

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo atovaquona:
estudos de formulação, de liberação e de atividade *in vitro***

LUISA BARTMANN WILD

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo atovaquona:
estudos de formulação, de liberação e de atividade *in vitro***

Dissertação apresentada por **Luisa
Bartmann Wild** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de fevereiro de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Wild, Luisa Bartmann

Desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas
contendo atovaquona: estudos de formulação, de
liberação e de atividade in vitro / Luisa Bartmann
Wild. -- 2013.

123 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanoemulsões catiônicas. 2. Atovaquona. 3.
Validação: método analítico. 4. Malária. I. Teixeira,
Helder Ferreira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS

*Aos meus pais, Maria Conceição e
Cláudio Roberto.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais um etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, um exemplo de dedicação e sabedoria, e que me incentivou e ensinou, estando sempre muito presente em todas as etapas do trabalho.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e incentivo.

À minha irmã Lúcia e meu cunhado Gustavo, por toda amizade e por sempre estarem presentes.

Ao Luis Henrique, por todo amor, companheirismo e compreensão.

A todos os meus colegas e amigos do LDG, Fernanda, Michelle, Dirnete, Bruna, Cristiane, Débora, Francini, Juliana Bidone, Juliana Carini, Laura, Pedro, Regina, Samuel, Vinícius, Sara, Marina, Letícia, Renata e Évelin, sem os quais a realização dessa dissertação teria sido bem mais difícil.

À Fernanda, que fez toda a diferença neste trabalho através do seu conhecimento, amizade, ajuda e paciência.

Aos amigos de Cachoeira do Sul pela amizade, carinho e por entenderem minha ausência em alguns momentos.

Às minhas amigas e colegas de profissão pela amizade e ideias trocadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Aos professores do corpo docente da UFRGS, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A malária é um problema de saúde mundial. Esta doença é causada pela infecção dos eritrócitos com o protozoário do gênero *Plasmodium*. A atovaquona (ATQ) é um análogo estrutural da coenzima Q, usado como monoterapia ou em combinação com proguanil no tratamento da malária. A incorporação de fármacos de reduzida hidrossolubilidade, como a ATQ, em veículos tradicionais, é frequentemente limitada devido a razões de solubilidade. Neste contexto, nanoemulsões oferecem uma alternativa promissora devido a sua efetividade na solubilização de fármacos, aumentando a eficácia, e reduzindo os efeitos adversos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsões catiônicas contendo ATQ para administração intravenosa. Nanoemulsões compostas de ATQ, triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, 1,2-di-oleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP), glicerol, polissorbato 80 e água foram obtidas pelo método de emulsificação espontânea. Este método levou à obtenção de nanoemulsões monodispersas com um diâmetro médio de aproximadamente 200 nm, como confirmado pela microscopia eletrônica de transmissão. O potencial ζ das nanoemulsões foi positivo (> 30 mV em pH 5). Um método isocrático de cromatografia líquida de fase reversa foi validado para quantificar ATQ. O método foi específico, linear, preciso e exato para a quantificação de ATQ. O teor de fármaco para todas as formulações foi próximo a 95%. A ATQ liberada a partir das nanoemulsões foi avaliada em dois meios diferentes (RPMI-1640 + 0,5% albumina ou PBS + 0,5% polissorbato 80) após a separação de ATQ livre através das membranas de ultrafiltração (poro de 0,1 μ m). Independente do meio utilizado, ATQ foi progressivamente liberada a partir das formulações em função do fator de diluição e permaneceu constante em função do tempo. A maior liberação de ATQ foi observada para nanoemulsões contendo polissorbato 80 e no meio contendo este tensoativo não iônico em condições sink. O diâmetro das nanoemulsões permaneceu inalterado nas condições de liberação para nanoemulsões contendo polissorbato 80 enquanto uma inversão do ζ - potencial de valores positivos para negativos foi detectado. Tais formulações mostraram uma inibição do crescimento do parasita *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* resistentes à ATQ.

Palavras chave: atovaquona, nanoemulsões catiônicas, estudos de liberação, polissorbato 80.

