

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA DE DAPSONA

Guilherme Soares dos Santos, Gabriela Garrastazu Pereira, Eduardo André Bender, Letícia Marques Colomé\* e Sílvia Stanisçuaski Guterres

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

Daniel Canema Manhães de Carvalho e Gilberto Weissmüller

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 737, Cidade Universitária, 21941-599 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 26/10/11; aceito em 3/3/12; publicado na web em 15/6/12

## DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF LIPID NANOPARTICLES FOR DAPSONE TOPICAL APPLICATION.

In this work, theospheres (innovative lipid nanoparticles) were prepared by the high pressure homogenization technique using different surfactants for dapsone encapsulation. Mean particle size ranged from 105 to 153 nm and negative zeta potentials were obtained for all theosphere formulations. Atomic force microscopy images confirmed the spherical shape of theospheres. The HPLC method used to determine dapsone-loaded theospheres was selective, linear, exact and precise. The entrapment efficiency of dapsone was 91.4%. Theospheres provided controlled release of idebenone ( $52.7 \pm 1.6\%$ ) in comparison to the free drug ( $103.1 \pm 1.9\%$ ).

Keywords: lipid nanoparticles; dapsone; *in vitro* release study.

## INTRODUÇÃO

A dapsona (4-4'-diaminofenilsulfona) (Figura 1) é uma sulfona que possui dupla atividade - antimicrobiana e anti-inflamatória/imunomoduladora. Devido a esta dupla ação, a dapsona é utilizada como terapia única ou em conjunto com outros fármacos no tratamento de doenças provocadas por patógenos (a exemplo de hanseníase e pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*) e doenças inflamatórias crônicas, especialmente as dermatológicas.<sup>1</sup> Adicionalmente, dapsona tem demonstrado ser eficiente na inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS), mostrando-se tão eficaz quanto catalase na redução dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tão potente quanto colchicina, benzoato e xantina na redução dos níveis de OH<sup>-</sup> em ensaios *in vitro*.<sup>2</sup>

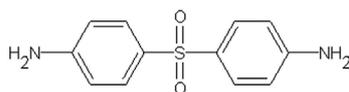


Figura 1. Estrutura química da dapsona

Quando administrada por via oral, dapsona é metabolizada originando hidroxilaminas, responsáveis por efeitos adversos importantes como hemólise e metemoglobinemia. A hemólise caracteriza-se pela ruptura da membrana plasmática das hemácias levando ao rompimento destas células, enquanto a metemoglobinemia é uma condição em que a hemoglobina perde a capacidade de se ligar ao oxigênio e transportá-lo.<sup>3</sup> Ambas as condições são observadas em todos os pacientes tratados com dapsona por via oral. Além disso, a administração sistêmica de dapsona reduz o tempo de meia-vida dos eritrócitos e pode levar à hemólise grave em pacientes que apresentam deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. Outros efeitos colaterais menos frequentes observados com este tratamento incluem reações idiossincráticas como agranulocitose, erupção cutânea, leucopenia, neuropatia periférica, além de sintomas neurológicos e gastrointestinais.<sup>4</sup>

Estudos já demonstraram equivalência na atividade da dapsona aplicada topicamente (0,1; 0,5; 1; 5 e 10%) e sistemicamente (100 mg/dia) na supressão de eritema cutâneo causado por radiação UVB em voluntários saudáveis.<sup>2</sup> Assim, uma abordagem para reduzir os efeitos colaterais é a administração de dapsona diretamente na área afetada. A aplicação cutânea pode fornecer concentrações eficazes da dapsona no tecido alvo e reduzir a exposição sistêmica ao fármaco,<sup>4</sup> diminuindo a gravidade dos efeitos colaterais. Embora a administração tópica não seja ideal para o tratamento da hanseníase ou como terapia única para a dermatite herpetiforme, outras patologias de pele que conhecidamente respondem ao tratamento com dapsona, tais como vasculite leucocitoclástica, artrite reumatoide e lúpus eritematoso, poderiam ser adequadamente tratadas através da administração tópica deste fármaco.<sup>4</sup> Uma formulação tópica em gel já demonstrou ser uma opção segura, dispensando o monitoramento da anemia hemolítica, mesmo em pacientes com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase.<sup>5,6</sup>

Ainda que o tratamento tópico de doenças da pele seja favorável devido ao menor risco de efeitos colaterais sistêmicos, o estrato córneo representa uma barreira à penetração de xenobióticos na pele viável.<sup>7</sup> Assim, sistemas carreadores podem ser uma opção para melhorar a penetração de diversas substâncias na pele.<sup>8</sup> Uma vez que lipídeos epidérmicos são o constituinte primordial da barreira de penetração tópica, carreadores baseados em lipídeos podem aderir-se à superfície da pele e permitir a interação entre os constituintes do carreador e aqueles das camadas mais externas do estrato córneo, favorecendo a permeação.<sup>9</sup> Neste contexto, nanopartículas lipídicas têm sido utilizadas para promover a permeação cutânea de antioxidantes,<sup>10-12</sup> anti-inflamatórios não esteroidais,<sup>13-15</sup> glicocorticoides<sup>16,17</sup> e hormônios.<sup>8</sup>

Nanopartículas lipídicas são sistemas coloidais compostos por lipídeos de elevado ponto de fusão (incluindo triglicerídeos, ácidos graxos e ceras) formando um núcleo sólido à temperatura ambiente, o qual é revestido por moléculas de tensoativos.<sup>18</sup> Estes sistemas conferem proteção a compostos lábeis contra degradação química e possibilitam a liberação controlada da substância encapsulada, representando uma alternativa a lipossomas e nanopartículas poliméricas, uma vez que podem contornar limitações existentes quanto à estabilidade e

