UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
caderno de farmácia
ISSN 0102-6593

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO OLIGONUCLEOTÍDEOS *ANTISENSE* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA

TEIXEIRA, H.[1], MARTINI, E.[2], SILVEIRA, A.M. da[2] ; DUBERNET, C.[3]

[1] Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre
[2] Curso de Farmácia da Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas
[3] Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Universidade Paris XI, Châtenay-Malabry, França

RESUMO: Recentemente, nanoemulsões preparadas pela técnica de microfluidização foram propostas como um sistema de liberação de oligonucleotídeos *antisense* (ON) por Teixeira *et al*. [*J. contr. rel*., 70:243-255, 2001]. O objetivo do presente trabalho foi preparar e caracterizar nanoemulsões através de uma técnica alternativa, a emulsificação espontânea, visando à preparação de pequenos lotes de produto final. As formulações foram caracterizadas em termos de diâmetro de partícula, potencial zeta e estabilidade física em função da presença (NE_{SA}) ou da ausência (NE_0) do lipídeo catiônico estearilamina (SA). O diâmetro de partícula foi principalmente influenciado pelo procedimento de emulsificação espontânea; o diâmetro médio foi de ~170 nm para ambas formulações. Contrariamente ao verificado na NE_0, não foram observadas modificações significativas do diâmetro médio de partícula de NE_{SA} mesmo quando esta foi armazenada durante 60 dias à temperatura de 45 °C. Em uma segunda etapa, a associação de um ON modelo (pdT_{16}) com as nanoemulsões foi realizado através de dois procedimentos distintos: O pdT_{16} (10 μM) foi adicionado por simples mistura às nanoemulsões previamente preparadas ou durante a etapa de emulsificação, solubilizado na fase aquosa. A eficiência de associação foi de cerca de 70 % e 95 % para NE_0 e NE_{SA}, respectivamente, independente do procedimento utilizado. Em conclusão, este trabalho demonstra a viabilidade de preparação de pequenos volumes de nanoemulsões para a associação de ON, bem como que a eficácia de associação de ON e a estabilidade das formulações são influenciadas pela presença do lipídeo catiônico SA.

UNITERMOS: nanoemulsões, oligonucleotídeos *antisense*, estearilamina, emulsificação espontânea

ABSTRACT: ***PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOEMULSIONS CONTAINING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES BY SPONTANEOUS EMULSIFICATION PROCEDURE.*** Recently, nanoemulsions prepared by microfluidization procedure as a delivery system for antisense oligonucleotides (ON) has been proposed by Teixeira et al. [*J. contr. rel*., 70:243-255, 2001]. The aim of the present work is to prepare and to characterize nanoemulsions by an alternative procedure, the spontaneous emulsification, in order to prepare small batches of the product. Formulations were characterized in terms of particle size, ζ-potencial and medium term stability as a function of the presence (NE_{SA}) or absence (NE_0) of a cationic lipid stearylamine (SA). It was found that the droplet size of the nanoemulsions was mainly influenced by the emulsification procedure; the mean droplet size was ~ 170 nm for both formulations. Contrarily to E_0, no significant changes in droplet size were noted even when NE_{SA} was stored during 60 days at 45 °C. As a second step, the association of a model ON (pdT_{16}) with nanoemulsions was performed by two ways: incubation of pdT_{16} (10 μM) with the previously formed nanoemulsions or dissolved in the aqueous phase during the emulsion formation step. The association efficiency was around 70 % and 95 % for NE_0 and NE_{SA}, respectively, for both procedures. In conclusion, this work shows the viability of the preparation of small batches of the nanoemulsions for the association of ON and that the association efficiency and stability of the formulations is influenced by the presence of the SA in the formulations.

KEYWORDS: nanoemulsions, antisense oligonucleotides, stearylamine, spontaneous emulsification.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos relativos à utilização terapêutica de ácidos nucléicos têm recebido um interesse crescente, sobretudo, no tratamento das infecções virais e em oncologia. Os ácidos nucléicos são capazes de modular ou bloquear a expressão gênica, em diferentes níveis (citoplasmático e/ou nuclear)[1].