ABSTRACT

Malaria is a global public health problem. This disease is caused by infection of red blood cells with protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. Atovaquone (ATQ) is a structural analogue of coenzyme Q used as monotherapy or in combination with proguanil in malaria treatment. The incorporation of poorly-water soluble drugs such as ATQ in well-accepted vehicles is frequently limited due to solubility reasons. In this context, nanoemulsions offer an appealing alternative due to their effectiveness in drug solubilization, improved efficacy, and reduced side effects. The main purpose of this study was to develop cationic nanoemulsions containing ATQ for intravenous administration. Nanoemulsions composed of ATQ, medium chain triglycerides, egg lecithin, dioleoyl trimethylammonium propane (DOTAP), glycerol, polysorbate 80 and water were obtained by means of spontaneous emulsification. This procedure led to obtaining monodisperse nanoemulsions with mean droplet size of approximately 200 nm, as attested by transmission electron microscopy. ζ - potential of nanoemulsions was positive ($> 30\text{mV}$ at pH 5). An isocratic reversed – phase liquid chromatography method was validated for ATQ quantification. The method was specific, linear, precise, and accurate for ATQ quantification. The drug content in all formulations was close 95%. The ATQ release from nanoemulsions was evaluated in two different media (RPMI-1640 + 0.5% albumin or PBS + 0.5% polysorbate 80) after separation of free ATQ on ultrafiltration membranes (cut off $0.1\mu\text{m}$). Whatever the media used, ATQ was progressively released from formulations upon the dilution ratio and remained constant over time. A higher release of ATQ was observed for nanoemulsions containing polysorbate 80 and in the media containing this non-ionic surfactant in sink conditions. The droplet size of nanoemulsions remained unchanged in the release conditions for nanoemulsions containing polysorbate 80 whereas an inversion of the ζ -potential from positive to negative values was detected. Such formulations showed *in vitro* an inhibition of parasite growth against an ATQ-resistant *P. falciparum* strain.

Keywords: atovaquone, cationic nanoemulsion, release studies, polysorbate 80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Estrutura química da atovaquona.....24
- Figura 2 - Representação da rota de degradação de fosfolipídeos.**Erro! Indicador não c**
- Figura 3 - Valores de log P calculados para fármacos formulados na forma de nanoemulsões, apresentados na Tabela 1..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de nanoemulsões lipídicas de diferentes composições.**Erro! Indicador não definido.**
-

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Exemplos da composição e método de obtenção de nanoemulsões como veículos para administração parenteral de fármacos..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 - Exemplos representativos de nanoemulsões de uso parenteral disponíveis comercialmente. **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
REFERÊNCIAS	27

CAPÍTULO 1

Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos.....	29
RESUMO	Erro! Indicador não definido.
INTRODUÇÃO.....	31
ASPECTOS TECNOLÓGICOS	Erro! Indicador não definido.
Composição das nanoemulsões.....	Erro! Indicador não definido.
Técnicas de preparação	Erro! Indicador não definido.
Taxa de associação do fármaco.....	Erro! Indicador não definido.
Propriedades físico-químicas	Erro! Indicador não definido.
Estabilidade	Erro! Indicador não definido.
Cinética de liberação	Erro! Indicador não definido.
ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS	Erro! Indicador não definido.
Diazepam.....	Erro! Indicador não definido.
Etomidato	Erro! Indicador não definido.
Propofol.....	Erro! Indicador não definido.
Palmitato de dexametasona.....	Erro! Indicador não definido.
Flurbiprofeno.....	Erro! Indicador não definido.
Prostaglandina E.....	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 2

Atovaquone-loaded cationic nanoemulsions: formulation, release and <i>in vitro</i> activity against resistant <i>Plasmodium falciparum</i> strains.....	33
RESUMO.....	Erro! Indicador não definido.
INTRODUCTION.....	Erro! Indicador não definido.
MATERIALS AND METHODS.....	Erro! Indicador não definido.
RESULTS.....	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSION.....	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSION.....	Erro! Indicador não definido.
REFERENCES.....	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* que pode levar à morte crianças e adultos. Em 2010, ocorreram 219 milhões de casos de malária e aproximadamente 660.000 mortes, atingindo mais de 100 países (WHO, 2013). No Brasil, a região Amazônica é considerada uma área endêmica para essa doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A malária atinge principalmente países localizados em regiões tropicais do planeta, onde o mosquito transmissor da doença (gênero *Anopheles*) se desenvolve. É nesse vetor que ocorre o ciclo sexuado da doença. O ciclo assexuado ocorre no homem e se divide em duas fases distintas: tissular (no fígado) e eritrocítica. Após o estágio pré-eritrocítico (tissular) de desenvolvimento e multiplicação, os merozoítos são liberados na corrente circulatória. Estes se ligam e penetram nos eritrócitos, seguido de replicação, rápido crescimento e divisão (esquizogonia), que resulta na produção de merozoítos capazes de penetrar em novos eritrócitos (RANG *et al.*, 2008; CDC, 2013).