\*e-mail: leticia.colome@unipampa.edu.br

biocompatibilidade.<sup>19</sup> Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu as teosferas, que são nanopartículas lipídicas inovadoras destinadas à aplicação tópica, apresentando como principais componentes a manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e o óleo de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*).<sup>20</sup> A manteiga de cupuaçu apresenta uma diversidade de compostos interessantes para administração tópica, tais como ácidos graxos insaturados, aminoácidos e vitaminas.<sup>21</sup> Também possui dois flavonoides glicosídicos específicos (teograndinas I e II) e flavonoides antioxidantes (catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol).<sup>22</sup> O óleo de castanha do Brasil apresenta compostos como ácidos palmítico, esteárico, linoleico, mirístico, dentre outros, que também se caracterizam como substâncias interessantes para aplicação tópica cutânea.<sup>23,24</sup>

Assim, o objetivo deste trabalho foi preparar diferentes formulações de teosferas, a fim de selecionar um sistema adequado para encapsulação de dapsona visando sua aplicação tópica cutânea. Foram realizados ensaios para a caracterização físico-química das teosferas sem fármaco e contendo dapsona e avaliação da liberação *in vitro* do fármaco a partir destes sistemas. Embora a literatura já tenha descrito métodos para a quantificação da dapsona, estes estudos tiveram seu foco na identificação de produtos de degradação,<sup>25</sup> na avaliação da estabilidade<sup>26</sup> ou, ainda, na determinação de dapsona e seus metabólitos em músculo,<sup>27</sup> plasma<sup>28</sup> e urina,<sup>29</sup> em estudos envolvendo a avaliação biológica do fármaco em humanos ou animais. Assim, o presente trabalho trata ainda do desenvolvimento e validação de um método analítico baseado em cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de dapsona nas teosferas e nas alíquotas provenientes do estudo de liberação.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

A dapsona (4-4'-diaminofenilsulfona, aproximadamente 99% de pureza) foi adquirida da Henrifarma (Brasil). A manteiga de cupuaçu e o óleo de castanha do Brasil foram gentilmente doados pela Inovam (Brasil). Imidazolidinil uréia e butil-hidroxitolueno foram adquiridos da Delaware (Brasil). Lipoid S-45 (lecitina de soja) foi adquirido da Lipoid (Alemanha). Poloxamer 188 foi adquirido da Sigma (EUA). Mono-oleato de sorbitano foi doado pela Oxiteno (Brasil). Polissorbato 80, polissorbato 20 e propilenoglicol foram adquiridos da Synth (Brasil). Água ultrapura foi fornecida por sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, EUA). Acetonitrila grau HPLC foi adquirida da Tedia (EUA).

### Preparação das teosferas

As teosferas foram preparadas pela técnica de homogeneização à alta pressão, utilizando o equipamento Panda 2K NS 1001L (Niro

Soavi, Itália) a 500 bar e com 3 ciclos de homogeneização. A fase oleosa foi composta pela manteiga de cupuaçu (formulações M) ou pela mistura da manteiga de cupuaçu com o óleo de castanha (formulações MO). Diferentes tensoativos foram utilizados no desenvolvimento das formulações, originando os sistemas denominados M-1 a M-3 e MO-1 a MO-3 (Tabela 1) com o objetivo de preparar sistemas lipídicos com constituição adequada para utilização tópica. Para tanto, foram eleitos materiais reconhecidamente biocompatíveis e sem risco de toxicidade, considerando a via de aplicação pretendida.

### Incorporação de dapsona nas teosferas

Dentre as formulações preparadas na etapa descrita anteriormente, um sistema foi selecionado com base em suas características físico-químicas para a incorporação da dapsona. Teosferas contendo dapsona (2,5 mg/mL) foram preparadas de maneira semelhante à anteriormente descrita, mediante a adição da dapsona na fase oleosa da formulação, devido ao caráter lipofílico do fármaco.

### Caracterização físico-química das teosferas

Todas as formulações de teosferas foram caracterizadas em termos de tamanho de partícula, distribuição de tamanho (índice de polidispersão - PDI), potencial zeta, pH e viscosidade. Foram realizadas análises de tamanho de partícula por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e a avaliação do potencial Zeta foi feita através de mobilidade eletroforética, ambas à temperatura de 25 °C utilizando o equipamento Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram determinados com amostras diluídas (500 vezes) com água Milli Q. A análise do potencial zeta foi realizada após diluição das amostras (500 vezes) com solução de NaCl 10 mM.

O tamanho de partícula foi avaliado ainda pela técnica de difratometria de laser (LD) utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), para detectar a possível presença de micropartículas. Os dados de difração de laser obtidos foram avaliados utilizando o valor  $d_{4,3}$ , que representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e, ainda, os valores de 10, 50 e 90% da distribuição ( $d_{10\%}$ ,  $d_{50\%}$  e  $d_{90\%}$ , respectivamente) que indicam a percentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do *Span* (Equação 1), que é um indicativo da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad (1)$$

Além destas análises, a avaliação reológica das formulações foi realizada em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV II + Pro,

**Tabela 1.** Composição quali-quantitativa (% p/p) das formulações de teosferas

Componentes	Formulações					
	M-1	MO-1	M-2	MO-2	M-3	MO-3
Manteiga de cupuaçu	10	5	10	5	10	5
Óleo de castanha	-	5	-	5	-	5
Butil-hidroxitolueno	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Imidazolidinil uréia	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lecitina de soja	3	3	-	-	3	3
Poloxamer 188	2	2	-	-	-	-
Mono-oleato de sorbitano	-	-	2	2	-	-
Polissorbato 80	-	-	2	2	2	2
Água ( <i>qsp</i> )	100	100	100	100	100	100

utilizando o *spindle* ULA (Brookfield, EUA). Os valores de pH das suspensões foram determinados em potenciômetro B474 (Micronal, Brasil). Estas avaliações foram realizadas com as suspensões de teosferas sem preparação prévia das amostras.