Uma vasta literatura descreve estudos relativos ao emprego de fragmentos curtos de ácidos nucléicos, denominados oligonucleotídeos *antisense* (ON), que são capazes de bloquear especificamente a expressão de um gene[2,3]. Entretanto, a transferência intracelular dessas moléculas polianiônicas, em células de mamíferos, é baixa devido ao seu elevado peso molecular e caráter hidrofílico[4]. Além disso, ON são rapidamente degradados em meio biológico por exo- e endonucleases através da hidrólise das ligações fosfo-diéster[5].

O desenvolvimento de sistemas coloidais lipídicos (i.e. lipossomas e emulsões) tem sido proposto com o objetivo de contornar estes inconvenientes maiores. De maneira geral, esses sistemas são adicionados de um lipídeo catiônico que confere uma carga de superfície positiva à estrutura coloidal, favorecendo assim a sua interação com os ON. Esta interação eletrostática, que geralmente é realizada em excesso de carga positiva, conduz a uma maior penetração dos ON em algumas linhas celulares, conferindo também uma maior estabilidade dos ON frente à degradação enzimática[2-5].

Teixeira e col. estudaram as potencialidades de nanoemulsões catiônicas, constituídas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por uma combinação de diferentes agentes de superfície (poloxâmero, fosfatidilcolina e estearilamina), para a administração de ON[6]. Nesse trabalho foi evidenciada a influência da adição do lipídeo catiônico estearilamina no perfil de associação e dissociação dos ON a partir da estrutura coloidal, bem como uma proteção *in vitro* frente à degradação pelas nucleases[7]. Em um outro estudo *in vivo*, foi claramente demonstrado o aumento da captura de ON, associados a nanoemulsões catiônicas por células tumorais (P388/ADR), após administração intratumoral em camundongos[8].

A utilização da técnica de microfluidização para a preparação de sistemas coloidais lipídicos tem sido amplamente descrita na literatura[6-9]. Através desta técnica é possível obter emulsões monodispersas de reduzido diâmetro de partícula em grande escala. A obtenção de nanoemulsões por esta técnica requer a preparação prévia de uma emulsão primária, geralmente a quente (~70 °C), seguida da homogeneização por microfluidização. O número de ciclos de passagem e a pressão aplicada na homogeneização são normalmente determinados experimentalmente para cada tipo de sistema[6]. Entretanto, dependendo do tipo de equipamento utilizado, a homogeneização através da técnica de microfluidização fica limitada à preparação de grandes quantidades de produto final, reduzindo a sua aplicação em estudos de bancada. Além disso, a utilização de elevadas temperaturas na obtenção da emulsão primária pode representar uma limitação no emprego deste procedimento para o desenvolvimento de sistemas lipídicos e/ou fármacos termossensíveis[10].

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi preparar nanoemulsões contendo um oligonucleotídeo *antisense* modelo (pdT_{16}) pela técnica de emulsificação espontânea, com vistas à produção de volumes reduzidos de produto final, assim como caracterizar as formulações obtidas quanto ao diâmetro médio de partícula, potencial zeta e taxa de associação do pdT_{16}.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais: Lipoid E-80 e triglicerídeos de cadeia média (TCM) foram gentilmente cedidos por Lipoid KG (Alemanha) e Societé des Oleagineux (França), respectivamente. Poloxâmero 188, estearilamina e glicerol foram obtidos da Sigma (EUA). ON pdT_{16} foi obtido da Eurogentec (França) e os reagentes para a marcação T4 polinucleotídeo quinase e ^{33}P-ATP da Biolabs (U.K.) e Isotopchim (França), respectivamente.

Preparação e caracterização das nanoemulsões: A composição qualitativa e quantitativa final das nanoemulsões, na ausência (NE_0) ou na presença do lipídeo catiônico estearilamina (NE_{SA}), após preparação pela técnica de emulsificação espontânea, está apresentada na tabela 1. Resumidamente, os constituintes da fase A (orgânica) e B (aquosa) foram solubilizados em acetona e água, respectivamente. Após, através de funil, a fase orgânica foi vertida sobre a aquosa sob agitação moderada, seguida de evaporação do solvente através de destilação à pressão reduzida em evaporador rotatório. No estudo de determinação da quantidade de solvente a ser utilizada, foram testadas quantidades crescentes de acetona e água respectivamente nas proporções 1:2, 2:4 e 3:6 vezes o volume final da nanoemulsão a ser preparada. Todas as formulações foram preparadas em lotes de 5 mL de volume final. O diâmetro médio de partícula e o potencial zeta foram determinados através de espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética utilizando os equipamentos Nanosizer (ND4, Coultronics, França) e Zetasizer (Malvern Instruments, U.K.), respectivamente, 24 horas após a preparação das nanoemulsões. As amostras do estudo de estabilidade foram armazenadas a 4, 25 e 45 °C durante 60 dias e avaliadas quanto ao diâmetro médio de partícula. Todas as análises foram realizadas em triplicata após diluição (1:200) em glicerol 2,25 %.