Existem mais de 100 espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, dos quais apenas cinco infectam os humanos: *P.falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (CDC, 2013; RANG *et al.*, 2008). Os casos de malária por *P.falciparum* são os mais graves (RANG *et al.*, 2008), uma vez que a infecção causada por essa espécie é responsável pelas mais altas taxas de parasitemias e mortalidade (PIMENTEL *et al.*, 2007). A malária causada por essa espécie é conhecida como malária terçã maligna. A natureza maligna do *P. falciparum* pode estar relacionada com o fato de que a parasitemia ocorre indiscriminadamente em todas as hemácias com receptores para glicoforina. Adicionalmente, o *P. falciparum* induz a formação de proeminências nas membranas dos eritrócitos, responsáveis pela adesão ao endotélio dos microvasos. Esse processo causa obstrução vascular, hipoxia tecidual e/ou necrose isquêmica (RANG *et al.*, 2008; PIMENTEL *et al.*, 2007). O *P. falciparum* não possui um estágio exoeritrocítico, dessa forma, se o estágio eritrocítico for erradicado, não ocorrem recidivas (RANG *et al.*, 2008).

Apesar do grande número de fármacos disponíveis para o tratamento da malária, a complexidade do ciclo de vida do parasito e a versatilidade biológica do

mesmo lhe permitem adquirir resistência às inúmeras estratégias farmacoterapêuticas (VALE *et al.*, 2005). O *P. falciparum* é o responsável pelos casos mais graves de resistência, pois hoje ela é observada para todos os antimaláricos disponíveis, inclusive aos derivados de artemisinina, que vinham sendo utilizados com sucesso como uma última alternativa terapêutica para estes casos (WHO, 2013; EKLAND E FIDOCK, 2008; DONDORP *et al.*, 2009).

A atovaquona (ATQ) [Figura 1] é um fármaco hidroxinaftoquinonônico com potente atividade inibitória do crescimento de vários parasitas patogênicos, como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* e *P. falciparum* (RANG *et al.*, 2008; HANSSON *et al.*, 1996). O mecanismo de ação deste fármaco é primariamente pela inibição da cadeia de transporte de elétrons do parasita, possivelmente imitando o substrato natural ubiquinona. A sua absorção é variável e limitada, impedindo muitas vezes que a concentração plasmática necessária para a resposta terapêutica seja alcançada, sendo o seu caráter lipofílico a provável causa dessa baixa absorção (ROLAN *et al.*, 1994). Para o tratamento da malária, ATQ é utilizada em associação com o fármaco proguanil, da classe dos antifolatos, para obtenção de um efeito sinérgico (RANG *et al.*, 2008). Esta combinação está disponível comercialmente na forma de comprimido para administração oral (Malarone®), desenvolvido pela Glaxo Wellcome (Reino Unido).

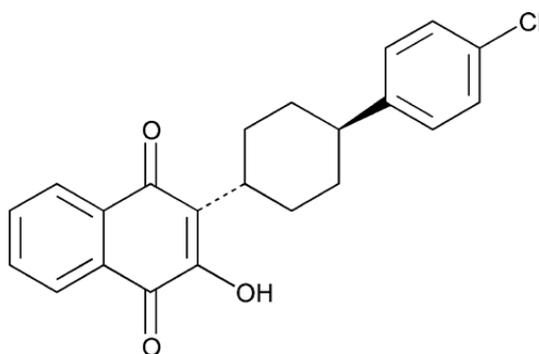


Figura 1 - Estrutura química da atovaquona.

A ATQ é um fármaco fracamente solúvel em uma variedade de solventes orgânicos e sua solubilidade em solventes aquosos é muito limitada (< 200ng/mL)

(CAUCHETIER *et al.*, 1999). Dessa maneira, a fim de aumentar a eficácia do tratamento com este fármaco, sua incorporação em sistemas de liberação com núcleo lipídico se torna uma possibilidade promissora para o tratamento da malária.

Dentre esses, podemos destacar as nanoemulsões de uso parenteral, que são sistemas em escala nanométrica, nos quais uma fase oleosa é dispersa, na forma de gotículas, em outra fase aquosa, formando o sistema "óleo em água" (O/A) (FLOYD, 1999; GERSHKOVICH *et al.*, 2008). A administração desses sistemas surgiu na década de 1960, como fonte de calorias e ácidos graxos essenciais para pacientes com necessidade de nutrição parenteral. Posteriormente, nanoemulsões foram desenvolvidas como sistemas carreadores de fármacos de reduzida hidrossolubilidade (FLOYD, 1999). Além disso, estudos recentes têm investigado a possibilidade de modulação na composição da interface dessas gotículas a fim de direcioná-las a alvos específicos através da incorporação de lipídeos catiônicos a fim de promover uma interação eletrostática entre nanoestruturas e eritrócitos (HASAN *et al.*, 2011).