### Validação do método analítico para quantificação de dapsona

Para a quantificação da dapsona presente na formulação selecionada foi empregada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Perkin-Elmer Série 200 (Perkin-Elmer Instruments, EUA), equipado com detector UV e coluna LiChrospher® RP-18 (5 µm, 250 x 3 mm, Merck, Alemanha) em comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel foi composta de acetonitrila:água (75:25) acidificada com ácido acético glacial 1,5% v/v, em sistema isocrático a um fluxo de 0,7 mL/min. O método para quantificação da dapsona foi validado em termos de especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão.<sup>30</sup>

#### Especificidade

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da análise das suspensões de teosferas sem fármaco, a fim de verificar a possível interferência dos excipientes da formulação na quantificação da dapsona. Analogamente, o meio utilizado nos ensaios de liberação *in vitro* foi avaliado para detectar possíveis interferências na quantificação das alíquotas provenientes da liberação *in vitro*, especialmente devido à presença de tensoativo.

#### Linearidade

Curvas de concentração em função da área do pico foram obtidas utilizando soluções padrão de dapsona em acetonitrila nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. Para cada solução, 3 replicatas foram obtidas, construindo-se 3 curvas diferentes. A análise da regressão linear na faixa de concentração testada foi utilizada para avaliar a linearidade do método.

#### Limites de detecção e quantificação

Após a construção das três curvas anteriormente descritas, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados diretamente a partir da inclinação ( $\sigma$ ) e do desvio padrão do intercepto (DP) obtidos. Os limites de detecção e de quantificação foram expressos, respectivamente através das Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{\sigma} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{\sigma} \quad (3)$$

#### Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão do método analítico foi determinada por medidas da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A repetibilidade foi avaliada pela determinação de 6 diferentes amostras de suspensão de teosferas com a mesma concentração (12,5 µg/mL de dapsona), analisadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada de modo análogo, realizando-se a avaliação de diferentes amostras em 3 dias consecutivos ( $n = 3$  em cada dia). Para a análise, as suspensões foram diluídas em acetonitrila, mantidas sob agitação magnética por 30 min e centrifugadas a 10.000 rpm para permitir a extração do fármaco a partir dos coloides. Uma alíquota do sobrenadante foi coletada, diluída em acetonitrila e analisada por CLAE. As concentrações obtidas a partir da análise das diferentes amostras

foram comparadas e a precisão (intradia e interdia) foi expressa como desvio padrão relativo em percentual (DPR %).

#### Exatidão

Para a determinação da exatidão, amostras de suspensões de teosferas foram contaminadas com quantidades adicionais diferentes de dapsona totalizando concentrações finais de 10, 15 e 25 µg/mL, as quais correspondem a três diferentes níveis (baixo, médio e alto). As amostras foram preparadas de modo similar ao descrito para a avaliação da precisão, sendo realizadas em triplicata para cada concentração. A exatidão foi expressa como porcentagem de dapsona recuperada (R %), que corresponde à média dos valores obtidos para cada concentração.

#### Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da dapsona nas teosferas foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação (Amicon Ultrafree CL, 10.000 MW, Millipore, Japão). A porcentagem da dapsona encapsulada foi calculada pela diferença entre a concentração total na formulação (medida após a desestruturação das partículas em acetonitrila) e a concentração livre de dapsona presente na fase aquosa (determinada no ultrafiltrado da suspensão de teosferas) dividida pela concentração total multiplicada por 100. A quantificação da dapsona total e presente na fase aquosa externa foi realizada pela metodologia validada por CLAE.

#### Avaliação morfológica das teosferas

As teosferas foram avaliadas por microscopia de força atômica (Microscópio MFP-3D AFM, Asylum Research, EUA) no Instituto de Biofísica Carlos Chagas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para a análise, a suspensão de teosferas foi diluída em água na proporção de 1:200 e posteriormente depositada sobre mica clivada, sendo lavada com 10 µL de água Milli Q. As imagens foram adquiridas no modo água/contato, utilizando o *cantilever* modelo NPS D4 (Veeco Probes, Canadá). A constante de força usada foi de 0,08 N/m e as amostras foram analisadas com uma frequência constante de 0,6 Hz, com o intuito de reduzir os interferentes e minimizar os danos na imagem.

#### Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* da dapsona foi realizado pelo método de diálise. Oito mL da formulação de teosferas contendo dapsona e o mesmo volume da dapsona na forma livre (solução aquosa de propilenoglicol 50%, v/v) foram colocados em sacos de diálise (12.000-14.000 Da) (Sigma, EUA). As membranas de diálise foram incubadas em 150 mL de meio de liberação constituído de solução aquosa de polissorbato 20 a 2% (p/v) a 32 °C, com agitação contínua. Alíquotas (2 mL) do meio de liberação foram coletadas nos intervalos de tempo de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10 e 12 h. O meio de liberação foi repostado a cada coleta. A quantidade de dapsona liberada foi avaliada por metodologia previamente validada por CLAE.

