou odor característico.

Análises de pH

Todas as formulações apresentaram pH ácido devido às características de seus componentes, principalmente o ácido lipoico. A presença do polímero também contribuiu para a obtenção de suspensões de caráter ácido, visto que nanopartículas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) contendo outros fármacos também se apresentaram levemente ácidas.^{31,33} As formulações A', B' e C' (Tabela 1) apresentaram valores de pH significativamente menores ($p < 0,01$), provavelmente devido à maior concentração de ácido lipoico livre no meio dispersante.

Tabela 1. Teor total, taxa de encapsulação e pH das formulações

Formulação	Teor total (%)	Taxa de encapsulação (%)	pH
A	112,11 $\pm$ 2,27	77	4,66 $\pm$ 0,02
B	83,81 $\pm$ 7,36	79	4,31 $\pm$ 0,05
C	88,71 $\pm$ 5,33	90	4,16 $\pm$ 0,01
A'	95,15 $\pm$ 0,79	-	4,02 $\pm$ 0,12
B'	47,66 $\pm$ 6,85	-	4,03 $\pm$ 0,04
C'	22,60 $\pm$ 11,38	-	3,88 $\pm$ 0,04

Cada valor é média de 3 amostras

Validação do método cromatográfico

O método foi validado na faixa de 30 a 120 µg/mL, apresentando linearidade ($r^2 = 0,9914$), precisão (repetibilidade, DPR = 2,13%) e exatidão (97,20% $\pm$ 4,56). Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,13 e 1,0 µg/mL, calculados considerando o ruído da linha de base do cromatograma. A especificidade do método foi confirmada verificando-se a ausência de picos suplementares nos cromatogramas obtidos para as amostras de nanocápsulas sem ácido lipoico.

A amostra degradada S1 apresentou perda de 50% de ácido lipoico em relação à concentração da amostra não degradada S2. O detector de fotoarranjo de diodos demonstrou pureza de pico igual a 1,0 e ausência de impurezas nos picos cromatográficos de ambas as amostras. Em 332 nm, que corresponde ao comprimento de onda das análises de doseamento, não foi detectada a presença de picos cromatográficos adicionais além do relacionado ao ácido

lipoico ($r = 1,64$) em ambas as amostras (S1 e S2). No entanto, o detector de fotoarranjo de diodos demonstrou a presença de dois picos adicionais ($r = 1,41$ e $r = 3,085$) em 285 nm apenas na amostra degradada (S1), demonstrando que o método utilizado para o doseamento é específico para o ácido lipoico, e que não ocorre coeluição de produtos de degradação.

Determinação de teor e taxa de associação de ácido lipoico às nanocápsulas

Os teores de ácido lipoico encontrados nas suspensões de nanocápsulas A, B e C foram significativamente superiores ($p < 0,001$) aos verificados para as formulações A', B', e C' contendo o fármaco livre (Tabela 1). Durante a preparação das formulações, as mesmas são expostas ao ar, água e luz, inerentes ao processo de produção. Observou-se o efeito protetor da nanoencapsulação sobre o ácido lipoico, visto que as formulações A, B e C apresentaram teores superiores às formulações A', B', e C'. Durante o processo de produção das formulações A', B', e C' ocorre a perda por degradação, confirmada pela diminuição dos teores de ácido lipoico.

A técnica usada para separar a fase contínua (dispersante) das nanocápsulas foi a ultrafiltração-centrifugação, consolidada na literatura para calcular a taxa de associação de fármacos às nanocápsulas.^{19,31,33,34} Verificaram-se taxas de encapsulação entre 77 e 90%, com valores maiores para as formulações contendo concentrações mais elevadas de fármaco (Tabela 1). Pequenas partículas poliméricas podem ter baixa eficiência de incorporação de fármacos e há relatos na literatura de diferentes sistemas contendo nanoestruturas que não apresentaram 100% de encapsulação.^{29,35-38} O percentual de associação do ácido lipoico às nanocápsulas pode ser considerado elevado, e a solubilidade do ácido lipoico na fase oleosa da formulação, especialmente nos triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico constituinte do núcleo oleoso, determinada experimentalmente em 100 mg/mL a 35 °C e 33 mg/mL a 25 °C (dados não mostrados) pode ter contribuído para este resultado.