Tabela 1. Composição final (%) das formulações preparadas na ausência (NE_0) ou na presença de estearilamina (NE_{SA})

Fase	Componentes	NE_0	NE_{SA}
	Lipoid E-80	2,00	2,00
A	TCM	7,50	7,50
	Estearilamina	-	0,50
	Poloxâmero	1,68	1,68
B	Glicerol	2,25	2,25
	Água q.s.p	100,0	100,0

Marcação do ON com o ^{33}P: O ON modelo, politimidilato de 16 bases (pdT_{16}), foi sintetizado seguindo a seguinte metodologia, previamente descrita[6]: 5 µL da solução de ON (10 µM), 1 µL de T4 polinucleotídeo quinase e 1 µL de ^{33}P-ATP foram incubados durante 30 min, à temperatura de 37 °C. O final da reação foi obtido através do aquecimento, durante 15 min a 80 °C, com o objetivo de desnaturar a enzima responsável pela reação (quinase). O ON radiomarcado, ^{33}P-pdT_{16} foi purificado em coluna de exclusão molecular, seguido de centrifugação a 2400 rpm durante 1 min. A pureza do ON marcado ao ^{33}P foi verificada em gel de poliacrilamida[6].

Preparação e caracterização das nanoemulsões contendo ON (pdT_{16}): A associação do ON pdT_{16} às nanoemulsões (NE_0 e NE_{SA}) foi realizada de duas maneiras distintas. O ON (pdT_{16}) foi adicionado por simples mistura as nanoemulsões previamente preparadas ou durante a etapa de emulsificação solubilizado na fase aquosa. Nos dois casos, foi realizada uma mistura com ON radiomarcado (^{33}P-pdT_{16}) e não radiomarcado obtendo-se uma concentração final de 10 µM. Após 12 h de incubação, alíquotas de 200 µL foram submetidas à ultrafiltração/ centrifugação (membranas de celulose regenerada 30.000 Da, Millipore, França) e a radioatividade determinada por cintilação líquida no ultrafiltrado obtido. A taxa de associação dos ON as nanoemulsões foi estimada por diferença entre a quantidade determinada na amostra antes e após a ultrafiltração/centrifugação. A seleção da membrana de ultrafiltração foi realizada, previamente ao estudo de ultrafiltração, por meio da determinação da taxa de recuperação dos ON através de diferentes membranas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários fatores podem influenciar o diâmetro de partícula de emulsões obtidas pela técnica de emulsificação espontânea, entre eles, a velocidade de migração do solvente orgânico na fase aquosa, a concentração de fase oleosa e o volume de cada uma das fases[11]. Neste estudo, o uso de volumes crescentes das fases, aquosa e orgânica, foi realizado com o objetivo de se obter nanoemulsões com reduzido diâmetro de partícula, comparável com a técnica de microfluidização. A fig. 1 demonstra a necessidade de utilização de elevadas quantidades de solventes para a obtenção de nanoemulsões de diâmetro de cerca de 200 nm. A relação de fases (3:6), utilizada na preparação das nanoemulsões, é superior àquelas utilizadas por outros autores[12-13] na obtenção de nanoestruturas de diâmetro equivalente, o que pode ser explicado pela elevada concentração de fase oleosa das nanoemulsões em estudo (10 %).

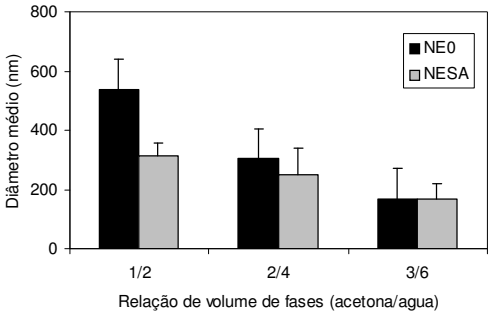

Figura 1. Diâmetro médio de partícula das nanoemulsões (NE_0 e NE_{SA}) em função do volume de fase aquosa e orgânica utilizada no procedimento de emulsificação espontânea.

