

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

**Adsorção de oligonucleotídeos com atividade antimalárica em nanoemulsões:  
validação de método analítico e caracterização físico-química**

FERNANDA BRUXEL

PORTO ALEGRE, 2008



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

**Adsorção de oligonucleotídeos com atividade antimalárica em nanoemulsões:  
validação de método analítico e caracterização físico-química**

Dissertação apresentada por **Fernanda Bruxel**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadores:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

PORTO ALEGRE, 2008



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.11.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira  
Universidade Federal de Ouro Preto

<p>B913a    Bruxel, Fernanda           Adsorção de oligonucleotídeos com atividade antimalárica em nanoemulsões: validação de método analítico e caracterização físico-química / Fernanda Bruxel – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xx, 107 p. : il.</p> <p>          Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>          1. Nanoemulsões catiônicas. 2. Oligonucleotídeos. 3. Validação: métodos analíticos. 4. Malária. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 615.4</p>
---

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480



Agradecimentos à CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacocinética da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela disponibilização de equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos para elaboração da presente dissertação.





Aos meus pais Neusa e Egídio por serem responsáveis pelo meu caráter, meus valores e minhas conquistas.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Prof. Dr. Helder Teixeira e Prof. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres, pela oportunidade, confiança e paciência. Sinto-me privilegiada por ter trabalhado com profissionais exemplares e competentes como vocês. Ao Prof. Helder, obrigada pelo incentivo para seguimento da vida acadêmica, pela oportunidade de continuação deste trabalho em doutoramento e, sobretudo pela amizade. Muito obrigada.

Aos amigos e colegas do laboratório 405 e 605 desta Faculdade de Farmácia. Em especial a minha amiga Michelle Fraga por toda contribuição e principalmente pelo incentivo à realização do mestrado acadêmico. À Manoela Laux pelo auxílio na realização dos experimentos. A todos os amigos do curso de pós-graduação, pelo convívio e amizade.

A todos os professores e funcionários desta Faculdade que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a minha formação. Agradecimentos especiais aos professores Dr. George G. Ortega, Dr. Edison S. Carvalho, Dra. Letícia S. Koester, Dra. Tiana Tasca, Dra. Elfrides E. S. Schapoval e Dr. Alexandre J. Macedo pela colaboração, e à Dra. Grace Gosmann pela orientação na iniciação científica. À Cristiane e Moema, funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica, pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias apresentadas neste trabalho.

Aos meus pais Egídio e Neusa, e ao meu irmão Guilherme, pelo amor, carinho, apoio e compreensão em todos os momentos. Muito obrigada pelo exemplo de vida que são para mim. Ao Carlos, pelo incentivo, companheirismo e pelo tempo que soube esperar. Muito obrigada. Amo vocês.

A todos meus familiares e meus amigos, pela paciência e compreensão.



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT .....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo geral .....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	9
3.1 Malária.....	11
3.1.1 A doença .....	11
3.1.2 Transmissão .....	12
3.1.3 Ciclo de vida do parasito e sintomatologia .....	13
3.1.4 Prevenção, profilaxia e tratamento .....	15
3.2 Oligonucleotídeos antisense.....	18
3.3 Nanoemulsões catiônicas.....	23
3.3.1 Composição das nanoemulsões.....	26
3.3.1.1 Fase oleosa .....	26
3.3.1.2 Interface.....	27
3.3.1.3 Fase aquosa.....	29
3.3.2 Métodos de preparo .....	30
3.3.3 Propriedades das nanoemulsões .....	30
3.3.3.1 Diâmetro e morfologia de gotícula.....	31
3.3.3.2 Potencial zeta .....	32
3.3.3.3 pH.....	33
3.3.3.4 Viscosidade .....	34
3.3.4 Estudos de adsorção .....	35
3.3.4.1 Modelos de adsorção em interface.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Materiais .....	41
4.1.1 Ácido Nucléico.....	41
4.1.2 Outras Matérias-Primas.....	41
4.1.3 Aparelhos e Equipamentos.....	41
4.1.4 Reagentes e Solventes.....	42
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Preparação das nanoemulsões .....	43

4.2.2 Caracterização das nanoemulsões .....	44
4.2.2.1 Determinação do pH.....	44
4.2.2.2 Determinação do diâmetro de gotícula .....	44
4.2.2.3 Determinação do potencial zeta .....	44
4.2.2.4 Avaliação morfológica.....	45
4.2.2.5 Determinação da viscosidade.....	45
4.2.3 Determinação da densidade ótica (DO) dos ON .....	46
4.2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento dos ON.....	47
4.2.4.1 Seleção do comprimento de onda .....	48
4.2.4.2 Avaliação da especificidade .....	48
4.2.4.3 Determinação da linearidade.....	48
4.2.4.4 Determinação dos limites de detecção e quantificação .....	49
4.2.4.5 Avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.....	49
4.2.4.6 Avaliação da exatidão.....	50
4.2.5 Associação dos ON às nanoemulsões .....	51
4.2.5.1 Determinação da taxa de recuperação das membranas .....	52
4.2.5.2 Determinação da taxa de associação dos ON.....	52
4.2.5.3 Caracterização do sistema ON/nanoemulsão .....	53
4.2.5.4 Aplicação de modelos de adsorção .....	54
4.2.6 Análise estatística.....	54
4.2.7 Disposição de resíduos .....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
5.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões.....	59
5.1.1 Propriedades físico-químicas .....	59
5.1.2 Propriedades físico-químicas após armazenamento .....	62
5.2 Validação do método analítico.....	64
5.2.1 Determinação da DO dos ON.....	66
5.2.2 Seleção do comprimento de onda de leitura .....	67
5.2.3 Especificidade .....	68
5.2.4 Linearidade.....	69
5.2.5 Limites de Detecção e Quantificação .....	72
5.2.6 Precisão.....	73
5.2.7 Exatidão.....	76
5.3 Estudo de associação dos ON às nanoemulsões .....	77
5.3.1 Caracterização físico-química dos complexos.....	85
6. CONCLUSÕES .....	91
7. REFERÊNCIAS .....	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida do parasito causador da malária.....	13
Figura 2.	Resistência de fármacos ao <i>P. falciparum</i> . Dados de 2004, provenientes de estudos em locais sentinelas.....	16
Figura 3.	Representação esquemática do mecanismo antisense. ....	19
Figura 4.	Estrutura química dos lipídeos catiônicos OA e DOTAP.....	28
Figura 5.	Fotomicrografias das nanoemulsões PC; PC/OA e PC/DT, obtidas por MET, em aumento de 100.000X.....	62
Figura 6.	Estrutura química dos ON de série PO e PS.....	65
Figura 7.	Espectros de absorção de PO e PS em solução aquosa, na faixa de 200 a 400 nm.....	67
Figura 8.	Espectros de absorção dos ON (PO e PS) em solução aquosa. Espectro de absorção de uma solução glicerinada 2,25%, e adicionada dos ON (PO e PS). ....	69
Figura 9.	Representação gráfica das curvas padrão obtidas para PO e PS por espectrofotometria de absorção em UV a 262 nm. ....	70
Figura 10.	Estudo de recuperação de soluções aquosas de PO e PS em membranas de ultrafiltração após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos.....	78
Figura 11.	Isotermas de adsorção para ON de série PO e PS obtidas no estudo de associação por ultrafiltração/centrifugação.....	79
Figura 12.	Representação linear dos modelos de adsorção de ON às nanoemulsões catiônicas. Modelo de Langmuir para PO e PS e modelo de Freundlich para PO e PS.....	83
Figura 13.	Diâmetro médio de gotícula dos complexos formados com as nanoemulsões PC/OA e PC/DT após adição de quantidades crescentes de PO ou PS. Diâmetro médio de gotícula inicial das nanoemulsões PC/OA e PC/DT, antes da adição do ON. ....	86
Figura 14.	Potencial zeta dos complexos formados com as nanoemulsões PC/OA e PC/DT após adição de quantidades crescentes de PO ou PS. Potencial zeta inicial das nanoemulsões PC/OA e PC/DT, antes da adição do ON. ....	87
Figura 15.	Fotomicrografias dos complexos de PO com as nanoemulsões PC; PC/OA e PC/DT, e de PS com as nanoemulsões PC; PC/OA e PC/DT, obtidas por MET, em aumento de 100.000X.....	89