Ainda, a taxa de encapsulação é afetada pela quantidade de fármaco adicionada nas formulações, pois o percentual de associação às nanocápsulas aumentou com o incremento na concentração de ácido lipoico nas formulações (Tabela 1). Estudos realizados com poli(ε-caprolactona) ou outros polímeros também demonstraram um aumento do percentual de encapsulação em nanopartículas com o aumento da concentração de fármaco inicialmente adicionada às formulações.^{19,34,39}

Determinação de tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta

Todas as formulações apresentaram partículas com diâmetros submicrométricos entre 313 e 377 nm (Tabela 2). Os diâmetros médios obtidos estão em concordância com os dados relatados na literatura para nanocápsulas formadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados.^{32,33}

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2676$) nos diâmetros das nanocápsulas suspensas nas amostras A, B e C, demonstrando que a concentração de fármaco não influencia o tamanho das nanopartículas.

Os índices de polidispersão, calculados a partir do método dos cumulantes apresentados na Tabela 2 são referentes às medidas de triplicatas diferentes para cada amostra, e encontram-se na faixa de 0,24 a 0,34. Os desvios das leituras do diâmetro médio para cada lote individualmente apresentaram-se todos menores do que 10 nm. Cabe ressaltar que, ao longo do tempo de armazenamento, não houve aumento da polidispersão, demonstrando que as formulações são estáveis.

As nanocápsulas poliméricas de ácido lipoico (formulações A, B

e C) apresentaram uma distribuição mais estreita de tamanho, do que as nanopartículas lipídicas sólidas de ácido lipoico desenvolvidas por Souto e colaboradores,¹⁶ as quais obtiveram índice de polidispersão em torno de 0,6, apresentando uma ampla variação no tamanho das nanopartículas, o que significa falta de controle de diâmetro das partículas formadas. Outros autores encontraram valores de polidispersão acima de 0,3 em nanopartículas para aplicação cutânea e consideraram estes valores relativamente baixos.⁴⁰

Tabela 2. Diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial ζ (mV)
A	340 ± 2	0,29 ± 0,01	-7,42 ± 0,38
B	313 ± 2	0,24 ± 0,03	-6,05 ± 0,06
C	320 ± 4	0,34 ± 0,01	-5,43 ± 0,46
N	358 ± 8	0,19 ± 0,01	-9,06 ± 0,27
FA	363 ± 7	0,24 ± 0,01	
FB	374 ± 15	0,17 ± 0,01	
FC	329 ± 15	0,14 ± 0,01	
FN	378 ± 2	0,25 ± 0,01	

Cada valor é média de 3 amostras

Observou-se que não ocorreu coalescência ou agregação das partículas na produção da forma farmacêutica semi-sólida, a partir do espessamento das formulações com o polímero Carbopol 940®, uma vez que o diâmetro médio (PCS) das amostras semi-sólidas FA, FB, FC e FN se assemelha aos diâmetros das suspensões originais A, B, C e N. Resultados semelhantes foram obtidos com nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados no estudo de Souto e colaboradores,⁴¹ observando manutenção no diâmetro de nanopartículas antes e após a incorporação em hidrogeis.

O potencial zeta, relacionado ao potencial de superfície das partículas, apresentou valores negativos (Tabela 2), semelhantes aos relatados na literatura para nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) revestidas com polissorbato 80. Os valores negativos são devidos às características estruturais dos componentes da interface das partículas, poli(ε-caprolactona) e especialmente polissorbato 80. Este é material de revestimento da superfície externa, sendo que o mecanismo de estabilização da partícula é por impedimento estérico.⁴²

São descritas na literatura tanto partículas com potencial zeta negativo quanto positivo para aplicação cutânea.^{40,43,44} O determinante para adequabilidade de uma formulação para aplicação na pele é o pH, que deve ser levemente ácido,⁴⁵ conforme apresentado pelas formulações desenvolvidas (Tabela 1).

Avaliação morfológica

As fotografias por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que ocorre a formação de partículas vesiculares contendo ácido lipoico (Figura 1). Foi observada a presença de vesículas cujo conteúdo é diferente do meio dispersante. As partículas apresentaram a mesma ordem de grandeza das medidas de diâmetro obtidas por espalhamento de luz dinâmico. Verificou-se também que com o aumento da concentração do fármaco não houve alteração na morfologia das nanocápsulas. As nanocápsulas não se apresentaram perfeitamente esféricas nas fotomicrografias, provavelmente em virtude de distorção decorrente da secagem e desidratação no momento do preparo da amostra.

