



Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas inaláveis de poli(etileno carbonato) para tratamento da tuberculose

Danielle Flávia da Silva Ribeiro^{1*} (PG), Luís Antônio Dantas Silva² (PQ), Iara Maira de Oliveira Viana² (PG), Thais Leite Nascimento^{1,2} (PQ)

danflaviasilva@gmail.com

¹ Universidade Estadual de Goiás - BR153, nº3105 Fazenda Barreiro do Meio - Câmpus Henrique Santillo – Anápolis

² Universidade Federal de Goiás - Praça Universitária - 5ª. Avenida esq/ Rua 240 s/n - Goiânia – GO

Resumo: A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente a terapia da TB utiliza principalmente a via oral de administração, que apresenta limitações como baixa biodisponibilidade, eventos adversos graves e longo tempo de tratamento. O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para administração pulmonar pode oferecer vantagens no tratamento, sendo possível a entrega do fármaco no local de ação e a vetorização dos macrófagos alveolares. O objetivo geral do presente trabalho é o desenvolvimento de nanopartículas de poli(etileno carbonato) contendo clofazimina (CFZ) para administração pulmonar, tendo o macrófago como célula-alvo no tratamento da TB. Estudos de análise térmica foram realizados para avaliar a interação e compatibilidade da clofazimina (CFZ) com possíveis matérias-primas que podem ser usadas no preparo de nanopartículas. Amorfização e solubilização do fármaco por polímeros e tensoativos foram observadas, e devem ser confirmadas por análises termogravimétricas e por espectrometria no infravermelho. As formulações de nanocápsulas com fármaco apresentaram tamanho médio entre 237-286 nm, Pdl 0,16-0,19 e eficiência de encapsulação (EE) de 65%. As nanoesferas com fármaco apresentaram tamanho médio entre 196-438 nm, Pdl 0,43-0,30 e EE 46,85-53,95%. As nanocápsulas apresentaram maior EE, portanto serão secadas por liofilização para a obtenção de pó inalável para administração pulmonar.

Palavras-chave: clofazimina, nanocápsula, nanoesfera, macrófagos.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como Bacilo de Koch (BK). A transmissão ocorre principalmente pelo ar, sendo o pulmão o principal órgão acometido pela doença (SOUZA; VASCONCELOS, 2005). Aproximadamente 80%



dos casos de TB apresentam a forma pulmonar da doença (PANDEY; KHULLER, 2005).

A TB afeta milhões de pessoas por ano, com incidência mundial de 10,4 milhões e 1,4 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2016). O Brasil registra anualmente aproximadamente 69 mil novos casos e 4.500 óbitos (BRASIL., 2017; SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

A clofazimina (CFZ) é um antibiótico derivado de riminofenazina, sintetizado pela primeira vez em 1957 para o tratamento de tuberculose (BARRY *et al.*, 1957). Ela apresenta atividade bactericida contra cepas de TB multi-droga resistentes (MDR) *in vitro* e *in vivo* (TANG *et al.*, 2015), mas, por ser altamente lipofílica, sua biodisponibilidade por via oral é limitada a aproximadamente 40% (CHAVES, L. L. *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017).

Atualmente o tratamento da TB é administrado principalmente pela via oral e requer a combinação de mais de um fármaco por um longo período de tempo (ROSSETTI *et al.*, 2002). A via de administração oral possui limitações relacionadas à chegada do fármaco no pulmão, devido à baixa biodisponibilidade no local da infecção (PHAM *et al.*, 2015). Diante dessas limitações, a utilização de novas vias de administração pode ser utilizada para otimização da terapia (GARCIA, 2014).