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais estudos utilizando a estratégia antisense para tratamento da malária.....	20
Tabela 2.	Composição das nanoemulsões (% , m/m) sem lipídeo catiônico (PC), com OA (PC/OA) e com DOTAP (PC/DT) em relação ao volume final obtido após evaporação dos solventes. ....	43
Tabela 3.	Modo de preparo das amostras pra realização do teste de recuperação dos ON PO e PS por espectrofotometria de absorção no UV. ....	51
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. ....	60
Tabela 5.	Propriedades físico-químicas das nanoemulsões após armazenamento a 4°C por 90 dias. ....	63
Tabela 6.	Cálculo da quantidade de PO e PS, em nmol e µg de ON, através de resultados provenientes da determinação da DO dos mesmos. ....	66
Tabela 7.	ANOVA dos resultados experimentais obtidos através do ensaio de linearidade para PO e PS por espectrofotometria de absorção em UV a 262 nm.....	71
Tabela 8.	Dados do estudo de linearidade do método para PO e PS, considerando três dias diferentes de experimentos.....	71
Tabela 9.	Limites de detecção e quantificação determinados matematicamente a partir dos valores obtidos pelas curvas padrão. ....	72
Tabela 10.	Precisão do método de determinação de ON de série PO por espectrofotometria de absorção em UV, com base nos resultados obtidos no estudo de linearidade.....	74
Tabela 11.	Precisão do método de determinação de ON de série PS por espectrofotometria de absorção em UV, com base nos resultados obtidos no estudo de linearidade.....	74
Tabela 12.	Precisão do método por espectrofotometria de absorção em UV, com base nas análises de PO e PS em solução glicerinada. ....	75
Tabela 13.	Resultados obtidos no teste de recuperação (exatidão) por espectrofotometria de absorção em UV para PO.....	76
Tabela 14.	Resultados obtidos no teste de recuperação (exatidão) por espectrofotometria de absorção em UV para PS. ....	77
Tabela 15.	Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos por regressão linear, baseados nos modelos de Langmuir e Freundlich, para adsorção de PO e PS a nanoemulsões catiônicas.....	83
Tabela 16.	Constantes calculadas através das equações das retas, obtidas experimentalmente na análise de regressão linear, e da equação proposta pelo modelo de adsorção de Langmuir.....	84



## ABREVIATURAS

[+/-] - relação de cargas positivas (lipídeo catiônico) e negativas (ON)

ANOVA - análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - adenosina trifosfato

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

COSAT - Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho

DHFR - diidrofolato redutase

DNA - ácido desoxirribonucléico

DO - densidade ótica

DOTAP - 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano

DPR - desvio padrão relativo

EHL - equilíbrio hidrófilo/lipófilo

FDA - *Food and Drug Administration*

HCl - ácido clorídrico

ICH - *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

LD - limite de detecção

LQ - limite de quantificação

MET - microscopia eletrônica de transmissão

NaCl - cloreto de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

O/A - óleo/água

OA - oleilamina

ON - oligonucleotídeo

*P. falciparum* - *Plasmodium falciparum*

*P. malariae* - *Plasmodium malariae*

*P. ovale* - *Plasmodium ovale*

*P. vivax* - *Plasmodium vivax*

PC - lecitina

PC/DT - lecitina/DOTAP

PC/OA - lecitina/oleilamina

PEG - polietilenoglicol

PO - oligonucleotídeo fosfodiéster

PS - oligonucleotídeo fosforotioato

RBMP - *Roll Back Malaria Partnership*

RNA - ácido ribonucléico

TCL - triglicerídeos de cadeia longa

TCM - triglicerídeos de cadeia média

TS - timidilato sintetase

USP - *The United States Pharmacopoeia*

UV - ultravioleta

## RESUMO

Nanoemulsões catiônicas têm sido consideradas como potenciais sistemas carreadores para oligonucleotídeos (ON) antisense. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanoemulsões catiônicas como um sistema de liberação para ON anti-topoisomerase II de *Plasmodium falciparum*. Primeiramente, nanoemulsões constituídas de triglicerídeos de cadeia média, lecitina de gema de ovo, glicerol e água contendo os lipídeos catiônicos oleilamina ou DOTAP (2 mM) foram obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea. Este procedimento resultou em formulações monodispersas com diâmetro de gotícula de 200-260 nm e potencial zeta de +50 e +55 mV. Após, um método espectrofotométrico no UV para quantificação dos ON em série fosfodiéster (PO) ou fosforotioato (PS) foi validado. O método mostrou-se linear, específico, preciso e exato para a determinação de PO e PS, sem diferenças significativas entre os ON. Nas condições validadas, as isotermas de adsorção dos ON às nanoemulsões foram obtidas através da determinação dos ON na fase aquosa externa das nanoemulsões, após ultrafiltração/centrifugação dos complexos. A taxa de recuperação através das membranas de ultrafiltração de celulose regenerada (30 kDa) foi superior a 92%. Os resultados indicam a adsorção progressiva dos ON com as nanoemulsões, até cerca de 60 mg/g de fase interna para o complexo DOTAP-PS. Finalmente, evidências adicionais da adsorção de PO e PS às nanoemulsões foram detectadas pelo aumento do diâmetro de gotícula, inversão do potencial zeta e morfologia das gotículas avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. O conjunto dos resultados obtidos demonstra que ON de série PO e PS anti-topoisomerase II de *P. falciparum* podem ser adsorvidos eficientemente às nanoemulsões catiônicas.

**Palavras-Chave:** malária, oligonucleotídeos, nanoemulsões catiônicas, validação, caracterização físico-química.



## ABSTRACT

Cationic nanoemulsions have been recently considered as a potential delivery system for antisense oligonucleotides (ON). The aim of the present work was to evaluate cationic nanoemulsions as a delivery system for ON against the *Plasmodium falciparum* topoisomerase II gene. Firstly, nanoemulsions composed of medium chain triglycerides, egg yolk lecithin, glycerol and water, containing the cationic lipids oleylamine or DOTAP (2 mM) were obtained through spontaneous emulsification process. This procedure resulted in monodisperse formulations with droplet size of 200-260 nm and zeta potential of +50 and +55mV. After that, an UV spectrophotometric method for the quantification of either phosphodiester (PO) or phosphorothioate (PS) ON was validated. The method was linear, specific, precise, and accurate for the determination of PO and PS, without significant differences between both ON. In the validated conditions, ON adsorption isotherms with nanoemulsions were obtained through the ON determination in the external phase of nanoemulsions, after ultrafiltration/centrifugation of complexes. The recovery through regenerated cellulose membranes (30kDa) was higher than 92%. The results showed a progressive ON adsorption to the nanoemulsions up to approximately 60mg/g of internal phase for DOTAP-PS complexes. Finally, additional evidences of PO and PS adsorption to nanoemulsions could also be detected by the increase of the mean droplet size, the inversion of the zeta potential and the morphology of the oil droplets obtained by transmission electron microscopy. The overall results showed that PO and PS ON against *P. falciparum* anti-topoisomerase II gene can be efficiently adsorbed to the cationic nanoemulsions.

**Keywords:** malaria, oligonucleotides, cationic nanoemulsions, validation, physicochemical characterization





## 1. INTRODUÇÃO

---



---

A malária ou paludismo é uma doença que atinge hoje mais de 100 países, levando mais de um milhão de pessoas à morte anualmente (BRAGA e FONTES, 2005; OMS, 2008). A malária é uma infecção causada pelo parasito intracelular do gênero *Plasmodium*, que se desenvolve principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o continente africano o principal atingido (RBMP, 2008).