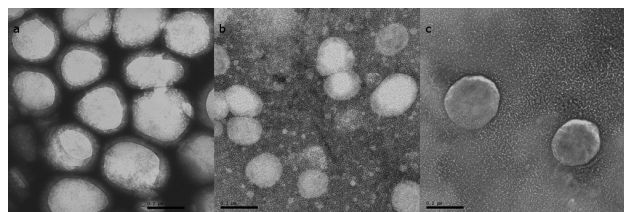


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão das formulações A (1a), B, (1b) e C (1c)

Estudo de estabilidade

A verificação das características das amostras A, B e C durante o período de 28 dias demonstrou que as mesmas se mantiveram estáveis durante o tempo de análise, enquanto que as amostras A', B' e C' foram instáveis apresentando diminuição do teor (Figura 2).

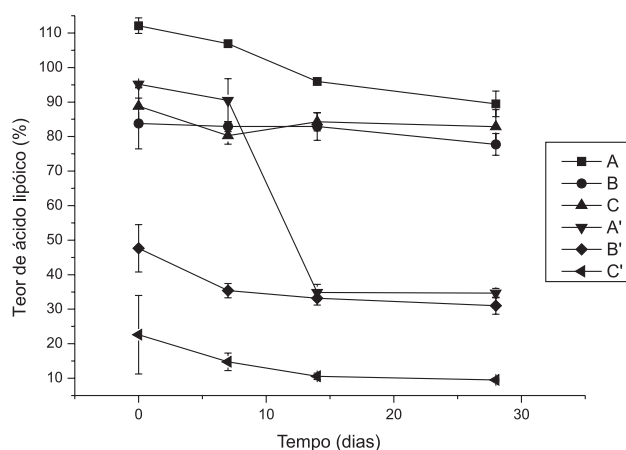


Figura 2. Teor de ácido lipoico durante o armazenamento

O pH manteve-se estável durante todo o período (Figura 3). Este é um indício de que o fármaco se mantém encapsulado, visto que as formulações contendo ácido lipoico livre apresentam valores de pH significativamente inferiores às formulações contendo o mesmo nanoencapsulado. A manutenção do pH das formulações também demonstra não haver a degradação significativa do polímero.⁴⁶

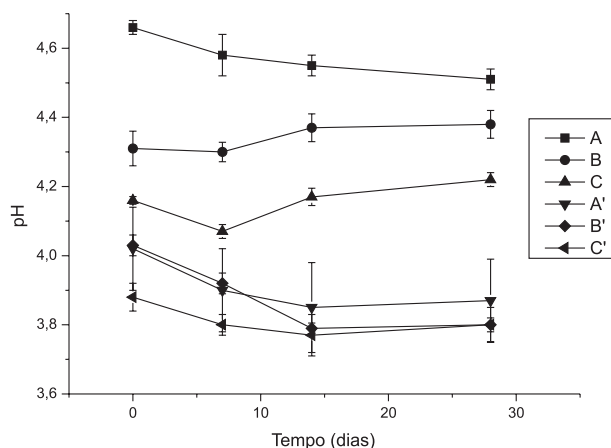


Figura 3. Medidas de pH das formulações durante o armazenamento

O acompanhamento do teor total das suspensões A, B e C demonstrou que ocorre uma perda inicial do teor total, estatisticamente

significativa apenas nas formulações A e C ($p < 0,01$), seguida de estabilização nas nanocápsulas de ácido lipoico (Figura 2). Para a suspensão B a redução de teor em função do tempo não foi significativa ($p = 0,3217$). A concentração de ácido lipoico na amostra A, após 28 dias de armazenamento, foi estatisticamente equivalente à concentração inicial da amostra A' contendo o fármaco livre. Para as amostras B e C, o teor de ácido lipoico nas nanocápsulas foi estatisticamente superior à concentração inicial das amostras B' e C'. Observou-se assim uma evidente degradação nas formulações A', B' e C', contendo ácido lipoico livre e o efeito protetor da nanoencapsulação sobre o ácido lipoico.