Considerando-se as potencialidades da incorporação de compostos lipofílicos em sistemas nanoemulsionados catiônicos, bem como e seu direcionamento aos eritrócitos infectados por *P. falciparum*, a presente dissertação tem por objetivo geral o desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas de uso parenteral contendo ATQ. A dissertação está estruturada em dois capítulos:

— O capítulo I apresenta um artigo de revisão abordando os diferentes aspectos relativos ao desenvolvimento de nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral.

— O capítulo II apresenta os resultados experimentais relativos ao desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo ATQ, incluindo estudos de formulação, de caracterização físico-química, de validação de metodologia analítica, de liberação, bem como de inibição do crescimento *in vitro* de *P. falciparum*.

REFERÊNCIAS

CAUCHETIER, E., FESSI, H., BOULARD, Y., DENIAU, M., ASTIER, A., PAUL, M. Preparation and Physicochemical Characterization of Atovaquone-Containing Liposomes. **Drug Development Research**, v.47, p. 155–161, 1999.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Malaria**. Available at: <http://www.cdc.gov/malaria/> Accessed: February 2, 2013.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P.; TARNING, J.; LWIN, K. M.; ARIEY, F.; HANPITHAKPONG, W.; LEE, S. J.; RINGWALD, P.; SILAMUT, K.; IMWONG, M.; CHOTIVANICH, K.; LIM, P.; HERDMAN, T.; NA, S.S.; YEUNG, S.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N. P.; LINDE-GARDH, N.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. **The New England Journal of Medicine**, v.361, n.5, p.455–467, 2009.

EKLAND, E. H.; FIDOCK, D. A. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.743 – 747, 2008.

FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.2, n.4, p.134-143, 1999.

GERSHKOVICH, P.; WASAN, K.M.; BARTA, C.A.. A Review of the Application of Lipid-Based Systems in Systemic, Dermal/Transdermal, and Ocular Drug Delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.25, n.6, p.545-584, 2008.

HANSSON, A. G.; MITCHELL, S.; JATLOW, P.; RAINEY, P. M. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for atovaquone. **Journal of Chromatography B**, v.675, p.180-182, 1996.

HASAN, G. M., GARG, N., DOGRA, E., SUROLIA, R., GHOSH, P. C. Inhibition of the Growth of Plasmodium falciparum in Culture by Stearylamine-Phosphatidylcholine Liposomes. **Journal of Parasitology Research**, p.1-9, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Portal da saúde - SUS. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526 Accessed: February 5, 2013.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME, A. T., MOSQUEIRA, V. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.4, p.503-5014, 2007.

RANG, H.P.; DALE M. M.; RITTER J. M.; FLOWER R. J. **Farmacologia** In: Fármacos antiprotozoários. 6ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 698-711, 2008.

ROLAN, P. E.; MERCER, A. J.; WEATHERLEY, B. C.; HOLDICH, T.; MEIRE, H.; PECK, R. W.; RIDOUT, G.; POSNER, J. Examination of some factors responsible for a food-

induced increase in absorption of atovaquone. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.37, p.13-20, 1994.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, v.99, p.57-69, 2005.

WHO, World Health Organization, **Malaria**. Available at: <http://www.who.int/malaria/en/>
Accessed: February 2, 2013.

CAPÍTULO 1

Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos

Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos

Fernanda Bruxel, Manoela Laux, Luisa Bartmann Wild, Michelle Fraga, Leticia S. Koester e Helder F. Teixeira*

Química Nova, Vol. 35, No. 9, 1827-1840, 2012.

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

CAPÍTULO 2

**Atovaquone-loaded cationic nanoemulsions: formulation, release and *in vitro*
activity against resistant *Plasmodium falciparum* strains**

Atovaquone-loaded cationic nanoemulsions: formulation, release and *in vitro* activity against resistant *Plasmodium falciparum* strains

Luisa Bartmann Wild¹, Fernanda Bruxel¹, Philippe Loiseau², Sandrine Cojean², Elias Fattal³ and Helder Teixeira¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, Brazil.

² Chimiothérapie Antiparasitaire, Univ Paris-Sud, UMR 8076 CNRS, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay Malabry, France.

³ Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, Univ Paris-Sud, UMR 8612 CNRS, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay Malabry, France.

Artigo a ser submetido para publicação