A modelagem matemática dos dados foi empregada para analisar os perfis de liberação da dapsona livre e contida nas teosferas. Foram utilizados os modelos monoexponencial (Equação 4) e biexponencial (Equação 5). A adequabilidade do modelo aos dados experimentais foi avaliada com auxílio do programa MicroMath Scientist®, comparando-se os modelos entre si com base em parâmetros como critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação ( $r$ ) e ajuste gráfico. Adicionalmente, o tempo de meia-vida dos processos de liberação do fármaco a partir das teosferas e difusão deste através da membrana de diálise foram avaliados (Equação 6).

$$\%_{lib} = 100 \times (1 - \exp^{-k_1 t}) \quad (4)$$

$$\%_{lib} = 100 \times [1 - (A \cdot \exp^{-k_1 t} + B \cdot \exp^{-k_2 t})] \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (6)$$

onde:  $\%_{lib}$  é a concentração de fármaco (em percentual) liberada no tempo  $t$ ;  $k$ ,  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes cinéticas;  $A$  e  $B$  correspondem à concentração inicial de fármaco;  $t_{1/2}$  é o tempo de meia-vida do processo de liberação e/ou difusão.

### 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

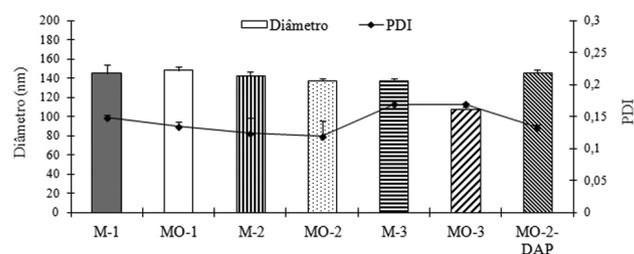
### Validação do método analítico

Visando confiabilidade na quantificação de dapsona encapsulada nas teosferas, bem como na avaliação da liberação do fármaco *in vitro*, o método analítico foi validado. O estudo da linearidade foi realizado através de análise de variância, verificando-se regressão linear significativa ( $p < 0,01$ ) com injeção de concentrações compreendidas entre 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ . O coeficiente de correlação encontrado para a curva média foi de 0,9965 ( $y = 91453x + 187722$ ) confirmando a linearidade da curva. Os valores de LD e LQ calculados foram 0,22 e 0,66  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, indicando a sensibilidade do método para a quantificação da dapsona nas teosferas e nos ensaios de liberação. O método foi validado ainda em termos de repetibilidade (DPR = 4,4%), precisão intermediária (DPR = 3,3%) e exatidão ( $R = 108,7\%$ ). A especificidade do método foi avaliada por meio da análise das suspensões de teosferas sem fármaco e do meio de liberação (solução aquosa de polissorbato 20 5% p/v). Os cromatogramas obtidos não apresentaram sobreposição de picos no tempo de retenção característico da dapsona (6,5 min), demonstrando a especificidade do método.

### Caracterização físico-química das suspensões de teosferas

Nanopartículas lipídicas têm sido amplamente utilizadas com a finalidade de promover a permeação de fármacos através da pele, uma vez que estes sistemas podem ultrapassar a barreira imposta pela camada córnea.<sup>9</sup> Assim, este trabalho desenvolveu nanopartículas lipídicas inovadoras (teosferas) com o intuito de encapsular a dapsona e disponibilizá-la em uma formulação viável e segura para administração tópica cutânea. Teosferas sem fármaco, constituídas de manteiga de cupuaçu misturada ou não ao óleo de castanha do Brasil, foram preparadas através do método de homogeneização à alta pressão utilizando diferentes sistemas tensoativos (Tabela 1). Todas as formulações obtidas apresentaram tamanho nanométrico e valores de PDI inferiores a 0,2, indicando uma estreita distribuição de tamanho (Figura 2).

As formulações de teosferas M-1, MO-1, M-2, MO-2, M-3 e MO-3 apresentaram tamanho médio de partícula de  $145,1 \pm 8,5$ ,  $148,1 \pm 3,5$ ,  $142,5 \pm 4,7$ ,  $137,2 \pm 2,5$ ,  $137,3 \pm 2,0$  e  $107,4 \pm 2,2$  nm, respectivamente. Formulações preparadas utilizando manteiga de cupuaçu com principal componente lipídico (grupo M) não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) em termos de diâmetro médio, independente do sistema tensoativo utilizado. Contudo, as formulações constituídas



**Figura 2.** Tamanho médio das teosferas e índice de polidispersão (PDI) determinado por PCS

por manteiga de cupuaçu e óleo de castanha do Brasil (grupo MO) apresentaram menor diâmetro médio ( $p < 0,05$ ) com a utilização dos sistemas tensoativos lecitina/polissorbato 80 (formulação MO-3). Este resultado pode representar a maior efetividade deste sistema tensoativo em obter diâmetros de partícula reduzidos, a qual foi demonstrada na formulação contendo óleo, que possui uma matriz lipídica menos cristalina devido à presença do lipídeo líquido.<sup>31</sup>

Adicionalmente, a técnica de difratometria de laser foi empregada para avaliar a possível presença de micropartículas nas formulações de teosferas (Tabela 2), já que o método de PCS é limitado para detectar partículas micrométricas.<sup>32</sup> Os resultados obtidos indicam que o diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada não excedeu 248 nm ( $0,248 \mu\text{m}$ ) e nenhuma partícula de tamanho micrométrico foi detectada, considerando todas as formulações preparadas. Os valores de *Span*, o qual é um indicativo da amplitude da distribuição granulométrica, demonstraram uma estreita distribuição de tamanho, uma vez que quanto menor os valores de *Span*, mais estreita é a distribuição.<sup>32</sup> Além disso, valores de  $d_{4,3}$ , que representam o diâmetro médio em volume, foram similares aos obtidos por PCS para todas as formulações preparadas de teosferas.