A situação da malária agravou-se com o surgimento da farmacorresistência dos parasitos aos principais antimaláricos (OMS, 2005). *Plasmodium falciparum*, o principal causador da malária severa e fatal, tem demonstrado resistência a diversos antimaláricos utilizados (TRACY e WEBSTER, 2003; OMS, 2006; EKLAND e FIDOCK, 2008). Assim, há uma necessidade primordial para o desenvolvimento de novos fármacos para o combate desta doença.

Neste contexto, diversos pesquisadores têm investigado as potencialidades do uso de ácidos nucléicos no tratamento da malária. Estudos relativos ao emprego de fragmentos de ácidos nucléicos em fita simples, denominados oligonucleotídeos (ON) antisense, têm sido particularmente descritos por serem capazes de interferir de maneira específica na expressão gênica, inibindo o crescimento dos parasitos (RAPAPORT *et al.*, 1992; BARKER *et al.*, 1996; KANAGARATNAM *et al.*, 1998; WANIDWORANUN *et al.*, 1999; NOONPAKDEE *et al.*, 2003; FÖGER *et al.*, 2006). Os melhores resultados *in vitro* foram obtidos com ON direcionados a inibição específica da enzima topoisomerase II de *P. falciparum* (NOONPAKDEE *et al.*, 2003; FÖGER *et al.*, 2006). Apesar de promissores, esses resultados são ainda muito modestos na inibição do crescimento do parasito.

Apesar do potencial terapêutico dos ON antisense, sua aplicação é limitada por fatores como a reduzida penetração intracelular e a instabilidade frente a enzimas celulares. O transporte para o interior das células é limitado pelo elevado peso molecular e pelo caráter polianiônico dos ON, que ocasiona a repulsão eletrostática das membranas celulares (JAASKELAINEN e URTTI, 2002). A estabilidade dos ON é limitada pela rápida degradação pelas nucleases, presentes em fluídos biológicos, limitando suas aplicações *in vivo* (MÖNKKÖNEN e URTTI, 1998; OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002).

---

Visando contornar esses inconvenientes, nanoemulsões catiônicas têm sido propostas como carreadores para ON. Esses sistemas são constituídos por um núcleo oleoso estabilizado por uma mistura binária de fosfolipídeos e lipídeos catiônicos. A presença do lipídeo catiônico é fundamental na associação dos ON a estrutura coloidal através de interações eletrostáticas, entre os ON carregados negativamente e os lipídeos carregados positivamente (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2003; TRIMAILLE *et al.*, 2003; MARTINI *et al.*, 2007). A capacidade desses nanossistemas em aumentar a penetração de ON em células tumorais, após a administração local em camundongos, e protegê-los da degradação enzimática pelas nucleases, através de um ensaio de hibridação competitiva, foi previamente demonstrada (TEIXEIRA *et al.*, 2001a, 2003).

Estudos recentes, em nosso grupo de trabalho, demonstram a possibilidade de modular a eficiência de associação e a cinética de liberação de ácidos nucleicos (ON e plasmídeos) a partir de nanoemulsões, em especial, através da seleção do tipo de lipídeo catiônico e/ou fosfolipídeo empregado e da relação de cargas [+/-] (MARTINI, 2005; SILVA *et al.*, 2006; FRAGA, 2007; MARTINI *et al.*, 2007). Desta forma, considerando-se as potencialidades dos ON no tratamento da malária e das nanoemulsões como carreadores para esses fragmentos de ácidos nucleicos, a presente dissertação visa avaliar a adsorção de ON em série fosfodiéster (PO) e fosforotioato (PS), com potencial atividade antimalárica, às nanoemulsões catiônicas otimizadas por MARTINI (2005).

---

## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo geral

Caracterização da adsorção de oligonucleotídeos anti-topoisomerase II de *P. falciparum* em nanoemulsões catiônicas.

## 2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar as propriedades físico-químicas de nanoemulsões catiônicas obtidas por emulsificação espontânea.
  - Validar método analítico para quantificação dos oligonucleotídeos em série PO e PS por espectrofotometria no ultravioleta.
  - Avaliar a adsorção e caracterizar as propriedades físico-químicas dos complexos formados entre nanoemulsões e ON.
-





### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---



---

### 3.1 Malária

#### 3.1.1 A doença

A malária (ou paludismo) é um problema de saúde pública mundial, que afeta cerca de 300 milhões de pessoas, resultando em mais de um milhão de mortes por ano. A doença atinge principalmente mulheres, crianças e imunodeprimidos (BRAGA e FONTES, 2005; OMS, 2008). Na África, 3 mil crianças morrem por dia devido à doença, onde se localizam 90% dos casos de malária (RUXIN *et al.*, 2005; OMS, 2008; RBMP, 2008). A situação da malária começou a agravar-se a partir dos anos 80, devido à resistência dos parasitos aos principais antimaláricos utilizados para o tratamento da doença, bem como dos próprios mosquitos aos inseticidas. Além disso, a instabilidade econômica, as guerras e as diversas situações de emergência limitaram o sucesso dos programas de combate contra a enfermidade, que até então vinham sendo efetivos (OMS, 2006).

Atualmente, a malária está presente em 109 países, embora com prevalência diferente, visto que é tipicamente uma doença de países em desenvolvimento. As regiões atingidas pela doença encontram-se principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre, devido ao calor e umidade característicos do clima da região, ideais para o desenvolvimento do mosquito *Anopheles*, transmissor da doença (CDC, 2005; RBMP, 2008).

No Brasil, a cada ano surgem cerca de 500 mil novos casos. No final do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional. O maior número de casos ocorreu em 2000, quando o país contava com mais de 610 mil casos, 99% na região amazônica. Estes números representavam 40% do total de casos de malária das Américas (CAMARGO, 2003; OMS, 2005). Assim, foram criados em 2000, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região Amazônica, e em 2001, o projeto da Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas, em conjunto com a Organização Pan-Americana de Saúde. Em 2003, a Secretaria de Vigilância em Saúde implantou o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária na Região Amazônica e o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (BRASIL, 2003b; 2005).

---

---

Esforços também têm sido dedicados ao combate à doença em nível mundial. Em 2008, um plano de ação global contra a malária, o *Global Malaria Action Plan*, que engloba mais de 65 instituições internacionais, foi criado pela *Roll Back Malaria Partnership* (RBMP), uma parceria a nível mundial. Este plano tem como objetivo reduzir o número de casos de malária existentes no ano de 2000 para 75% em 2015, além de reduzir a mortalidade para praticamente zero, erradicando a doença a longo prazo. Os custos previstos para investimento em novas ferramentas para o controle da doença giram em torno de 750 a 900 milhões de dólares por ano, o que engloba a pesquisa e desenvolvimento de novas intervenções antimaláricas e prevenção do aumento da resistência, incluindo ferramentas para controle de vetores, diagnóstico, vacinas e novos fármacos (RBMP, 2008).

### **3.1.2 Transmissão**

A transmissão da malária se dá pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, que através de suas glândulas salivares, inoculam as formas infectantes do parasito durante o repasto sanguíneo (BRAGA e FONTES, 2005; OMS, 2007). O desenvolvimento do parasito no mosquito depende de inúmeros fatores, sendo o calor e a umidade os principais, pois permitem que o mosquito sobreviva o tempo suficiente para o desenvolvimento completo do ciclo do parasito no hospedeiro (10 a 18 dias, de gametócito a esporozoíto). O mosquito atua apenas como um vetor, pois não sofre a presença do parasito em seu organismo (CDC, 2005).

De mais de cem espécies de do gênero *Plasmodium* existentes, apenas quatro podem infectar os seres humanos causando a doença, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum* (OMS, 2007). Os dois primeiros possuem estágios dormentes no fígado (hipnozoítos), que podem reativar a doença muitos meses após o contágio. A infecção por qualquer um destes parasitos pode causar sintomas graves, contudo, infecções por *P. falciparum* são consideradas as mais severas, podendo ser fatais (CDC, 2005). No Brasil, metade dos casos de malária são causados pelo *P. vivax* ou *P. malariae* e outra metade pelo *P. falciparum* (BRAGA E FONTES, 2005), sendo que a proporção de malária por esta última espécie tem aumentado de 2000 a 2006, principalmente na região amazônica (OMS, 2007).

