

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES POLIMÉRICAS CATIÔNICAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CURCUMINÓIDES FOTOSENSIBILIZADORES DE ORIGEM BIOTECNOLÓGICA

L.G. MUNHOZ¹, C.F. AMANTINO¹, A.C. TEDESCO² e F.L. PRIMO^{1*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

²Departamento de Química, FFCLRP, Universidade de São Paulo – USP
luciana.gmunhoz@gmail.com; flprimo@fcfar.unesp.br*

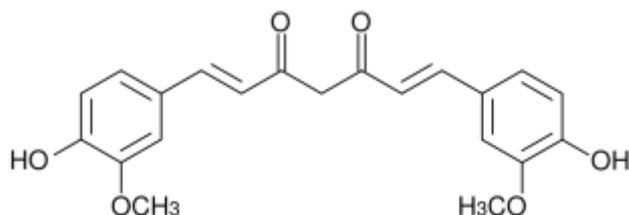
RESUMO – O uso incorreto e desorientado de antibióticos tem tido como consequência o aparecimento de microrganismos mais resistentes aos tratamentos convencionais. O uso da fotoinativação microbiana junto com a nanotecnologia tem surgido como uma alternativa de tratamento para esses e outros casos. A fotoinativação consiste na utilização de um fotossensibilizador combinando-se a aplicação controlada de irradiação de luz monocromática, que desencadeia numa série de reações que causam a morte do microrganismo. A nanoencapsulação desses ativos fotossensibilizadores pode resultar na melhoria das características físico-químicas destes compostos, como o aumento de estabilidade, redução da fotodegradação, aumento da área superficial de interação, biocompatibilidade, além de também preservar e potencializar as características dos biocompostos. Neste contexto o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de compostos nanoestruturados contendo a curcumina como ativo fotossensibilizante, para futura aplicação em inativação microbiana empregando-se processos fotodinâmicos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Curcumina

Como Sueth-Santiago *et al.* (2015) demonstrou, a curcumina é um composto de origem natural, sendo o rizoma encontrado em um arbusto que é denominado cúrcuma longa. A curcumina despertou o interesse de pesquisadores devido as suas propriedades farmacológicas como por exemplo, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante e digestiva. A estrutura química desse composto baseia-se em dois anéis fenólicos e duas cetonas, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química da curcumina



Segundo Suzuki (2016), sua estrutura química e atividades biológicas são características de interesse para a aplicação na terapia fotodinâmica, pois absorvem preferencialmente na faixa de 400-430 nm. Ainda no trabalho de Suzuki (2016) percebe-se que a natureza hidrofóbica da curcumina é uma limitação para sua aplicação em meio biológico. Devido a sua baixa solubilidade em solução aquosa, o uso da nanotecnologia auxilia no aumento da sua solubilidade, biodistribuição e biodisponibilidade no meio biológico.

1.2. Nanotecnologia

Conforme referido no trabalho de Primo (2011), a nanotecnologia contribui diretamente para o desenvolvimento de novos materiais, processos e dispositivos para diversas aplicações, destacando-se nas áreas da saúde humana e a biotecnológica. Os princípios da nanotecnologia são fundamentados no desenvolvimento de novos materiais em escalas nanométricas. Chaudhry *et al.* (2010) mostra que os materiais nanoestruturados possuem potencial diferenciado frente a outros materiais em escala de micro e/ou macroscópica, podendo ter propriedades físico-químicas potencializadas, resultando em características únicas e propriedades diferentes das observadas em outras escalas de tamanhos superiores. Segundo Weiss *et al* (2006) dentre os diferentes tipos de nanomateriais estão as nanocápsulas, nanoemulsões, nanolaminados, nanotubos e nanofibras.

De acordo com Perez *et al* (2012) as nanoemulsões (NE) destacam-se devido sua estabilidade físico-química ampliada, podendo ser obtidas por processos de emulsificação espontânea e deposição polimérica interfacial pela combinação de co-polímeros e diferentes óleos.