Não houve aumento significativo no diâmetro médio das partículas presentes nas suspensões A e B durante 28 dias de armazenamento. Para a amostra C, o teste de Tukey demonstrou que até o tempo de 14 dias as amostras mantiveram o mesmo diâmetro, havendo aumento significativo ($p < 0,001$) após 28 dias. A manutenção do diâmetro das partículas suspensas nas formulações A e B indica que não houve aglomeração das mesmas (Figura 4). Cabe salientar que mesmo na amostra C, na qual a diferença de tamanho entre o tempo inicial e o tempo final foi estatisticamente significativa, esta diferença foi de 64 nm, correspondendo a um fator de grandeza de apenas 0,2 vezes o tamanho inicial. Observou-se manutenção na dispersão de tamanho das nanocápsulas das formulações A e B, havendo uma maior flutuação na polidispersão da amostra C (Tabela 3). As nanocápsulas poliméricas de ácido lipoico mantiveram-se em torno de 300 nm e mostraram-se mais estáveis do que as nanopartículas lipídicas desenvolvidas por Souto e colaboradores,¹⁶ as quais sofreram aumento significativo no tamanho de partícula, chegando a aumentar em 2,7 vezes o tamanho inicial e perdendo as dimensões nanométricas em algumas condições de armazenamento.

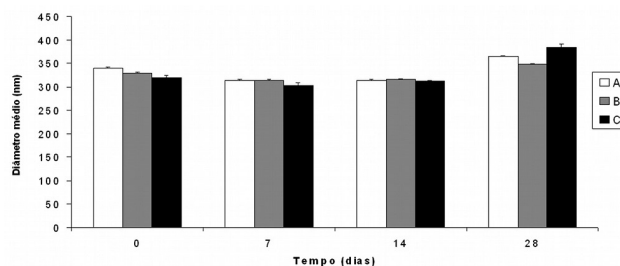


Figura 4. Diâmetro médio das partículas durante o armazenamento

Tabela 3. Polidispersão (nm) das partículas em função do tempo de armazenamento

Tempo (dias)	Polidispersão (nm)		
	A	B	C
0	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,01
7	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,01
14	0,27 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,36 ± 0,02
28	0,30 ± 0,01	0,26 ± 0,13	0,22 ± 0,01

Cada valor é média de 3 amostras

O potencial zeta sofreu um aumento significativo ($p < 0,001$) em módulo (Figura 5), tornando-se mais negativo nas amostras A, B e C, após 28 dias de armazenamento. A ocorrência deste fenômeno pode estar relacionada à ionização dos grupos ácidos da porção do ácido lipoico presente na interface partícula/água, uma vez que os teores do ácido lipoico nas formulações se mantiveram praticamente constantes (Figura 3).

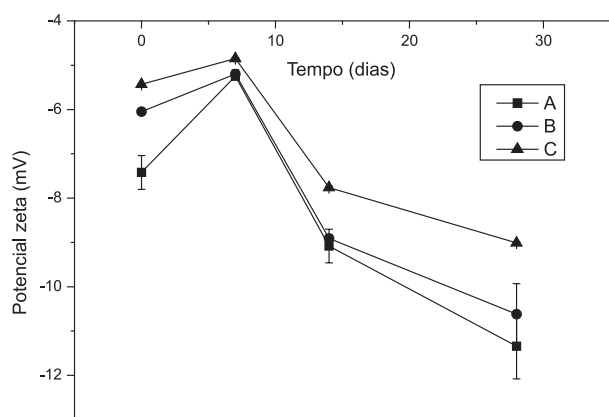


Figura 5. Potencial zeta das nanopartículas durante o armazenamento

A desvantagem de monitorar a estabilidade utilizando técnicas tradicionais sob diferentes condições de armazenamento é o longo período de tempo requerido para detectar pequenas diferenças. A caracterização óptica fornece informação rápida a respeito da estabilidade global de formulações, com ganho de tempo considerável.⁴⁷ As análises através de retroespalhamento de luz têm sido recentemente utilizadas para estudar a estabilidade física de diversos sistemas como dispersões coloidais, suspensões de nanopartículas e emulsões.⁴⁸⁻⁵² A principal vantagem desta técnica é detectar fenômenos de desestabilização como coalescência, floculação, cremagem ou sedimentação muito antes destes poderem ser percebidos pelo olho humano.⁴⁹⁻⁵⁰

A análise da transmitância para todas as amostras mostrou valores abaixo de 0,02%. Assim, a análise do retroespalhamento de luz relativo mostrou que as formulações A, B e C são estáveis (Figura 6). Observa-se à esquerda do gráfico, que corresponde ao fundo da cubeta, pouca variação de retroespalhamento relativo no decorrer do tempo de análise. Esta variação foi menor do que 5% em relação ao tempo inicial para todas as amostras, demonstrando que a tendência à sedimentação de partículas sob as condições estudadas é pequena, mas existe uma tendência à cremagem (Figura 6a e 6c).