---

### 3.1.3 Ciclo de vida do parasito e sintomatologia

A malária é uma doença infecciosa sistêmica, na qual vários órgãos podem ser atingidos isolada ou conjuntamente, ocorrendo desde casos benignos e crônicos até formas agudas ou fatais. O ciclo da doença se processa em dois hospedeiros: no mosquito e no homem, conforme pode ser observado na figura 1. No homem ocorrem duas fases distintas, a exoeritrocítica (nos hepatócitos) e a eritrocítica (BRAGA e FONTES, 2005; CDC, 2005).

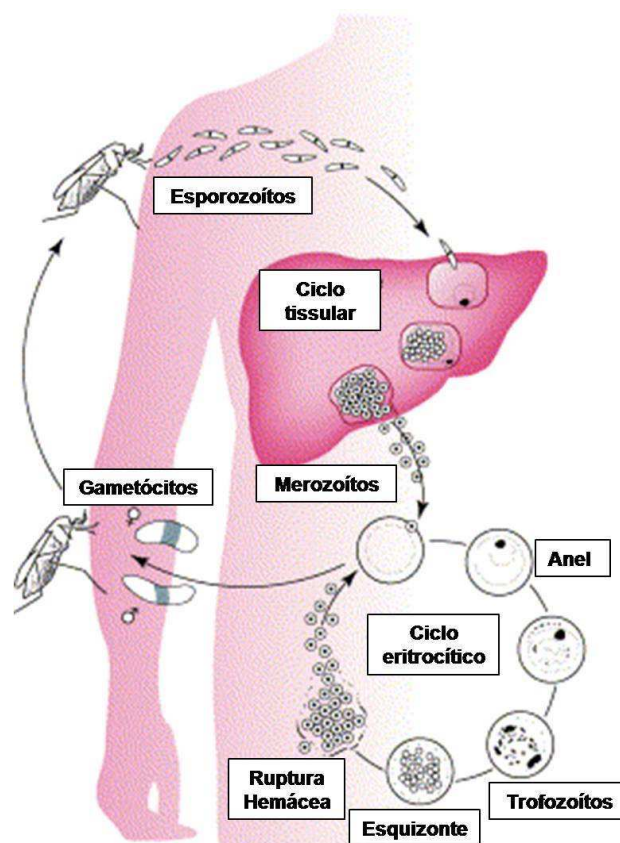


Figura 1. Ciclo de vida do parasito causador da malária (adaptado de <http://www.fda.gov>).

Após a picada pelo vetor, os esporozoítos presentes na saliva do mosquito *Anopheles* atingem a corrente sanguínea e dirigem-se para o fígado. Invadem então os hepatócitos e produzem milhares de merozoítos. Estes podem romper os hepatócitos e se deslocar para a corrente sanguínea para posterior invasão de hemácias, ou invadir novos hepatócitos e permanecer em estado dormente no fígado (ciclo tissular, exoeritrocítico) (BRAGA e FONTES, 2005; OMS, 2007).

O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos. Os merozoítos se desenvolvem e invadem novos eritrócitos por diversas vezes, até o momento que se diferenciam a gametócitos, por estágios sexuais. Os gametócitos por sua vez, serão ingeridos pelo mosquito vetor durante a picada e seguirão nele um novo ciclo (CDC, 2005).

Os sintomas ocorrem durante o ciclo eritrocítico. O paciente apresenta sintomas iniciais como mal-estar, dores de cabeça, cansaço, mialgia e indisposição geral. Após, acentua-se a febre e dentro de alguns dias o paciente entra no acesso malárico, que ocorre em intervalos periódicos regulares, característicos para cada espécie. Estes intervalos correspondem ao tempo de processamento da esquizogonia sangüínea: 48 horas para *P. falciparum* (terça maligna), *P. vivax* e *P. ovale* (terça benigna) e 72 horas para *P. malariae* (quarta benigna) (BRAGA e FONTES, 2005; GRIFFITH *et al.*, 2007).

O acesso malárico caracteriza-se por calafrios, sensação de calor e sudorese intensa. Consiste de três fases distintas, que podem durar de 6 a 10 horas. Primeiramente, o paciente apresenta calafrios, tremores intensos e elevação da temperatura, que dura de 20 a 60 minutos. Em um segundo momento, tem uma forte sensação de calor, rosto avermelhado, fortes dores de cabeça, pulsação elevada e febre. O paciente permanece neste quadro por 2 a 3 horas, quando inicia a fase de sudorese intensa, acompanhadas de sensação de alívio (CDC, 2005; OMS, 2007).

A anemia ocorre devido à destruição geral dos eritrócitos pelos macrófagos, não apenas dos eritrócitos infectados, sendo freqüentemente mais problemática em crianças e gestantes infectadas por *P. falciparum* ou *P. vivax*, podendo levar a discrasias e desenvolvimento anormal da medula óssea (CDC, 2005). A malária severa (causada pelo *P. falciparum*) é caracterizada por sintomas mais graves, como problemas respiratórios, convulsões múltiplas, choque, edema pulmonar, anemia severa, falência renal aguda, acidose, hemoglobinúria e parasitemia maior que 5 % (CDC, 2005; GRIFFITH *et al.*, 2007). Além disso, os eritrócitos infectados aderem às paredes dos vasos sangüíneos, impedindo a livre circulação. Quando isto ocorre no cérebro, pode ser um fator causador da denominada malária cerebral (CDC, 2005; OMS, 2006).

---

---

Após muitos anos de exposição contínua a malária, algumas pessoas podem desenvolver imunidade, que limita o desenvolvimento de parasitemias graves. Fatores genéticos também estão envolvidos, protegendo relativamente contra os sintomas severos e a morte causada por *P. falciparum* (CDC, 2005).

### **3.1.4 Prevenção, profilaxia e tratamento**

Diversas maneiras de prevenção têm sido utilizadas na luta contra o paludismo, entre as quais o combate ao mosquito, correto diagnóstico e tratamento de pacientes infectados, administração de antimaláricos de forma profilática, especialmente a grupos mais vulneráveis, como gestantes e crianças. O controle do vetor através de medidas de saneamento básico, ou ações destinadas a eliminar criadouros de mosquitos não gera os melhores resultados. Dedetizar ou telar casas, utilizar mosquiteiros e repelentes acaba sendo pouco útil, visto que o mosquito permanece do lado de fora a qualquer horário do dia (CAMARGO, 2003; OMS, 2006). O correto diagnóstico muitas vezes tem sido prejudicado em países onde a doença é infreqüente (CDC, 2005).

Entretanto, a principal dificuldade na luta mundial contra a malária reside principalmente na farmacorresistência. A complexidade de ciclo de vida do parasito e a versatilidade biológica do mesmo lhe permitem adquirir resistência às inúmeras estratégias quimioterapêuticas (VALE *et al.*, 2005).

Na literatura encontram-se relatos de resistência a maioria dos fármacos utilizados no tratamento da malária (figura 2). Em 1910, surgia o primeiro relato de resistência a quinina (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002). A cloroquina, que é o antimalárico mais utilizado e mais barato, já perdeu sua eficácia na maior parte do mundo. Outras terapias de primeira linha, como sulfadoxina/pirimetamina, já atingiram altos níveis de resistência ao *P. falciparum* em muitas regiões endêmicas. As formas resistentes podem não responder adequadamente até mesmo a doses tóxicas de mefloquina ou quinina (OMS, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2007; EKLAND e FIDOCK, 2008). No Brasil, tem sido registrada, em diferentes níveis, a resistência do *P. falciparum* à cloroquina, à amodiaquina, à quinina e à mefloquina (BRASIL, 2005).