As NE promovem o aumento da biodisponibilidade dos ativos incorporados em sua matriz coloidal, resultando na alteração da digestão e metabolismo desses ativos pelas presenças dos lipídios que compõe a nanoemulsão, além de também influenciar no aumento do “tempo de prateleira” dessas formulações, visto que as protegem de fenômenos físico-químicos degradantes como a volatilização e oxidação, que comumente levam a instabilidade do medicamento e a redução do seu prazo de validade, como mostrado por Jeong (2007).

2. OBJETIVOS

O trabalho em questão tem como principal objetivo, desenvolver e caracterizar compostos fotossensibilizadores nanoestruturados que sejam de origem natural e/ou obtidos por via biotecnológica.

3. MÉTODOS

As nanoemulsões catiônicas (NE) foram preparadas segundo o método de emulsificação espontânea interfacial apresentado por Siqueira-Moura *et al* 2012. Inicialmente foram preparadas duas soluções: uma fase aquosa contendo o polímero Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich Co.) a 7,5 % em água ultrapura, e uma fase orgânica com acetona, contendo Lipoid S100 (Lipoid AG) a 7,5 % a 55 °C. Para alterar a carga residual final foi adicionado o polímero catiônico brometo de didodecildimetilamônio – DDAB (Sigma-Aldrich Co.), para modulação da carga superficial desejada. Foram testadas diferentes frações de DDAB (7,8 a 31 mg/mL) buscando a melhor curva de estabilidade físico química das formulações. O fotossensibilizador curcumina (Sigma-Aldrich Co.) foi adicionado à fase orgânica após dissolução em óleo Edenor KS (Cosmoquímica Ltda.), previamente a etapa de pré-emulsificação, para uma concentração final de 0,1 mg/mL. A formulação final foi obtida por emulsificação a pressão reduzida após remoção de todo solvente orgânico numa velocidade de rotação de 125 rpm e à temperatura de 55 °C. Para caracterização dos nanomateriais obtidos foi empregada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *dynamic light scattering*), para determinação do tamanho de partícula, potencial Zeta (ζ) e índice de polidispersão (Pdl), utilizando-se um equipamento Zetasizer, modelo ZS90 da Malvern Instruments. Estas análises foram realizadas em colaboração com os Profs. Dr. Miguel Jafelicci Júnior e Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques, do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Foram desenvolvidas nanoemulsões com três frações diferentes do polímero catiônico. A Tabela 1 mostra os dados de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões em função do tempo.

Tabela 1 - Dados de tamanho de partícula, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (ζ), em função da concentração do DDAB

Dias	Concentração 31 mg/ml			Concentração 15,64 mg/ml			Concentração 7,82 mg/ml		
	Tamanho (nm)	Potencial (mV)	Pdl	Tamanho (nm)	Potencial (mV)	Pdl	Tamanho (nm)	Potencial (mV)	Pdl
1	486	84,5	0,33	183,5	76,8	0,20	246,0	72,0	0,29
8	478	91,3	0,30	186,6	92,5	0,20	269,3	67,5	0,28
12	711	95,3	0,43	194,8	87,0	0,18	227,4	106,0	0,25
25	471	75,7	0,30	195,0	85,6	0,16	248,7	77,6	0,33
34	429	92,9	0,35	183,8	84,2	0,18	214,6	89,6	0,38

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram o perfil de estabilidade para as formulações NEC contendo diferentes concentrações de DDAB. Os dados indicam uma estabilidade físico-química para os primeiros 34 dias de análise, entretanto as amostras com concentração de DDAB = 15,64 mg/mL apresentaram um tamanho de partícula reduzido (< 200 nm). Os potenciais Zeta foram obtidos numa faixa de valor > 80 mV para as NEC de preparadas com as concentrações de 15,64 mg/mL e 31 mg/mL de DDAB. Após o tratamento dos dados foi definido que a nanoemulsão contendo a concentração de 15,64 mg/mL de DDAB catiônico foi a que apresentou melhor perfil de estabilidade (d < 200 nm, ζ > 80 mV e Pdl < 0,2). Desta forma, foi definido que uma nanoemulsão encapsulando o ativo fotossensibilizador curcumina, fosse preparada contendo esta proporção polimérica. Na

Tabela 2 temos os dados de caracterização físico-química para a NEC contendo a curcumina nanoencapsulada.