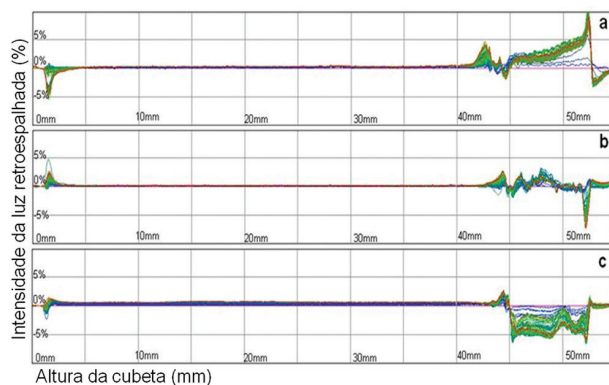


Figura 6. Perfil da intensidade da luz retroespalhada de 0 a 6 h das amostras A (7a), B (7b) e C (7c)

Da mesma forma, a variação do retroespalhamento relativo no lado direito do gráfico, que corresponde à superfície da amostra, também foi pequena, inferior a 5% em relação ao tempo inicial, indicando que as amostras apresentam leve tendência à migração de partículas para a superfície.

A análise da parte central do gráfico (Figura 6a, 6b e 6c) demonstra que ocorre aumento do tamanho das partículas apenas para a formulação C. Este resultado demonstra que nessa amostra há uma

maior tendência para o aumento do tamanho de partículas, devido à floculação ou coalescência das mesmas. Esta hipótese é confirmada pelos dados obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, visto que a amostra C foi a que apresentou maior aumento de diâmetro das partículas durante o armazenamento.

CONCLUSÃO

A nanoencapsulação do ácido lipoico mostrou-se viável mediante o emprego de poli(ε-caprolactona) como polímero constituinte da parede das vesículas e triglicerídeos de cadeia média como núcleo das nanocápsulas, que foram estabilizadas por tensoativos e preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero. O acompanhamento da estabilidade demonstrou o efeito protetor que as nanocápsulas poliméricas exercem sobre o ácido lipoico, aumentando a sua estabilidade físico-química em comparação com formulações contendo ácido lipoico livre.

As nanocápsulas poliméricas de ácido lipoico desenvolvidas e caracterizadas no presente trabalho podem ser utilizadas no desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-sólidas para veiculação do ácido lipoico.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/MCT, à FINEP, Rede Nanocosméticos CNPq/MCT e ao Programa Unisul de incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J.; *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 19, 227.
- Bilska, A.; Wlodek, L.; *Pharmacol. Rep.* **2005**, 57, 570.
- Biewenga, G. P.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A.; *Gen. Pharmacol.* **1997**, 29, 315.
- Holmquist, L.; Stuchbury, G.; Berbaum, K.; Muscat, S.; Young, S.; Hager, K.; Engel, J.; Münch, G.; *Pharmacol. Ther.* **2007**, 113, 154.
- Perricone, N. V.; *US pat.* 20040265345 **2004**.
- Beitner, H.; *Br. J. Dermatol.* **2003**, 149, 841.
- Keefe, C. R.; Abbruzzese, A.; Vervynck, E. A.; Bottiglieri, P.; *US pat.* 20040191330 **2004**.
- Rona, C.; Vailati, F.; Berardesca, E.; *J. Cosmet. Dermatol.* **2004**, 3, 26.
- Rawlings, A. V.; Zhang, K. H.; Kosturko, R.; *US pat.* 5472698 **1995**.
- Han, B.; Nimni, M. E.; *Connect. Tissue Res.* **2005**, 46, 251.
- Perricone, N. V.; *US pat.* 6472432 **2002**.
- Perricone, N. V.; *US pat.* 20030021855 **2003**.
- Saliou, C.; Kitazawa, M.; McLaughlin, L.; Yang, J. P.; Lodge, J. K.; Tetsumika, T.; Iwasaki, K.; Cillard, J.; Okamoto, T.; Packer, L.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 174.
- Ames, B. N.; *US pat.* 20040044046 **2004**.
- Segall, A.; Sosa, M.; Alami, A.; Enero, C.; Hormaechea, F.; Pizzorno, M. T.; Bregni, C.; *J. Cosmet. Sci.* **2004**, 55, 449.
- Souto, E. B.; Müller, R. H.; Gohla, S.; *J. Microencapsulation* **2005**, 22, 581.
- Gruzman, A.; Hidmi, A.; Katzhendler, J.; Haj-Yehie, A.; Sasson, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1183.
- Helmut, R.; Bauer, M.; *Eur. pat.* EP1671653 A1 **2006**.
- Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova*, **2003**, 26, 726.
- Müller, C. R.; Haas, S. E.; Bassani, V. L.; Guterres, S. S.; Fessi, H.; Peralba, M. C. R.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 555.
- Guterres, S. S.; Alves, M. P.; Pohlmann, A. R.; *Drug Target insights* **2007**, 2, 147.
- Jugla, L.; *FR2849379-A1* **2004**.