---

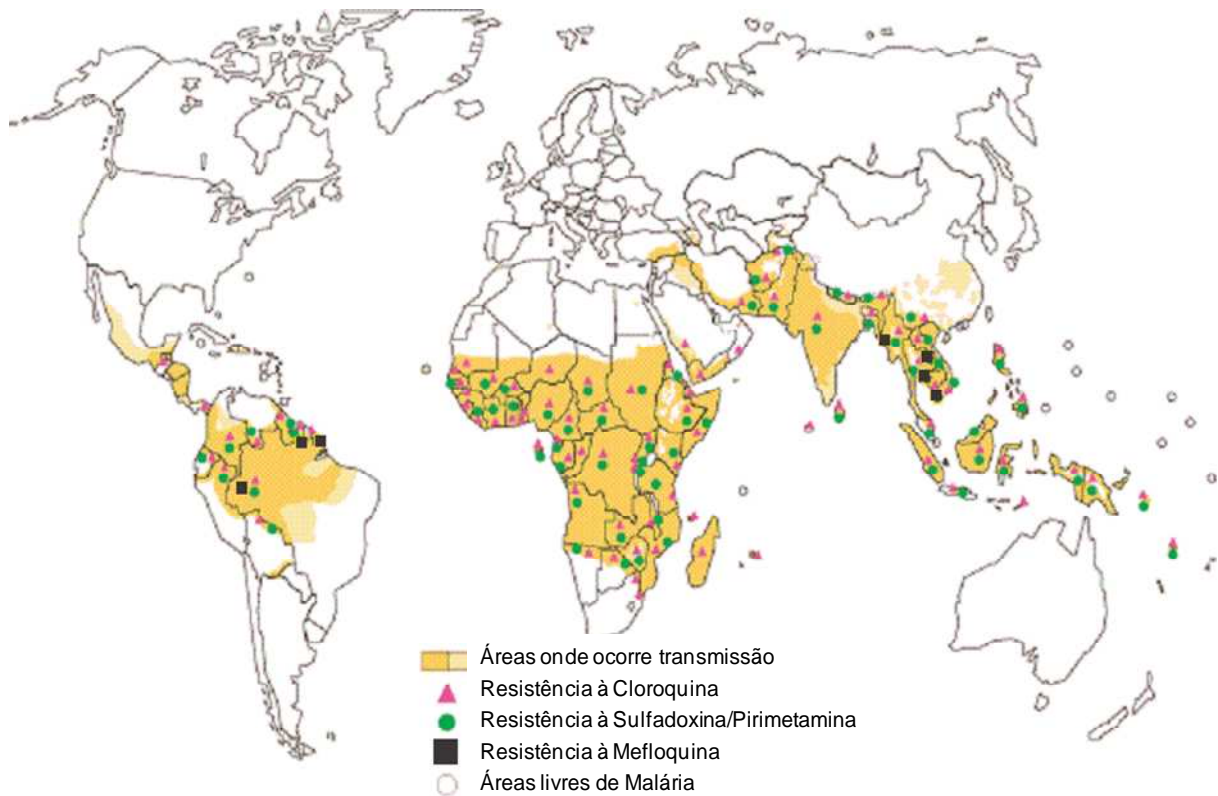


Figura 2. Resistência de fármacos ao *P. falciparum*. Dados de 2004, provenientes de estudos em locais sentinelas, da Organização Mundial da Saúde (adaptado de OMS, 2005).

O surgimento de resistência aos diversos fármacos está condicionado a diversos fatores, relacionados ao parasito, ao fármaco, ao paciente e ao vetor. Os casos mais graves estão relacionados ao parasito *P. falciparum*, apesar de que cepas de *P. vivax* também já desenvolveram resistência. *P. malariae* ou *P. ovale* não têm causado preocupações até o momento. Apesar de existirem áreas onde a resistência ainda é mínima (América Central), há regiões da Ásia e Amazônia onde o parasito se tornou resistente a múltiplos fármacos (WONGSRICHANALAI, *et al.*, 2002). Parasitos que já desenvolveram resistência podem ter maior tendência a adquirir resistência a novos fármacos, não relacionados com os que originaram a resistência inicial. Por isso, geralmente são indicadas terapias combinadas, utilizando-se dois ou mais agentes antimaláricos complementares (TRACY e WEBSTER, 2003).

Visando contornar o problema da resistência, terapias combinadas com artemisinina têm sido utilizadas com sucesso. Estas terapias possuem alto custo,



---

além de não estarem disponíveis em todos os países (OMS, 2005; GRIFFITH *et al.*, 2007). Mesmo assim, elas têm sido cada vez mais utilizadas, o que acaba aumentando ainda mais a pressão para a seleção de cepas resistentes (OMS, 2007). As sulfonamidas também demonstraram ser eficazes na associação com a pirimetamina contra cepas resistentes de *P. falciparum*. Entretanto, a cloroquina somente ainda é utilizada devido à sua eficácia contra *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, além de algumas cepas de *P. falciparum* sensíveis (TRACY e WEBSTER, 2003).

No Brasil, o esquema recomendado para tratamento das infecções por *P. falciparum* baseia-se na combinação de quinina, doxiciclina e primaquina, ou alternativamente, quinina somente, ou mefloquina combinada a primaquina, que também são utilizados em infecções mistas com *P. vivax*. Para a malária grave, a primeira escolha envolve os derivados da artemisinina (BRASIL, 2001; RBMP, 2005).

Para profilaxia, a política adotada atualmente no país baseia-se apenas nas medidas de proteção individual para evitar o contato com o mosquito, sendo a quimioprofilaxia recomendada somente a mefloquina, utilizada apenas para viajantes internacionais e grupos especiais (BRASIL, 2001; BRAGA e FONTES, 2005; OMS, 2005). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda ainda: atovaquona/proguanil, doxiciclina, mefloquina ou primaquina (em situações especiais) (CDC, 2005). A quimioprofilaxia não tem sido adotada nas áreas endêmicas do mundo devido ao padrão heterogêneo de resistência do *P. falciparum*, do alto custo e toxicidade dos novos medicamentos (BRASIL, 2001). Além disso, nenhum fármaco pode garantir proteção total contra a doença (OMS, 2007).

Infecção por malária em mulheres grávidas envolve altos riscos de morbidade e mortalidade materna e fetal, incluindo anemia, retardo no crescimento, aborto espontâneo, prematuridade, recém-nascidos de baixo peso, infecção congênita e morte do feto. Estima-se que 60% dos casos de malária durante a gravidez resultem em perda do feto, além de 10% de morte materna (CDC, 2005; OMS, 2007). Entretanto, os medicamentos disponíveis para tratamento e prevenção não são considerados seguros (CDC, 2005; GRIFFITH *et al.*, 2007).

---

Com a progressiva extensão da resistência e o potencial de toxicidade dos antimaláricos disponíveis, a quimioprofilaxia e o tratamento da malária passou a representar um tema polêmico nos últimos anos. O desenvolvimento de novas estratégias torna-se indispensável, sendo primordial a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o combate da doença.

### **3.2 Oligonucleotídeos antisense**

Neste contexto, estudos relativos ao emprego de oligonucleotídeos (ON) têm sido correntemente descritos na literatura para diversas aplicações, incluindo doenças parasitárias (COUVREUR e MALVY, 2000). Os ON são constituídos de 12 a 40 nucleotídeos em fita simples, organizados em uma seqüência estabelecida para se hibridar de maneira específica com um determinado gene, um RNA mensageiro ou ainda uma proteína. Estes fragmentos de ácidos nucléicos são capazes de interferir na expressão gênica, caracterizando a base da terapia com ON, a qual se constitui de três diferentes estratégias: (i) Estratégia anti-gênica: o processo de transcrição do DNA em fita dupla para RNA mensageiro em fita simples é inibido pelos ON, através do pareamento de bases do tipo Hoogsteen; (ii) Estratégia antisense: o processo de tradução é restringido pelos ON complementares ao RNA mensageiro, através de pontes de Hidrogênio do tipo Watson e Crick; (iii) Estratégia aptâmeros: os ON interagem com proteínas, interferindo nas suas atividades, via pontes de hidrogênio (LIANG *et al.*, 1999).