**Tabela 2.** Distribuição granulométrica das teosferas em micrômetros e valores de *Span* obtidos por difratometria de laser

Teosferas	$d_{10}^a$	$d_{50}^b$	$d_{90}^c$	$d_{4,3}^d$	<i>Span</i> <sup>e</sup>
M-1	0,066	0,129	0,248	0,149	1,423
MO-1	0,063	0,119	0,213	0,129	1,260
M-2	0,068	0,124	0,217	0,136	1,208
MO-2	0,074	0,127	0,211	0,136	1,074
M-3	0,071	0,128	0,223	0,142	1,187
MO-3	0,076	0,113	0,169	0,118	0,830

<sup>a</sup>diâmetro de partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada;

<sup>b</sup>diâmetro de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada;

<sup>c</sup>diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada;

<sup>d</sup>diâmetro médio em volume; <sup>e</sup>dispersão granulométrica.

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano de cisalhamento e sua análise pode prever a estabilidade física de sistemas coloidais. De acordo com a literatura, valores de potencial zeta em torno de  $|30|$  mV demonstram uma boa estabilidade física do sistema coloidal durante a estocagem, sendo este valor considerado ótimo quando atinge valores próximos a  $|60|$  mV.<sup>33</sup> Neste estudo, as teosferas pertencentes ao grupo 1 (M-1 e MO-1) apresentaram valores de potencial zeta elevados, sendo os maiores registrados (Tabela 3). Estes valores eram esperados para estes sistemas e são atribuídos à presença de lecitina que se encontra, provavelmente, recobrindo as partículas.<sup>34</sup>

Comportamento semelhante foi observado para as formulações do grupo 3 (M-3 e MO-3), também constituídas por lecitina, no entanto para este grupo foram verificados valores inferiores àqueles observados no grupo anteriormente citado, o que se deve provavelmente

**Tabela 3.** Características físico-químicas (pH, viscosidade e potencial zeta) das formulações de teosferas

Formulações	pH	Viscosidade (cP)	Potencial zeta (mV)
M-1	5,69	3,0	-50,6 ± 2,0
MO-1	5,72	3,1	-66,4 ± 2,2
M-2	5,64	2,1	-16,9 ± 0,7
MO-2	5,66	2,0	-39,8 ± 5,6
M-3	5,64	2,1	-41,0 ± 1,4
MO-3	5,20	2,1	-29,0 ± 1,5
MO-2-DAP	5,80	2,1	-16,9 ± 1,0

à presença adicional do polissorbato 80, tensoativo não iônico que atua por estabilização estérica e provoca uma redução no potencial conferido pela lecitina.<sup>33</sup> Esta redução poderia ser esperada também para as formulações do grupo 1, uma vez que a presença de poloxamer 188 como estabilizador estérico pode reduzir o potencial zeta, devido a modificações no plano de cisalhamento na superfície das partículas. No entanto, teosferas do grupo 1 apresentaram potencial zeta bastante elevado, de modo semelhante ao observado em outros estudos<sup>20,33</sup> que utilizaram os mesmo tensoativos – lecitina e poloxamer 188.

As formulações do grupo 2 (M-2 e MO-2), constituídas por dois tensoativos não iônicos (mono-oleato de sorbitano e polissorbato 80), apresentaram valores de potencial zeta elevados, o que não é comum com o uso de tensoativos deste tipo. Contudo, tal fenômeno pode ser atribuído à formação de pontes de hidrogênio entre os grupos da cadeia polietilênic e interações dipolo-dipolo, resultando em valores negativos de potencial zeta.<sup>35</sup>

A caracterização reológica das suspensões de teosferas demonstrou que todas as formulações apresentam comportamento Newtoniano (dados não mostrados). A viscosidade das formulações foi avaliada (Tabela 3), não sendo verificada diferença entre os valores obtidos para as diferentes formulações. Os valores variaram de 2,0 a 3,1 cP. Quanto ao pH (Tabela 3), as suspensões apresentaram valores que variaram entre 5,2 e 5,8, os quais são considerados adequados para aplicação tópica cutânea.<sup>36</sup>