23. Weiss-Angeli, V.; Poletto, F. S.; Zancan, L. R.; Baldasso, F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 1.
24. Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 99.
25. Carlotti, M. E.; Rossatto, V.; Gallarate, M.; Trotta, M.; Debernardi, F.; *J. Cosmetic. Sci.* **2004**, *55*, 233.
26. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H.; Bonnet, I.; Zydowicz, N.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 89.
27. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Couenne, F.; Fessi, H.; Tayakout, M.; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 3187.
28. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Amoury, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *113*, 1.
29. Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 71.
30. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Freitas, L. L.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 99.
31. Cruz, L.; Soares, L. U.; Dalla-Costa, T.; Mezzalira, G.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *313*, 198.
32. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; Guterres, S. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 562.
33. Michalowski, C. B.; Guterres, S. S.; Dalla-Costa, T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 1093.
34. Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *113*, 57.
35. Riley, T.; Govender, T.; Stolnik, S.; Xiong, C. D.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; *Colloids Surf., B* **1999**, *16*, 147.
36. Hu, Y.; Jiang, X.; Ding, Y.; Ge, H.; Yuan, Y.; Yang, C.; *Biomaterials* **2002**, *23*, 3193.
37. Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Cordova, C. A. S.; Creczynski-Pasa, T. B.; Guterres, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *289*, 209.
38. Zhang, Z.; Feng, S. S.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 262.
39. Govender, T.; Riley, T.; Ehtezazi, T.; Garnett, M. C.; Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *199*, 95.
40. Sonavane, G.; Tomoda, K.; Sano, A.; Ohshima, H.; Terada, H.; Makino, K.; *Colloids Surf., B* **2008**, *65*, 1.
41. Souto, E. B.; Wissing, S. A.; Barbosa, C. M.; Müller, R. H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 83.
42. Jäger, E.; Venturini, C. G.; Poletto, F. S.; Colomé L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5*, 130.
43. Ourique, A. F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R.; *Int. J. Pharm.* **2008**, *352*, 1.
44. Hoeller, S.; Sperger, A.; Valenta, C.; *Int. J. Pharm.* **2009**, *370*, 181.
45. Leonardi, G. R.; Gaspar, L. R.; Maia Campos, P. M. B. G.; *An. bras. Dermatol* **2002**, *77*, 563.
46. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
47. Roland, I.; Piel, G.; Delattre, L.; Evrard, B.; *Int. J. Pharm.* **2003**, *263*, 85.
48. Terayama, H.; Hirota, K.; Yoshimura, T.; Esumi, K.; *Colloids Surf., B* **2002**, *27*, 177.
49. Lemarchand, C.; Couvreur, P.; Vauthier, C.; Costantini, D.; Gref, R.; *Int. J. Pharm.* **2003**, *254*, 77.
50. Lemarchand, C.; Couvreur, P.; Besnard, M.; Costantini, D.; Gref, R.; *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1284.
51. Cournarie, F.; Savelli, M. P.; Rosilio, V.; Bretez, F.; Vauthier, C.; Grosiord, J. L.; Seiller, M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 477.
52. Dale, P. J.; Kijlstra, J.; Vincent, B.; *Colloids Surf., A* **2006**, *291*, 85.