A estratégia antisense (figura 3) permite a inibição da biossíntese de uma proteína basicamente por dois mecanismos principais: a enzima RNase H reconhece o *duplex* formado entre o ON antisense e o RNA mensageiro e realiza a quebra deste RNA, ou o *duplex* formado bloqueia o maquinário da tradução por inibição estérica (FICHOU e FÉREC, 2006). Atualmente, diversos estudos clínicos baseados na terapia antisense encontram-se em andamento, em especial, na terapia do câncer e nas infecções bacterianas e virais (OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002; STAHEL e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2003). Em 1998, a comercialização de uma seqüência de ON contendo ligações fosforotioato para o tratamento local de retinite

---

induzida por citomegalovírus (VITRAVENE<sup>®</sup>, Isis Pharmaceutical Inc.) foi autorizada (FICHOU e FÉREC, 2006).

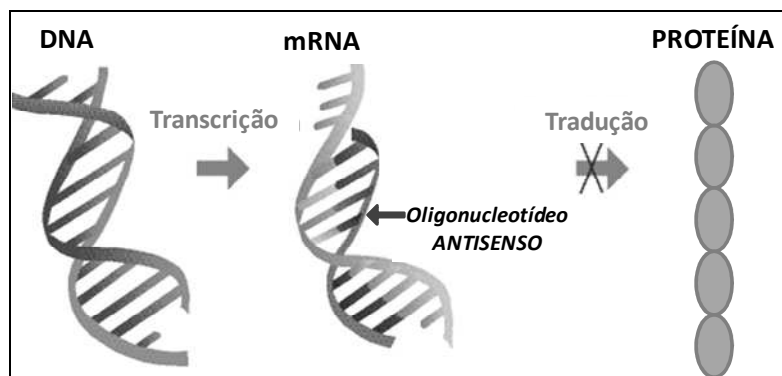


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo antisense.

Entretanto, apesar das reconhecidas potencialidades terapêuticas dos ON, diversas aplicações permanecem limitadas, principalmente para ON contendo em sua estrutura as ligações fosfodiéster naturais. Primeiramente, o elevado peso molecular e o caráter polianiónico dos ON limitam o seu transporte intracelular, em decorrência da repulsão eletrostática com as membranas celulares (JAASKELAINEN e URTTI, 2002). Além disso, a instabilidade dos ON em fluidos biológicos, devido à rápida degradação frente ao ataque das endo e exonucleases, limita o uso destas moléculas *in vivo* (MÖNKKÖNEN e URTTI, 1998; OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002). E ainda, os ON podem apresentar efeitos inibitórios não relacionados ao seu efeito antisense, ao se ligar a receptores, enzimas e proteínas, alterando suas funções (LAMBERT *et al.*, 2001; TOUB *et al.*, 2006).

A fim de contornar esses inconvenientes, a modificação química dos ON tem sido estudada, seja através de alterações da natureza das ligações internucleosídeos, da estrutura dos açúcares, ou das bases (COUVREUR e MALVY, 2000). Algumas destas modificações, entretanto, podem levar a uma redução da habilidade de pareamento dos ON (URBAN e NOE, 2003).

A substituição de um oxigênio não ligante da ligação fosfodiéster por um enxofre constitui a classe dos fosforotioatos, sendo esta correntemente utilizada devido a sua estabilidade em fluidos biológicos (HUGHES *et al.*, 2001; STAHEL e ZANGEMEISTER-WITTKKE, 2003). Contudo, o uso de ON fosforotioatos por via

sistêmica pode ser limitado devido à toxicidade decorrente da interação não específica com algumas proteínas e perturbação de suas funções, como por exemplo, as polimerases, certas proteínas membranares e a albumina (KRIEG e STEIN, 1995; LIANG *et al.*, 1999; OPALINSKA e GEWIRTZ, 2002; TOUB *et al.*, 2006). Ainda apresentando as limitações mencionadas, a maioria dos estudos utiliza ON modificados na forma de fosforotioato.

Diversos estudos descrevem o efeito de ON antisense sobre a inibição do crescimento de *P. falciparum in vitro*, com seqüências complementares a diversos alvos (tabela 1). Uma vez que os parasitos se multiplicam rapidamente após a infecção dos eritrócitos, as enzimas de replicação e os genes envolvidos têm merecido considerável atenção por parte dos pesquisadores como potenciais alvos para terapia antisense. Pode-se citar a diidrofolato redutase (DHFR) - timidilato sintetase (TS), aldolase e topoisomerase II (SARTORIUS e FRANKLIN, 1991; RAPAPORT *et al.*, 1992; BARKER *et al.*, 1996; RAMASAMY *et al.*, 1996; WANIDWORANUN *et al.*, 1999; NOONPAKDEE *et al.*, 2003; FÖGER *et al.*, 2006).

Tabela 1. Principais estudos utilizando a estratégia antisense para tratamento da malária.

<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
Dihidrofolato-redutase-timidilato-sintetase	Sartorius e Franklin, 1991; Rapaport <i>et al.</i> , 1992; Barker <i>et al.</i> , 1996; Ramasamy <i>et al.</i> , 1996.
Proteína de superfície do merozoíto P195	Rapaport <i>et al.</i> , 1992.
Dihidropteroato sintetase	Barker <i>et al.</i> , 1996.
Ribonucleotídeo redutase	Barker <i>et al.</i> , 1996.
DNA polimerase	Barker <i>et al.</i> , 1996.
Triose fosfato isomerase	Barker <i>et al.</i> , 1996.
Multigene da família esquizonte	Barker <i>et al.</i> , 1996.
Proteína de superfície do merozoíto EBA175	Barker <i>et al.</i> , 1996.
Proteína de superfície do merozoíto MSA-2	Kanagaratnam <i>et al.</i> , 1998.
Aldolase	Wanidworanun <i>et al.</i> , 1999.
Topoisomerase II	Noonpakdee <i>et al.</i> , 2003; Föger <i>et al.</i> , 2006.

---

Inicialmente, o gene da enzima DHFR-TS se mostrava um alvo de interesse devido à incapacidade dos parasitos *P. falciparum* realizarem a síntese *de novo* de purinas. Inclusive, o antimalárico pirimetamina, um fármaco antifolato, atua através deste mecanismo. Hoje, entretanto, já é inefetivo devido ao surgimento de resistência (SARTORIUS e FRANKLIN, 1991; RAPAPORT *et al.*, 1992; BARKER *et al.*, 1996; RAMASAMY *et al.*, 1996; COUVREUR e MALVY, 2000). Dentre os primeiros estudos, SARTORIUS e FRANKLIN (1991) verificaram que somente seqüências longas de oligonucleotídeos fosfodiéster (maiores que 30 bases) eram eficientes contra o RNA mensageiro da enzima DHFR-TS, tanto para a região do sítio de iniciação da tradução como para a região codificante da TS.

Em continuidade, RAPAPORT e colaboradores (1992) testaram diversas seqüências, com diferentes modificações químicas, direcionadas a dois diferentes alvos: um antígeno de superfície do merozoíto e a enzima DHFR-TS. Esta última mostrou-se melhor alvo, para o qual os autores demonstraram a inibição do crescimento de cepas de *P. falciparum*, resistentes ou sensíveis à cloroquina. Mais tarde, o mesmo grupo descreveu a inibição de crescimento de *P. falciparum* frente a diversos outros alvos, comparando seqüências antisense a seqüências controles embaralhadas. Os autores concluíram que genes da DNA polimerase e triose fosfato isomerase (enzima da via glicolítica) foram os menos sensíveis à ação dos ON (BARKER *et al.*, 1996). O conjunto de resultados indicou ainda que, em concentrações inferiores a 0,5  $\mu\text{M}$ , os ON antisense direcionados a vários genes inibem de modo seqüência-dependente o crescimento dos parasitos, enquanto em concentração superiores (1,0  $\mu\text{M}$ ), a inibição é seqüência-independente. Os autores relacionam essa inespecificidade de ação ao caráter polianiónico dos ON, principalmente para ON de série fosforotioato. Além disso, observaram que além de seqüência-dependente, a inibição do crescimento do parasito poderia ser também dependente da dose de ON (RAPAPORT *et al.*, 1992; BARKER *et al.*, 1996).