O diâmetro médio de partícula e o potencial zeta das nanoemulsões na presença ou na ausência de estearilamina estão apresentados na tab. 2. Observa-se que o diâmetro médio de partícula é de cerca de 170 nm, independente da presença ou da ausência do lipídeo catiônico estearilamina, sendo este parâmetro fortemente influenciado pelo procedimento de emulsificação espontânea. Estes resultados estão em acordo com aqueles publicados por Trimaille e col.[14] que relataram o desenvolvimento de nanoemulsões, por emulsificação espontânea apresentando diâmetro de partícula de cerca de 200 nm.

A carga de superfície pode influenciar positivamente a estabilidade dos sistemas coloidais uma vez que os fenômenos de coalescência podem ser minimizados por forças de repulsão entre as partículas. A tab. 2 apresenta os resultados de potencial zeta das formulações NE_0 e NE_{SA} antes da associação do ON (pdT_{16}). Observa-se um potencial zeta negativo para a formulação NE_0 (~ -8 mV) demonstrando a carga relativa à presença de fosfolipídeos (Lipoid E-80) na interface O/A[15]. Em contrapartida, a adição de

Tabela 2. Diâmetro médio de partícula, potencial zeta e taxa de associação do ON modelo pdT_{16} (10 μM) às nanoemulsões preparadas em ausência (NE_0) ou presença de estearilamina (NE_{SA}) por incubação ou durante o procedimento de emulsificação.

	NE_0			NE_{SA}		
Adição PdT_{16}	-	Incubação	Emulsificação	-	Incubação	Emulsificação
Diâmetro médio (nm)	169±40	173±53	179±53	166±55	169±54	177±55
Potencial zeta (mV)	-8,3±1,5	-12,7±1,4	-10,1±1,4	30,5±5,6	29,8±1,5	32,3±2,1
Taxa de associação (%)	-	72±3	70±3	-	96±8	91±2

estearilamina confere à formulação NE_{SA} um potencial zeta de cerca de 30 mV. A estearilamina é um lipídeo catiônico que apresenta um pka de 10,6[16] conferindo assim uma carga global positiva, no pH de preparação das formulações (pH 7,4), devido ao seu grupamento amônio quaternário.

A fig. 2 apresenta o diâmetro médio de partícula das nanoemulsões armazenadas durante 60 dias em diferentes temperaturas. Os resultados demonstraram a manutenção do diâmetro médio de partícula para as nanoemulsões NE_0 e NE_{SA} armazenadas nas temperaturas de 4 e 25 °C. Entretanto, somente a nanoemulsão NE_{SA} permanece com o seu diâmetro de partícula inalterado durante o tempo de estudo em elevadas temperaturas. Este resultado evidencia a influência do tensoativo catiônico estearilamina na estabilidade das nanoemulsões, possivelmente em decorrência da repulsão eletrostática conferida pela carga superficial positiva (potencial zeta de 30 mV), conforme apresentado na tab. 2 e descrito em outros trabalhos[6,10,16]. Korner e col.[17] justificam também a elevada estabilidade de nanoemulsões catiônicas contendo estarilamina devido à elevada resistência mecânica do filme formado na interface água/óleo decorrente das fortes interações entre a fosfatidilcolina e a estearilamina.

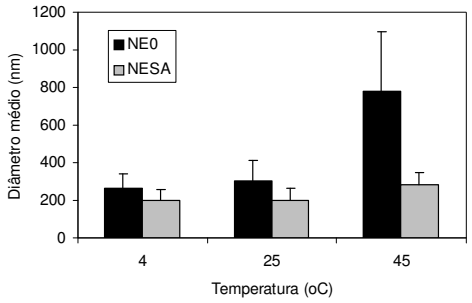

Figura 2. Diâmetro médio de partícula das nanoemulsões (NE_0 e NE_{SA}) após 60 dias de armazenamento em diferentes temperaturas (4, 25 e 45 °C)

O desenvolvimento de uma metodologia de ultrafiltração/centrifugação permitiu a determinação da taxa de associação dos ON às nanoestruturas. A tab. 2 demonstra uma taxa de associação de cerca de 70 % e de 95 % do ON pdT_{16} às formulações NE_0 e NE_{SA}, respectivamente, independente do procedimento de adição do ON à formulação. Este resultado demonstra a maior associação dos ON à formulação NE_{SA} devido às interações eletrostáticas entre os ON (carregados negativamente) e a estearilamina (carregada positivamente), através da formação de um par iônico na interface O/A[17].