A via de administração pulmonar é uma estratégia utilizada para aumento da concentração de fármacos no pulmão (KUZMOV; MINKO, 2015; PHAM *et al.*, 2015). Como alternativa para as formulações de administração pulmonar, a nanotecnologia pode oferecer vantagens ao tratamento da TB (PHAM *et al.*, 2015). Sistemas nanotecnológicos podem melhorar a biodisponibilidade do fármaco, reduzir efeitos colaterais e toxicidade do fármaco, já que o direcionamento local aos pulmões pode reduzir a dose e frequência da posologia (NASIRUDDIN *et al.*, 2017).

Nanopartículas (NPs) poliméricas tem sido utilizadas para o encapsulamento de fármacos lipossolúveis e com baixa biodisponibilidade por via oral (CHAVES, L. L. *et al.*, 2018). O poli(etileno carbonato) (PEC) é um polímero biodegradável utilizado em formulações de liberação controlada para o direcionamento de infecções em macrófagos (BOHR *et al.*, 2016). Este polímero apresenta características de degradação superficial liberando de forma gradativa o fármaco incorporado na matriz



polimérica (BOHR *et al.*, 2017). A utilização do PEC em nanopartículas contendo os fármacos utilizados na terapêutica da TB poderá direcionar o tratamento aos macrófagos.

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas de poli(etileno carbonato) contendo CFZ para administração pulmonar, através da vetorização do macrófago, célula alvo no tratamento da TB.

Material e Métodos

Os materiais utilizados foram: clofazimina (CFZ), poli(etileno carbonato) QPAC®25 (PEC), policaprolactona (PCL), poli(D,L-lático) (PLA), poli(D,L-lático-co-glicólico) - lactídeo glicóide (50:50) (PLGA50:50), poli(D,L-lático-co-glicólico)-alquil éster terminal (75:25) (PLGA75:25), poli(D,L-lático-co-glicólico)-éster terminal (PLGA85:15), álcool polivinílico P.S (PVA), Pluronic®F127 (PLX407), Pluronic®F68 (PLX188), Tween®80 (polissorbato 80), Span®60 (monoestearato de sorbitano), Span®80 (monooleato de sorbitano), Span®85 (trioleato de sorbitano), ácido oleico, Lipoid®S100 (fosfatidilcolina de soja).

O estudo de pré-formulação foi realizado por análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da CFZ e das misturas binárias (1:1 p/p). As curvas de DSC foram obtidas pelo equipamento DSC-60A – *Differential Scanning Calorimeter* (Shimadzu®, Japão). Neste estudo foram incluídos os excipientes PEC, PCL, PLA, PLGA50:50, PLGA75:25, PLGA85:15, PVA, PLX407, PLX188, Tween®80, Span®60, Span®80, Span®85, ácido oleico e Lipoid®S100. As amostras foram colocadas em cadinho de alumínio e a análise realizada na faixa de temperatura de 25 a 400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As análises foram realizadas sob fluxo de 50 mL/min de atmosfera de nitrogênio (N₂).

As nanopartículas foram preparadas através do método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989). A fase orgânica foi vertida lentamente em fase aquosa, sob agitação magnética. O solvente orgânico foi removido e a amostra concentrada sob pressão reduzida, utilizando rotaevaporador. As formulações com menor tamanho de partícula e monodispersa foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação.



A avaliação do diâmetro médio e índice de polidispersibilidade (Pdl) foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, ou *dynamic light scattering* (DLS). O equipamento utilizado para análise foi o Zetasizer Nano S (Malvern).

A eficiência de encapsulação foi avaliada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) para quantificação do fármaco total e fármaco encapsulado.

A técnica de ultrafiltração, com auxílio do dispositivo Amicon® de 100 kDa, foi utilizada para a separação entre as NPs e o fármaco livre. Após quantificação em HPLC do fármaco total e do fármaco encapsulado. A eficiência de encapsulação foi calculada conforme equação:

$$\%EE = \frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade total de fármaco incorporado}} \times 100$$

Resultados e Discussão

- Estudo de pré-formulação

O DSC tem sido utilizado para análise de compatibilidade entre fármaco-excipiente em produtos farmacêuticos, pela escolha de indicadores específicos de interação (CHADHA; BHANDARI, 2014; GAO *et al.*, 2015). A análise é realizada avaliando alterações que podem ocorrer nos eventos endotérmicos, exotérmicos ou na variação de entalpia, sugerindo uma possível interação (ABBAS *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2016).