Na mesma linha, RAMASAMY e colaboradores (1996) observaram a inibição do crescimento de *P. falciparum* de modo inespecífico, através da comparação de uma seqüência de ON senso a outra antisense, em concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ .

---

---

Devido aos resultados conflitantes quanto à especificidade de ação de ON fosforotioatos sobre a atividade antimalárica, relatada pelos autores mencionados, KANAGARATNAM e colaboradores (1998) investigaram comparativamente o efeito de diversas seqüências de ON senso e antisense sobre a inibição do crescimento de *P. falciparum*. Os autores utilizaram como alvo uma proteína de superfície do merozoíto, presente somente em determinado período do ciclo celular do parasito, o que identificaram como uma vantagem em relação à enzima DHFR-TS, até então estudada. A redução da invasão das células vermelhas pelo merozoíto mostrou-se dose-dependente, mas foi atribuída ao caráter polianiônico dos ON, uma vez que os resultados foram equivalentes para ambas às seqüências senso e antisense. O mecanismo da ação envolveria a interferência do caráter polianiônico dos ON na ligação dos merozoítos aos receptores localizados nas células vermelhas do sangue, inibindo uma nova invasão da célula pelo *P. falciparum*. Ainda, os autores consideram que as hemácias não podem internalizar ON por endocitose, e assim, a entrada dos mesmos deveria ocorrer provavelmente por ductos das células infectadas pelo plasmódio, permitindo o acesso dos ON à membrana do parasito.

Em 1999, WANIDWORANUN e colaboradores avaliaram *in vitro* a possibilidade de ação de ON fosforotioatos antisense, comparados a seqüências senso e controle, sobre o RNA mensageiro da enzima aldolase de *P. falciparum*. Este alvo foi escolhido porque na fase sangüínea da doença existe uma grande produção anaeróbica de energia pelo parasito e as enzimas glicolíticas estão cerca de 11 a 18 vezes mais expressadas, sendo o consumo de glicose pelas hemácias infectadas quase 100 vezes superior ao das hemácias não infectadas. Além disso, sabe-se que a aldolase do parasito é diferente de todas as isozimas da aldolase humana. Os autores observaram uma inibição inespecífica dos ON senso e dos ON de seqüências obtidas ao acaso (embaralhadas), enquanto seqüências antisense apresentaram uma inibição específica nas concentrações compreendidas entre 3 a 33 nM. Uma redução significativa na parasitemia (em cerca de 50%) foi observada para os ON antisense na concentração de 11 nM. Este efeito de redução da parasitemia foi confirmado pela redução nos níveis da aldolase, através da verificação da redução dos níveis de ATP produzidos pelo parasito e pela técnica de *Northern Blot*.

---

---

Mais recentemente, foram testadas várias seqüências de ON fosforotioatos direcionadas a diferentes regiões do gene da enzima topoisomerase II do *P. falciparum* resistente à cloroquina e pirimetamina. Concentrações de 0,01 a 0,50  $\mu\text{M}$  de seqüências senso e antisenso foram comparadas, permitindo aos autores concluir que a inibição do crescimento do parasito se mostrava seqüência e dose-específica, durante os estágios de maturação do parasito. O maior efeito foi detectado após 36 horas de incubação com os ON. Os autores também testaram concentrações maiores de ácidos nucléicos e observaram um efeito inespecífico, independente da seqüência dos ON, sobre o desenvolvimento do parasito. Os resultados de inibição do crescimento do *P. falciparum* encontrados estão entre cerca de 30 a 47% para seqüências antisenso nas concentrações de 0,5  $\mu\text{M}$  e de até cerca de 60 a 65% para maiores concentrações testadas, independente da seqüência (NOONPAKDEE *et al.*, 2003).

Esses resultados promissores conduziram FÖGER e colaboradores (2006) a associar esses ON a nanopartículas revestidas com quitosana, um polímero catiônico. A inibição do crescimento do parasito observada mostrou-se superior, compreendida entre 74 e 87%, para seqüências antisenso, dependendo do tipo de formulação. As nanopartículas também apresentaram efetiva proteção dos ON contra a degradação por nucleases. Os resultados deste estudo demonstraram um aumento da especificidade do efeito antisenso observado para os ON associado às nanoestruturas, em relação aos ON em solução aquosa. Os autores relacionaram esse efeito à liberação sustentada dos ON a partir das nanopartículas. Outros autores também já haviam sugerido a associação dos ácidos nucléicos a carreadores, visando reduzir também seu efeito inespecífico ou aptamérico (COUVREUR e MALVY, 2000; LAMBERT *et al.*, 2001; TOUB *et al.*, 2006).

### **3.3 Nanoemulsões catiônicas**

Na última década, pesquisas têm sido amplamente desenvolvidas para a utilização de sistemas coloidais no direcionamento e liberação controlada de fármacos (CONSTANTINIDES *et al.*, 2008; DATE e NAGARSENKER, 2008). Diversos nanossistemas já demonstraram eficácia na otimização de vacinas e

---

---

quimioterápicos destinados ao controle da malária, como lipossomas, nanopartículas e nanoemulsões (DIERLING e CUI, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2007).

Formulações parenterais do tipo nanoemulsões O/A têm merecido considerável atenção por parte dos pesquisadores por já serem amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica na nutrição parenteral (FLOYD, 1999). As nanoemulsões de uso parenteral têm sido estudadas como sistemas de liberação de fármacos, incluindo os altamente lipofílicos, para redução de irritação, dor ou toxicidade durante administração por via endovenosa, direcionamento ao alvo de ação, estabilização e prevenção de fenômenos de interação com os equipamentos de infusão (KLANG e BENITA, 1998; CONSTANTINIDES *et al.*, 2008). Após administração parenteral, este tipo de formulação é rapidamente capturada pelo sistema retículo endotelial (SER), em órgãos como o fígado e baço, o que é uma vantagem para direcionamento de fármacos para estes locais (KLANG *et al.*, 1998).

Paralelamente à modificação química, a associação de ácidos nucleicos a carreadores coloidais catiônicos tem sido proposta para contornar as limitações do seu uso. Uma vasta literatura descreve a associação de ON a carreadores de natureza lipídica e/ou polimérica como lipossomas (SENIOR *et al.*, 1991; LAPPALAINEN *et al.*, 1994; ZELPHATI e SZOKA, 1996; KANAGARATNAM *et al.*, 1998; MÖNKKÖNEN e URTTI, 1998; JURKIEWICZ *et al.*, 2003) ou nanopartículas (LAMBERT *et al.*, 2001; FÖGER *et al.*, 2006; KABANOV, 2006; TOUB *et al.*, 2006; MEDINA *et al.*, 2007). O uso de lipídeos catiônicos na composição de vetores não virais de natureza polimérica e/ou lipídica na forma de agregados supramoleculares, nanopartículas e lipossomas tem se mostrado uma estratégia útil e segura para a transferência intracelular dos ácidos nucleicos (FATTAL *et al.*, 1998, 2001; LAMBERT *et al.*, 2001; JURKIEWICZ *et al.*, 2003).