A associação do ON pdT_{16} durante ou após o procedimento de emulsificação espontânea não conduziu a alterações marcantes do diâmetro médio de partícula e do potencial zeta das formulações NE_0 e NE_{SA}, como pode ser observado na tab. 2. Essas observações devem estar relacionadas com a concentração de ON utilizada neste estudo (10 μM). Teixeira e col.[6] verificaram o aumento do diâmetro de partícula e a redução do potencial zeta de nanoemulsões, preparadas por microfluidização, somente após a associação de elevadas concentrações de ON na interface O/A (~200 μM).

Em conclusão, este trabalho demonstra a viabilidade da preparação de nanoemulsões, em escala de bancada, na ausência (NE_0) ou na presença do lipídeo catiônico estearilamina (NE_{SA}), através da técnica de emulsificação espontânea. A eficiência de associação do ON modelo, pdT_{16}, e a estabilidade do sistema desenvolvido são influenciados pela presença do lipídeo catiônico estearilamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 HÉLÈNE, C.; TOULMÉ, J.J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigen nucleic acids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1049, p. 99-125, 1990.

2 ROJANASAKUL, Y. Antisense oligonucleotide therapeutics: drug delivery and targeting. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.18, p. 115-131, 1996.

3 MULAMBA, G.B.; HU, A.; AZAD, R.F.; ANDERSON K.P.; COEN, D.M. Human cytomegalovirus mutant with sequence-dependent resistance to the phosphorothioate fomivirsen (ISIS 2922). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p. 971-973, 1998.

4 LAPPALAINEN, K.; URTTI, A.; SÖDERLING, E.; JÄÄSKELÄINEN, I.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1196, p. 201-208, 1994.

5 EDER, P.S.; DEVINE, R.J.; DAGLE J.M.; WALDER, J.A. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by 3' exonuclease in plasma. **Antisense Res. Dev.***,* v.1, p. 141-151, 1991.

6 TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicron cationic emulsions as a new delivery system of oligonucleotides. **Pharm. Res.**, v.16, p. 30-36, 1999.

7 TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; DEVERRE, J.R.; SCHERMAN, D.; BENITA S.; COUVREUR, P. Factors influencing the oligothymidilates release from O/W cationic emulsions. **J. Contr. Release**, v.70, p. 243-255, 2001.

8 TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; BOUTET, V.; DEVERRE, J.R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. (Aceito para publicação no **J. Contr. Release**)

9 KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. (ed.). **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. [s.l.]: Harwood, 1998.

10 TAMILVANAN, S.; KHOURNY, H.; GILHAR, D.; BENITA, S. Ocular delivery of cyclosporin A: design and characterization of cyclosporin A - loaded positively-charged submicron emulsion. **S. T. P. Pharma Sciences**, v.11, n. 6. p. 421-426, 2001.

11 MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physico-chemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.**, v.89, p. 614-626, 2000.

12 CALVO, P.; VILA-JATO, J.; ALONSO, M. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p. 530-576, 1996.

13 CALVO, P. *et al.* Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.48, p. 1147-1152, 1996.

14 TRIMAILLE, T.; CAHIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid Polym. Sci.**, v.279, p. 784-792, 2001.

15 WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.20, p. 131-145, 1996.

16 KLANG, S. H.; FRUCHT-PERY, A.; HOFFMAN, A.; BENITA. S. Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle. **J. Pharm. Pharmacol**., v.46, p. 986-993, 1994.

17 KORNER, D.; BENITA, S.; ALBRECHT, G.; BASZKIN, A. Surface properties of mixed phospholipid-stearylamine monolayers and their interaction with a non-ionic surfactant (poloxamer). **Col. Surfaces**, v.3, p. 101-109, 1994.

Endereço para correspondência:

Prof.Dr. Helder Teixeira
Faculdade de Farmácia/UFRGS
Av. Ipiranga, 2752
90610-000 Porto Alegre RS
e-mail: helderteixeira_fr@yahoo.fr