Tabela 2 – Dados de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta da nanoemulsão catiônica com curcumina

Dias	Concentração 15,64 mg/ml		
	Tamanho (nm)	Potencial (mV)	Pdl
1	155,3	89,8	0,21
14	169,0	76,9	0,19
23	175,5	104,0	0,16

Os resultados obtidos na Tabela 2 demonstram que o perfil de tamanho de partícula, ζ e PDI foram mantidos após o encapsulamento do ativo fotossensibilizador. Na etapa seguinte dos estudos de caracterização físico-química do nanomaterial, foram realizadas análises de excitação, emissão de fluorescência da NEC contendo a curcumina, como apresentado nas Figura 2, 3 e 4 a seguir.

Figura 2 – Espectro de fluorescência da curcumina, medido com *Spectrum type 3D*, velocidade de escaneamento 2000 nm/min

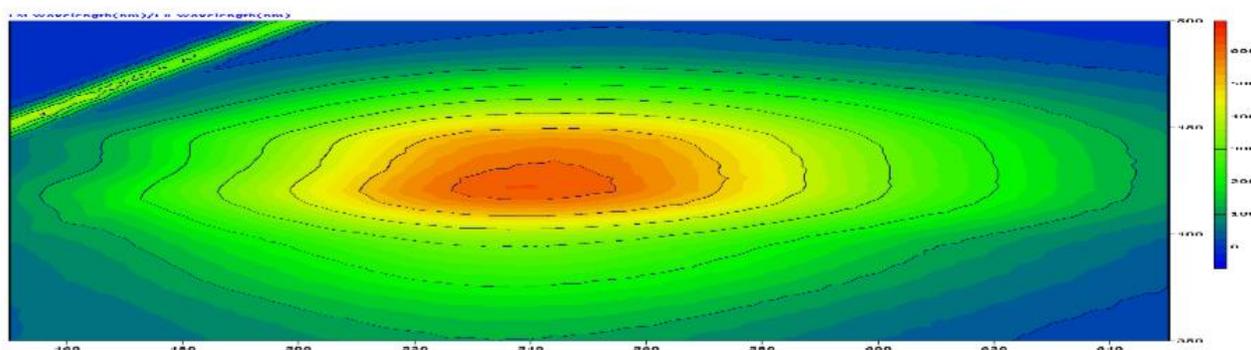


Figura 3 – Emissão da nanoemulsão catiônica medido por *Spectrum type 3D*, velocidade de escaneamento 2000 nm/min. $\lambda_{excitação} = 378$ nm

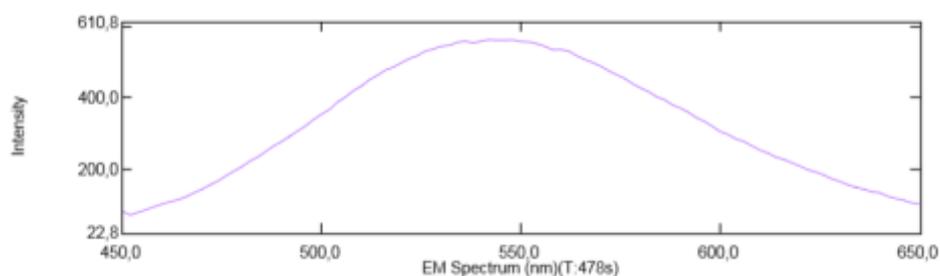


Figura 4 – Excitação da nanoemulsão catiônica de curcumina medido por *Spectrum type 3D*, velocidade de escaneamento 2000 nm/min, $\lambda_{excitação} = 378$ nm