A CFZ apresentou um pico endotérmico com T_{pico} em 224,04 °C e energia de entalpia (ΔH) de -70,69 J/g. A curva endotérmica de fusão apresentou pico agudo, geralmente indicativo de fase sólida pura (BOLLA; NANGIA, 2012). A temperatura de fusão da CFZ encontrada neste trabalho (224 °C) já foi descrita anteriormente a partir da utilização dos mesmos parâmetros de análise (CHAVES, L. L. *et al.*, 2018) (Tabela 1).


Tabela 1 - Dados DSC - Fármaco e misturas binárias (1:1 p/p)

Amostra	DSC		
	T _{onset} /°C	T _{pico} /°C	ΔH (J/g)
CFZ	222,87	224,04	-70,69
CFZ-PEC	213,76/ 225,58	215,96/ 228,69	-66,35/ -159,36
CFZ-PCL	-	-	-
CFZ-PLA	221,87	224,27	-0,54
CFZ-PLGA5050	221,91	223,69	-54,89
CFZ-PLGA7525	218,4	220,64	-8,75
CFZ-PLGA8515	220,56	222,78	-22,74
CFZ-SPAN60	-	-	-
CFZ-SPAN80	-	-	-
CFZ-SPAN85	-	-	-
CFZ-PLX188	-	-	-
CFZ-PLX407	-	-	-
CFZ-PVA	223,21	224,63	-17,74
CFZ-TWEEN80	-	-	-
CFZ-ACOLEICO	-	-	-
CFZ- LIPOIDS100	213,98	217,77	-51,12

Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico da CFZ aparece em maior intensidade nas misturas binárias CFZ-PLGA50:50, CFZ-PLGA75:25, CFZ-PLGA 85:15. Já para as demais misturas binárias os picos de fusão da CFZ são menos pronunciados ou inexistentes. As curvas de DSC das misturas binárias contendo PLGA50:50 e PLGA85:15 combinam as características das curvas de DSC de cada componente avaliado (BALESTRIERI *et al.*, 1996). Portanto, estes são os polímeros que apresentam menor interação com a CFZ.

Nas misturas binárias contendo CFZ-Span60, CFZ-Span80 e CFZ-Span85, CFZ-PLX188, CFZ-PLX407 e CFZ-Tween80 não foi possível observar o pico do fármaco, o que sugere a solubilização do fármaco nos tensoativos (CHAVES, LUÍSE L. *et al.*, 2018; KAWAKAMI, 2018). A mistura CFZ-AcOleico também solubilizou o fármaco, e por esta razão não foram observados picos no termograma. A solubilização pode ser considerada uma interação positiva no preparo de nanopartículas poliméricas.

O PVA apresentou capacidade de solubilização da CFZ, sendo que a maior parte do fármaco interagiu com este excipiente. Em concordância com os resultados encontrados neste trabalho, incompatibilidades entre CFZ e PVA não foram observadas durante o estudo por DCS de formulações de nanopartículas de PLGA contendo CFZ (CHAVES, L. L. *et al.*, 2018).

A partir dos resultados de DSC é possível sugerir a ocorrência de possíveis interações entre o fármaco e os excipientes testados. A confirmação dessas interações deve ser feita utilizando técnicas analíticas complementares, como análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). Os resultados das análises utilizando as técnicas complementares descritas ainda estão sendo avaliados para melhor distinguir entre os eventos observados por DSC.

- Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas

A partir de testes com diferentes concentrações de excipientes, nanocápsulas (Tabela 2) e nanoesferas (Tabela 3) de PEC foram preparadas e avaliadas quanto ao diâmetro médio e Pdl.