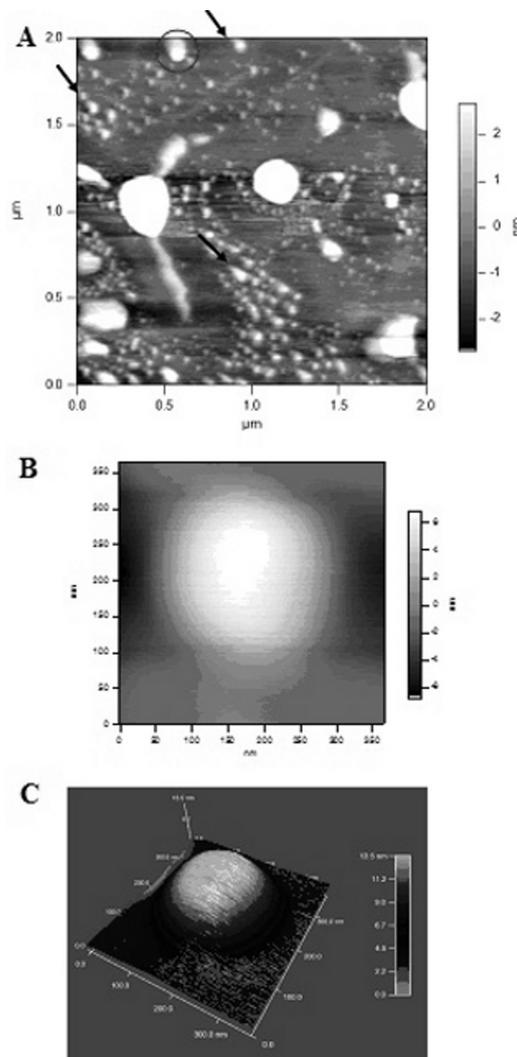
Levando-se em conta as características físico-químicas avaliadas para as teosferas, observou-se que todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico (inferior a 200 nm), adequada distribuição de tamanho, valores de pH e viscosidades bastante semelhantes e valores de potencial zeta que variaram de acordo com o sistema tensoativo utilizado. Para a escolha de uma formulação destinada à encapsulação da dapsona, primeiramente foram consideradas aquelas contendo óleo (formulações do grupo MO), as quais demonstram sabidamente probabilidade de maior encapsulação do fármaco, devido à presença de espaços amorfos na matriz lipídica.<sup>19</sup> A partir disso, considerando as formulações que apresentaram os menores diâmetros (formulações MO-2 e MO-3, Figura 2), aquela composta por mono-oleato de sorbitano e polissorbato 80 (MO-2) apresentou maior valor de potencial zeta e, teoricamente, maior estabilidade física<sup>32</sup> sendo eleita para a encapsulação da dapsona.

A formulação de teosferas contendo dapsona (2,5 mg/mL) (MO-2-DAP) foi preparada de modo análogo àquelas sem o fármaco, inserindo-a juntamente com os componentes lipídicos da formulação. A caracterização físico-química das teosferas de dapsona demonstrou valores semelhantes aos já apresentados para as partículas sem o fármaco, considerando características como tamanho de partícula (145,8 ± 3,3 nm, Figura 2), pH e viscosidade (Tabela 3). A incorporação de dapsona provocou, contudo, redução do potencial zeta (-39,8 ± 5,6 para -16,9 ± 1,0 mV), o que pode ser devido à ionização de grupamentos de moléculas do fármaco localizadas na superfície das partículas.

A eficiência de encapsulação da dapsona nas teosferas foi de 91,4%. Esse resultado era esperado uma vez que, em geral, fármacos lipofílicos como a dapsona ( $\log P = 0,97$ )<sup>37</sup> possuem compatibilidade adequada com lipídeos e geralmente são selecionados para incorporação dentro de nanopartículas lipídicas, obtendo-se elevada eficiência de encapsulação.<sup>38</sup>

### Avaliação morfológica das teosferas

Observando as imagens obtidas por microscopia de força atômica, é possível visualizar a formação de um sistema nanoparticulado pouco polidisperso (Figura 3A), formado por partículas que apresentaram tamanho na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos pelos métodos de PCS e LD. Tanto na imagem de fase (Figura 3B) quanto na imagem em três dimensões (Figura 3C), as quais mostram uma partícula única, pode-se observar o formato esférico das teosferas contendo dapsona. Estes achados diferiram de outros estudos em que formatos não esféricos ou quase esféricos foram demonstrados para nanopartículas lipídicas através de microscopia eletrônica de transmissão<sup>32</sup> e microscopia eletrônica de varredura utilizando criofratura.<sup>39</sup>



**Figura 3.** Imagem da distribuição de teosferas contendo dapsona secas em vácuo (o círculo indica a área onde foi realizada maior aproximação da imagem e as setas indicam partículas com tamanho na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos por PCS e LD) (A). Imagem da teosfera contendo dapsona (B) e imagem em 3D da mesma partícula (C)

### Estudo de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que a difusão da dapsona através da membrana de diálise, após sua liberação a partir das teosferas, ocorreu de forma sustentada, apresentando uma taxa de liberação/difusão de  $52,7 \pm 1,6\%$  em 12 h (Figura 4). Diferentemente, o fármaco livre apresentou uma taxa de difusão de  $103,1 \pm 1,9\%$  no mesmo período.

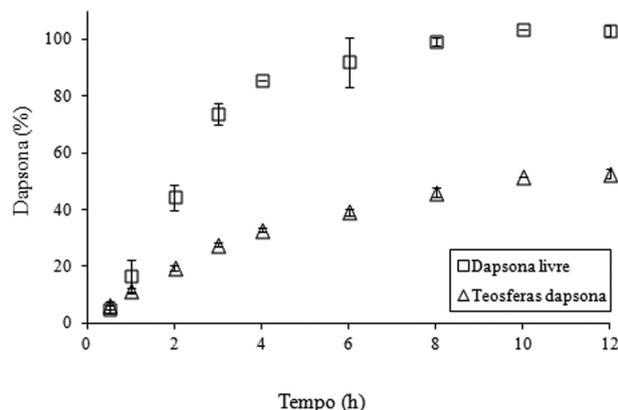


Figura 4. Perfil de liberação da dapsona livre e encapsulada nas teosferas

A liberação de um ativo a partir de um coloide é um processo bastante complexo, que pode ser afetado por diversos fatores, como degradação da matriz da partícula, cristalinidade do fármaco, afinidade entre o fármaco e a matriz coloidal, entre outros.<sup>40</sup> Devido à característica lipofílica da dapsona, este fármaco apresenta elevada afinidade pela matriz lipídica, o que é corroborado pelo valor obtido para a eficiência de encapsulação. Assim, o aprisionamento da dapsona na matriz lipídica pode explicar a menor taxa de liberação da dapsona contida nas teosferas quando comparada à dapsona livre. Essa característica pode ser vantajosa para a aplicação pretendida, uma vez que, além de atuar como uma barreira de permeação, a camada córnea se constitui em um reservatório de substâncias aplicadas topicamente, especialmente quando veiculadas em carreadores de fármacos.<sup>9</sup>