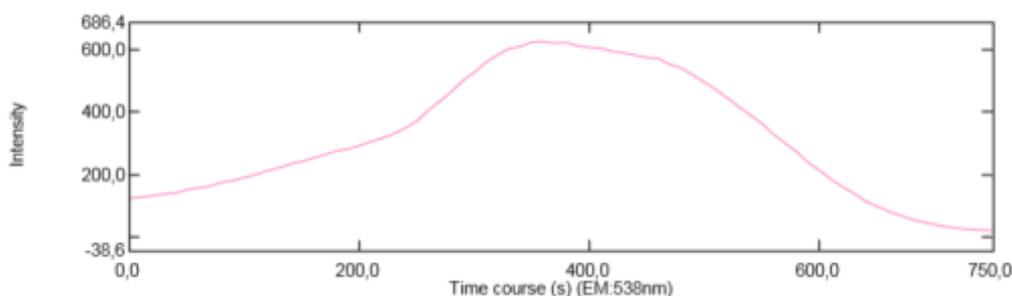


Figura 5 – Nanoemulsão catiônica vazia (branca) e com curcumina nanoencapsulada (amarela).

5. CONCLUSÃO

Concluimos que foi possível obter uma NEC para liberação controlada de derivados curcuminóides, a qual possui características físico-químicas adequadas conforme esperado para sistemas coloidais nanocarreadores. Com base nestes resultados preliminares é possível atestar que a formulação em questão tem potencial para utilização em protocolos de fotoinativação microbiana baseada em Processos Fotodinâmicos.

Agradecimentos: Os autores agradecem pela bolsa de iniciação científica concedida pelo Edital Primeiros Projetos/PROPe/UNESP, 09/2016 – Processo 765, 2016 – vigente (L.G.M). Agradecemos também ao Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, por ceder o equipamento espectrofluorímetro Spectrum 3D para as análises de excitação e emissão de fluorescência das formulações e aos Profs. Dr. Miguel Jafelicci Júnior e Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques, do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, por ceder o equipamento Zetasizer para análises de tamanho.

6. REFERÊNCIAS

CHAUDHARY, J. H; BANO, A.S.W; ULLAH,F; MUNIS, F; FAHAD, S; AHMAD, I. In vitro analysis of Cupressus sempervirens L. plant extracts antibacterial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 6, p. 273-276, 2012.

JEONG, S. H.; PARK, J. H.; PARK, K. Formulation issues around lipid-based oral and parenteral delivery systems: role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery. Hoboken: *Wiley-Interscience*, 2007

PEREZ, S.,F; BERTAGNOLLI, M.M; ALVES, P. M; PENNA, G.N. Nanotecnologia: aplicação na área de alimentos, *Disc.Scientia*, v. 13, p. 97-110, 2012.

PRIMO, F. L.; REIS, M. B. D.; PORCIONATTO, M. A.; TEDESCO, A. C. In Vitro Evaluation of Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion and Low-Level Laser Therapy on Human Skin Dermal Equivalents and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 3376-3381, 2011.

ROSA, L.L; BRUXEL, F; BIDONE, J; TEIXEIRA, F.H. Efeito da concentração de fase oleosa no tamanho de gotícula de nanoemulsões para terapia gênica. *Anais do salão internacional de ensino pesquisa e extensão*, v.7, 2015.

SANTOS, F.D.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de microcristais de curcumina, *Universidade tecnológica federal do paraná, 2015.*

SIQUEIRA-MOURA, M.P.; BOLFARINI, C. G.; DEMETS, F.J.G; TEDESCO, C.A.Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit[7]uril complex encapsulated into liposomes. *Dyes and Pigments*, p.162-167, vol.100, 2014.

SUETH-SANTIAGO, V; MENDES-SILVA, P. G.; DECOT -RICARDO, D.; LIMA, F. E.M. curcumina, o p  dourado do açafrão-da-terra: introspec es sobre química e atividades biológicas. *Quim. Nova*, v. 38, p. 538-552, 2015

SUZUKI, L.I. Viabiliza o da curcumina natural nanoencapsulada para inativa o fotodinâmica. *Instituto de física de São Carlos*, 2016

WEISS, J; TAKHISTOV,J; MCCLEMENTS, J. D. Functional materials in food nanotechnology, *Journal of food Science*, v. 7, p. 107 – 116, 2006.