Nanocápsulas são compostas por um revestimento polimérico e núcleo oleoso e nanoesferas possui estrutura formada por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Neste trabalho, a diferença entre formulações baseou-se na presença do óleo de soja, que é responsável pelo núcleo oleoso das nanacápsulas, e na utilização da acetona como solvente orgânico para solubilizar este excipiente. Os resultados de diâmetro médio e Pdl são demonstrados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 2 - Formulação Nanocápsulas

Formulações	PEC	Span 80	Óleo de Soja	ACN	Acetona	Tween80	PLX407	Água
E1 - NC	100mg	38mg	180mg	17mL	10mL	77mg	-	54mL
E3 - NC	100mg	77mg	180mg	17mL	10mL	77mg	-	54mL
E5 - NC	100mg	38mg	180mg	17mL	10mL	-	77mg	54mL
E7 - NC	100mg	77mg	180mg	17mL	10mL	-	77mg	54mL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Formulação Nanoesferas

Formulações	PEC	Span 80	Óleo de Soja	ACN	Acetona	Tween80	PLX407	Água
E2 - NE	100mg	38mg	-	27mL	-	77mg	-	54mL
E4 - NE	100mg	77mg	-	27mL	-	77mg	-	54mL
E6 - NE	100mg	38mg	-	27mL	-	-	77mg	54mL
E8 - NE	100mg	77mg	-	27mL	-	-	77mg	54mL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Diâmetro médio e Pdl - Nanocápsulas brancas

Formulações	Diâmetro médio (nm)	PDI
E1 - NC	380,3±3,5	0,16±0,04
E3 - NC	256,5±7,7	0,21±0,02
E5 - NC	188,6±4,1	0,16±0,07
E7 - NC	184,2±5,3	0,14±0,13

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 5 - Diâmetro médio e Pdl - Nanoesferas brancas**

Formulações	Diâmetro médio (nm)	PDI
E2 - NE	202,6±6,2	0,58±0,03
E4 - NE	295,9±0,5	0,89±0,01
E6 - NE	164,3±3,8	0,05±0,03
E8 - NE	164,9±5,7	0,10±0,03

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o preparo das nanopartículas brancas, as que apresentaram tamanho menor que 300 nm e Pdl menor que 0,2 foram selecionadas para o preparo da formulação contendo o fármaco. As formulações de nanocápsulas selecionadas foram E5 e E7 e de nanoesferas E6 e E8. Na formulação contendo o fármaco todas as proporções foram mantidas e foram incluídos na fase orgânica 5 mg de CFZ.

As formulações contendo o fármaco foram avaliadas quanto a eficiência de encapsulação do fármaco (EE) (Tabela 6).

Tabela 6 - Formulações com CFZ e EE

Formulações	Diâmetro médio (nm)	PDI	EE (%)
E5- NC-CFZ	237,07±12,3	0,16±0,06	65,13
E7 - NC-CFZ	210,2±3,0	0,16±0,02	65,70
E6 - NE-CFZ	438,3±8,4	0,43±0,06	53,95
E8 - NE-CFZ	196,1±10,9	0,30±0,03	46,85

Fonte: Elaborada pelo autor.

A CFZ é um fármaco extremamente lipossolúvel, sendo assim possui afinidade pelo óleo da fase orgânica utilizada no preparo da nanocápsula. Devido à afinidade do fármaco ao óleo que fica internamente na partícula, foi possível observar maior EE para as nanocápsulas. A formulação de nanocápsula E7A, apesar de boa EE, não apresentou estabilidade, o que foi observado pela separação de fases após o preparo.

As nanoesferas apresentaram grande aumento no diâmetro médio e Pdl, e a EE foi menor comparada às nanocápsulas. A EE para as nanoesferas foi menor, pois o fármaco nessa estrutura fica adsorvido na matriz polimérica, que não foi capaz de adsorver boa quantidade do fármaco.