Os perfis de liberação *in vitro* foram analisados através de modelos matemáticos (Equações 4 e 5) e a escolha do modelo que melhor descreve os dados experimentais considerou o critério de seleção do modelo (MSC), o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o ajuste gráfico. O modelo mais adequado para descrever o perfil de difusão da dapsona livre foi o monoexponencial ( $r = 0,9930$ ;  $MSC = 2,6$ ). A constante cinética  $k$ , relativa ao processo de difusão, foi  $0,364 \text{ h}^{-1}$  e o tempo de meia-vida (Equação 6) foi de 1,9 h.

Por outro lado, o modelo biexponencial ( $r = 0,9988$ ;  $MSC = 5,16$ ) mostrou-se o mais adequado para descrever os fenômenos de liberação da dapsona a partir das teosferas, com consequente difusão através da membrana de diálise, demonstrando que o conjunto destes processos ocorre em duas velocidades distintas.<sup>41</sup> Neste caso, a fase de liberação rápida apresentou  $k_1 = 0,257 \text{ h}^{-1}$ , enquanto a fase de liberação lenta apresentou  $k_2 = 0,019 \text{ h}^{-1}$ . Os tempos de meia-vida observados para as fases rápida e lenta foram de 2,7 e 36,5 h, respectivamente, caracterizando a liberação sustentada da dapsona a partir das teosferas em relação ao fármaco livre. Além disso, o parâmetro  $A$ , que corresponde ao percentual de fármaco livre na formulação  $e/$  ou adsorvido na superfície das partículas, foi de 43%, demonstrando que a maior parte do fármaco (57%) está internalizada nas teosferas. Este resultado reforça a possibilidade da utilização das teosferas como um sistema reservatório para a liberação sustentada da dapsona no tecido cutâneo.

### CONCLUSÃO

Teosferas de tamanhos nanométricos foram preparadas com diferentes pares de tensoativos. Dentre as formulações desenvolvidas, aquela contendo o par de tensoativos mono-oleato de sorbitano e polisorbato 80 mostrou-se a mais adequada para incorporação do fármaco. A dapsona foi incorporada com alta eficiência de encapsulação e com manutenção do tamanho de partícula inicial. As teosferas demonstraram capacidade de garantir a liberação sustentada da dapsona quando comparadas ao fármaco livre. Assim, estes sistemas carreadores podem representar uma alternativa à utilização sistêmica de dapsona ou à formulação tópica convencional para o tratamento de patologias cutâneas.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo PDF, com acesso livre.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/MCT, ao INCT-IF/CNPq, à FINEP e à Rede Nanocosméticos CNPq/MCT.

### REFERÊNCIAS

- Cohen, J. B.; *Int. J. Dermatol.* **2002**, *41*, 182.
- Wozel, V. E. G.; *Dermatol. Clin.* **2010**, *28*, 599.
- Nascimento, T. S.; Pereira, R. O. L.; Mello, H. L. D.; Costa, J.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2008**, *58*, 651.
- Helton, D. R.; Osborne, D. W.; Pierson, S. K.; Buonarati, M. H.; Bethem, R. A.; *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 925.
- Draeos, Z. D.; Carter, E.; Maloney, J. M.; Elewski, B.; Poulin, Y.; Lynde, C.; Garrett, S.; Study, U. S. C. D. G.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 439.
- Lio, P. A.; Kaye, E. T.; *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2009**, *23*, 945.
- Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, L.; Gooris, G. S.; Ponc, M.; *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 1.
- Stecova, J.; Mehnert, W.; Blaschke, T.; Kleuser, B.; Sivaramakrishnan, R.; Zouboulis, C. C.; Selmann, H.; Korting, H. C.; Kramer, K. D.; Schafer-Korting, M.; *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 991.
- Schafer-Korting, M.; Mehnert, W. G.; Korting, H. C.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 427.
- Uner, M.; Wissing, S. A.; Yener, G.; Muller, R. H.; *Pharmazie* **2005**, *60*, 751.
- Mitri, K.; Shegokar, R.; Gohla, S.; Anselmi, C.; Muller, R. H.; *Int. J. Pharm.* **2011**, *414*, 267.
- Nemen, D.; Lemos-Senna, E.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 408.
- Ricci, M.; Puglia, C.; Bonina, F.; Di Giovanni, C.; Giovagnoli, S.; Rossi, C.; *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1149.
- Joshi, M.; Patravale, V.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 911.
- Puglia, C.; Blasi, P.; Rizza, L.; Schoubben, A.; Bonina, F.; Rossi, C.; Ricci, M.; *Int. J. Pharm.* **2008**, *357*, 295.
- Nakamura, C.; Mehnert, W.; Sivaramakrishnan, R.; Kramer, K. D.; Korting, H. C.; Schafer-Korting, M.; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *369*, R7.
- Sivaramakrishnan, R.; Nakamura, C.; Mehnert, W.; Korting, H. C.; Kramer, K. D.; Schafer-Korting, M.; *J. Controlled Release* **2004**, *97*, 493.
- Mandawgade, S. D.; Patravale, V. B.; *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 132.
- Muller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, S131.
- Colome, L. M.; Raffin, R. P.; Assumpção, E. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Soft Mat.* **2010**, *8*, 72.