A formulação contendo fármaco que obteve melhor resultado de diâmetro médio, Pdl e eficiência de encapsulação foi a formulação E5A. Esta formulação será



utilizada para a secagem por liofilização, com o objetivo de obter um pó para administração pulmonar.

Considerações Finais

Pelas análises de DSC foi possível observar que o fármaco sofreu amorfização na presença dos polímeros PCL e PLA. Os polímeros PLGA50:50, PLGA75:25 e PLGA85:15 foram os que apresentaram menor interação com o fármaco. Os tensoativos e o ácido oleico solubilizaram o fármaco, sendo esta uma interação positiva para o preparo de nanopartícula. A solubilidade da CFZ no óleo e nos tensoativos poderá contribuir para encapsulação do fármaco nas formulações. As possíveis interações observadas na análise de DSC poderão ser confirmadas através dos dados obtidos nas análises de TG e FTIR.

Diferentes nanoesferas e nanocápsulas foram estudadas durante o desenvolvimento da formulação. Como as nanocápsulas apresentaram maior eficiência de encapsulação do que as nanoesferas, elas serão secadas por liofilização para a obtenção de um pó inalável.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Financiadora de Inovação e Pesquisa (Finep).

Referências

ABBAS, D. et al. DSC and physico-chemical properties of a substituted pyridoquinoline and its interaction study with excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 2, p. 353, 2008.

BALESTRIERI, F. et al. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility. **Thermochimica Acta**, v. 285, p. 337-345, 1996.

BARRY, V. C. et al. A New Series of Phenazines (Rimino-Compounds) With High Antituberculosis Activity. **Nature**, v. 179, p. 1013, 1957.

BOHR, A. et al. Molecular weight-dependent degradation and drug release of surface-eroding poly(ethylene carbonate). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 140-148, 2017.



BOHR, A. et al. Potential of surface-eroding poly(ethylene carbonate) for drug delivery to macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 814-820, 2016.

BOLLA, G.; NANGIA, A. Clofazimine Mesylate: A High Solubility Stable Salt. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 12, p. 6250-6259, 2012.

BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose - Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como problema de saúde pública**. Brasília: Ministério da Saúde. 2017.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **J Pharm Biomed Anal**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHAVES, L. L. et al. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28-37, 2018.

CHAVES, L. L. et al. Overcoming clofazimine intrinsic toxicity: statistical modelling and characterization of solid lipid nanoparticles. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 139, 2018.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J Pharm**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GAO, R. et al. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 839-845, 2015.

GARCIA, F. D. M. Nanomedicine and therapy of lung diseases. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, p. 531-533, 2014.

KAUR, A.; GOINDI, S.; KATARE, O. P. Thermal analysis and quantitative characterization of compatibility between diflunisal and lipid excipients as raw materials for development of solid lipid nanoparticles. **Thermochemica Acta**, v. 643, p. 23-32, 2016.



KAWAKAMI, K. Chapter 15 - Pharmaceutical Applications of Thermal Analysis. In: VYAZOVKIN, S.; KOGA, N., *et al* (Ed.). **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**: Elsevier Science B.V., v.6, 2018. p.613-641. ISBN 1573-4374.

KUZMOV, A.; MINKO, T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 500-518, 2015.

NASIRUDDIN, M.; NEYAZ, M. K.; DAS, S. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2017, p. 4920209, 2017.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 430-435, 2005.

PHAM, D.-D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 517-529, 2015.

ROSSETTI, M. L. R. *et al*. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 525-532, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al*. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SOUZA, M. V. N. D.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p. 678-682, 2005.

TANG, S. *et al*. Clofazimine for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: prospective, multicenter, randomized controlled study in China. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 9, p. 1361-7, 2015.

WHO, W. H. O. **Global Tuberculosis Report 2016** 2016.

ZHANG, Y. *et al*. Design and Solidification of Fast-Releasing Clofazimine Nanoparticles for Treatment of Cryptosporidiosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 3480-3488, 2017.