21. Rogez, H.; Buxant, R.; Mignolet, E.; Souza, J. N. S.; Silva, E. M.; Lardonelle, Y.; *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 380.
22. Yang, H.; Protiva, P.; Cui, B.; Ma, C.; Baggett, S.; Hequet, V.; Mori, S.; Weinstein, B.; Kennelly, E. J.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1501.
23. Gonçalves, J. F. C.; Fernandes, A. V.; Oliveira, A. F. M.; Rodrigues, L. F.; Marengo, R. A.; *Braz. J. Plant Physiol.* **2002**, *14*, 139.
24. Yang, J.; *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1573.
25. Bardsley, B.; Barry, S. J.; Drozd, M. A.; Hancock, S. A.; Okafo, G. N.; Szafran, M. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 610.
26. Nahata, M. C.; Morosco, R. S.; Trowbridge, J. M.; *Ann. Pharmacother.* **2000**, *34*, 848.
27. Hela, W.; Brandtner, M.; Widek, R.; Schuh, R.; *Food Chem.* **2003**, *83*, 601.
28. Kwadijk, S.; Torano, J. S.; *Biomed. Chromatogr.* **2002**, *16*, 203.
29. Abuirjeie, M. A.; Irshaid, Y. M.; Alhadidi, H. F.; Rawashdeh, N. M.; *J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1991**, *16*, 247.
30. ICH - Harmonised Tripartite Guideline; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, IFPMA: Geneva, 2005.
31. Muller, R. H.; Petersen, R. D.; Hornmoss, A.; Pardeike, J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 522.
32. Teeranachaideekul, V.; Souto, E. B.; Junyaprasert, V. B.; Muller, R. H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *67*, 141.
33. Chen, H. B.; Chang, X. L.; Du, D. R.; Liu, W.; Liu, J.; Weng, T.; Yang, Y. J.; Xu, H. B.; Yang, X. L.; *J. Controlled Release* **2006**, *110*, 296.
34. Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barratt, G.; *Biomaterials* **2001**, *22*, 2967.
35. Morais, J. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
36. Schmid-Wendtner, M. H.; Korting, H.C.; *Skin Pharmacol. Physiol.* **2006**, *19*, 296.
37. Scior, T.; Raddatz, G.; Figueroa, R.; Roth, H. J.; Bisswanger, H. A.; *J. Mol. Model.* **1997**, *3*, 332.
38. Esposito, E.; Fantin, M.; Marti, M.; Drechsler, M.; Paccamiccio, L.; Mariani, P.; Sivieri, E.; Lain, F.; Menegatti, E.; Morari, M.; Cortesi, R.; *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1521.
39. Saupé, A.; Gordon, K. C.; Rades, T.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *314*, 56.
40. Wu, Y.; Li, M. J.; Gao, H. X.; *J. Polym. Res.* **2009**, *16*, 11.
41. Beck, R. C. R.; Haas, S. E.; Guterres, S. S.; Ré, M. I.; Benvenutti, E. V.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 990.

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DESTINADAS À APLICAÇÃO TÓPICA DE DAPSONA

Guilherme Soares dos Santos, Gabriela Garrastazu Pereira, Eduardo André Bender, Leticia Marques Colomé\* e Sílvia Stanisçuaski Guterres

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

Daniel Canema Manhães de Carvalho e Gilberto Weissmüller

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 737, Cidade Universitária, 21941-599 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

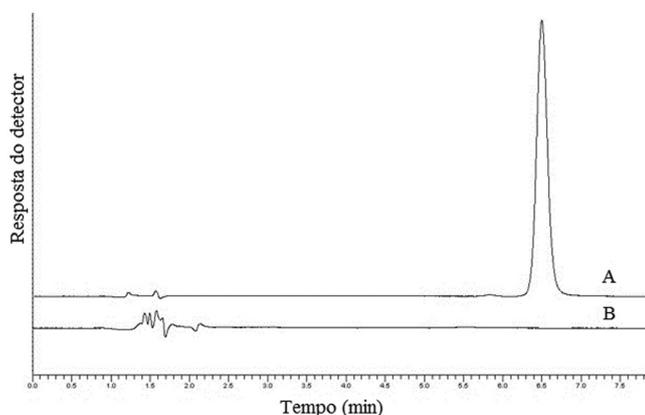


Figura 1S. Cromatogramas típicos de uma solução analítica de dapsona (15 µg/mL) (A) e de uma amostra de teosferas (MO-1) sem fármaco (B)

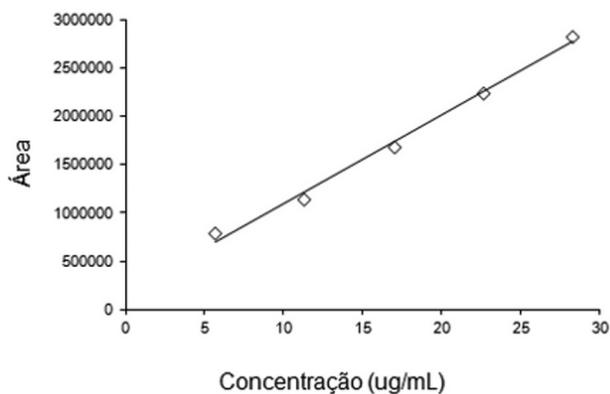


Figura 2S. Representação gráfica da curva analítica e faixa linear para a dapsona ( $y = 91453x + 187722$ ,  $r = 0,9965$ )