O mecanismo de associação deste tipo de sistema, contendo lipídeos e/ou polímeros carregados positivamente e ON carregados negativamente, parece ocorrer através da formação de um complexo eletrostático em meio aquoso (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; TRIMAILLE *et al.*, 2001). O efeito da associação (adsorção e/ou encapsulamento) dos ácidos nucleicos com o sistema coloidal carregado positivamente tem se mostrado benéfico tanto em termos de transferência intracelular de ON ou DNA (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*), como na redução da cinética

---



---

de degradação dos ácidos nucléicos veiculados (ZELPHATI e SZOKA, 1996; BROWN *et al.*, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2001). A formação do par iônico compromete os grupamentos fosfato dos ON, limitando a atividade das nucleases e reduzindo assim a cinética de degradação dos ON (LAPPALAINEN *et al.*, 1994). Além disso, o sistema pode assegurar uma liberação intracelular dos ON devido a seu efeito sobre membranas, encontrando-se os ácidos nucléicos principalmente no núcleo, enquanto os lipídeos catiônicos permanecem na região citoplasmática e perinuclear (ZELPHATI e SZOKA, 1996).

A associação de ON por forças eletrostáticas também parece tornar improvável a hibridização de ON com proteínas do meio biológico de forma inespecífica, visto que sua conformação é alterada para interagir eletrostaticamente com o sistema catiônico (LAMBERT *et al.*, 2001). Assim, o efeito aptamérico inespecífico do ON antisense deve ser reduzido ou inexistente, evitando-se efeitos secundários à administração da terapia.

Neste contexto, nanoemulsões catiônicas O/A como veículos para formação de complexos com polinucleotídeos têm sido propostas e amplamente estudadas (TEIXEIRA *et al.*, 2001a, 2003; TRIMAILLE *et al.*, 2003; FRAGA, 2007; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). Estudos que avaliam a integridade dos ON após liberação do complexo nanoemulsão catiônica-ON mostram existência do par iônico que os protege contra a ação das nucleases (TEIXEIRA *et al.*, 2001b). Para estes sistemas, interações hidrofóbicas, juntamente com as eletrostáticas, parecem ter um papel importante na associação de ON (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; TRIMAILLE *et al.*, 2001). Também há relatos indicando que o complexo formado entre nanoemulsões e ácidos nucléicos apresenta estabilidade adequada em fluídos biológicos, diferentemente de complexos formados com estruturas do tipo lipossomas (YI *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2003). E ainda, a atividade de transfecção *in vitro* e *in vivo*, em alguns casos, mostrou-se superior aos lipossomas catiônicos (CHOI *et al.*, 2004; MIN *et al.*, 2005).

---

---

### **3.3.1 Composição das nanoemulsões**

A influência de diferentes parâmetros como a composição quali e quantitativa das nanoemulsões (núcleo oleoso, lipídeos catiônicos e co-tensoativos) no perfil de associação e/ou liberação dos ON a partir de nanoemulsões catiônicas, bem como em suas propriedades físico-químicas, têm sido investigada por diversos autores (TEIXEIRA *et al.*, 2001b; TRIMAILLE *et al.*, 2003; MARTINI, 2005; FRAGA, 2007; HAGIGIT *et al.*, 2008). Dessa forma, é de extrema importância a seleção cuidadosa dos excipientes (KLANG e BENITA, 1998; DATE e NAGARSENKER, 2008).

#### **3.3.1.1 Fase oleosa**

O núcleo oleoso das nanoemulsões utilizadas para a preparação de sistemas para a administração de ácidos nucleicos é constituído por triglicerídeos de cadeia longa (TCL), derivados dos óleos de soja, rícino ou açafrão, ou ainda, de triglicerídeos de cadeia média (TCM), obtidos da reesterificação de ácidos graxos fracionados de óleo de coco com glicerina (FLOYD, 1999). Ambos possuem ampla aceitabilidade e são encontrados em uma diversidade de produtos parenterais, inclusive em combinação, como nas preparações lipídicas para nutrição parenteral (KLANG e BENITA, 1998; DRISCOLL, 2006; DATE e NAGARSENKER, 2008). A utilização de TCM na obtenção de sistemas de liberação de ON tem sido freqüentemente descrita na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2003; TRIMAILLE *et al.*, 2001), principalmente pelo fato dos TCM serem cerca de 100 vezes mais solúveis em água que os TCL (FLOYD, 1999).

No que se refere à composição quantitativa, o núcleo oleoso das nanoemulsões catiônicas em sistemas de liberação de ON representa 5 a 35% da composição final das formulações (MARTINI, 2005). Estudos relativos à comparação e seleção da fase oleosa têm sido realizados visando principalmente à otimização dos sistemas, geralmente com base em estudos de eficiência de transferência gênica (CHUNG *et al.*, 2001; FRAGA, 2007). No caso específico de ON, TEIXEIRA e colaboradores (2001b) demonstraram, através de estudos de partição óleo/água, que apenas óleos de elevados valores de equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL) seriam

---

---

capazes de solubilizar os complexos formados entre ON e lipídeos catiônicos utilizados na preparação das nanoemulsões.

A adição de antioxidantes em nanoemulsões lipídicas tem sido descrita, para prevenir a peroxidação dos ácidos graxos insaturados (TEIXEIRA *et al.*, 1999). A ação do oxigênio durante o processamento e armazenamento pode influenciar de maneira decisiva a estabilidade do sistema (BENITA e LEVY, 1993). Nanoemulsões comerciais contêm  $\alpha$ -tocoferol, um antioxidante comumente utilizado (BENITA e LEVY, 1993; FLOYD, 1999). Para evitar a oxidação, outros procedimentos como evitar armazenamento em recipientes plásticos permeáveis ao oxigênio e manter a temperatura de armazenamento controlada devem ser considerados (FLOYD, 1999).

### 3.3.1.2 Interface

Em relação à interface, nanoemulsões são geralmente estabilizadas por misturas de tensoativos catiônicos, anfotéricos e/ou não iônicos. Os emulsificantes são utilizados para formação do filme interfacial e reduzir a tensão superficial, impedindo a floculação e coalescência da fase dispersa. Os emulsificantes mais utilizados em emulsões parenterais são os fosfolipídeos (fosfatídeos naturais derivados de óleo de soja ou da gema do ovo) e poloxâmeros, sendo que os ésteres de sorbitano (Tween) e os polioxietilenos derivados do óleo de rícino (Cremophor) também são aprovados para este fim (KLANG e BENITA, 1998; JUMAA e MULLER, 1999; KIM *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2004; MIN *et al.*, 2005; DATE e NAGASENKER, 2008; HAGIGIT *et al.*, 2008). O uso dos fosfolipídeos ou lecitinas predomina, apesar destes compostos serem passíveis de hidrólise e gerarem compostos hemolíticos em condições inadequadas, sendo necessário um rigoroso controle do processo de produção (FLOYD, 1999). Os fosfolipídeos mais freqüentemente descritos são os de gema de ovo, compostos principalmente por fosfolipídeos neutros (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e negativamente carregados em pH fisiológico (fosfatidilserina e fosfatidilglicerol). Para a associação de ácidos nucleicos (igualmente dispendo de cargas negativas) às nanoemulsões, a carga negativa dos fosfolipídeos é inadequada, sendo necessária a adição de um lipídeo catiônico à formulação (KLANG e BENITA, 1998; ROLAND *et al.*, 2003).

---

Os lipídeos catiônicos são formados por uma âncora hidrofóbica, uma cabeça polar e um *linker*, que corresponde à ligação entre a cabeça polar e a cauda apolar. A âncora hidrofóbica pode ser uma cadeia carbonada apolar simples, como no caso dos tensoativos, ou dupla. A cabeça polar pode ser mono- ou multivalente, sendo que a monovalente pode ser constituída por grupamentos amina terciários ou quaternários (CHESNOY e HUANG, 2000). Dentre os lipídeos catiônicos mais utilizados, estão a estearilamina, oleilamina (OA) e 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP) (KLANG e BENITA, 1998; MARTINI *et al.*, 2008). Apesar de relatos de formulações catiônicas contendo apenas o lipídeo catiônico como emulsificante (KIM *et al.*, 2003), eles geralmente são utilizados em combinação com os fosfolipídeos (MARTINI, 2005). Alguns exemplos das estruturas destes lipídeos podem ser visualizadas na figura 4.

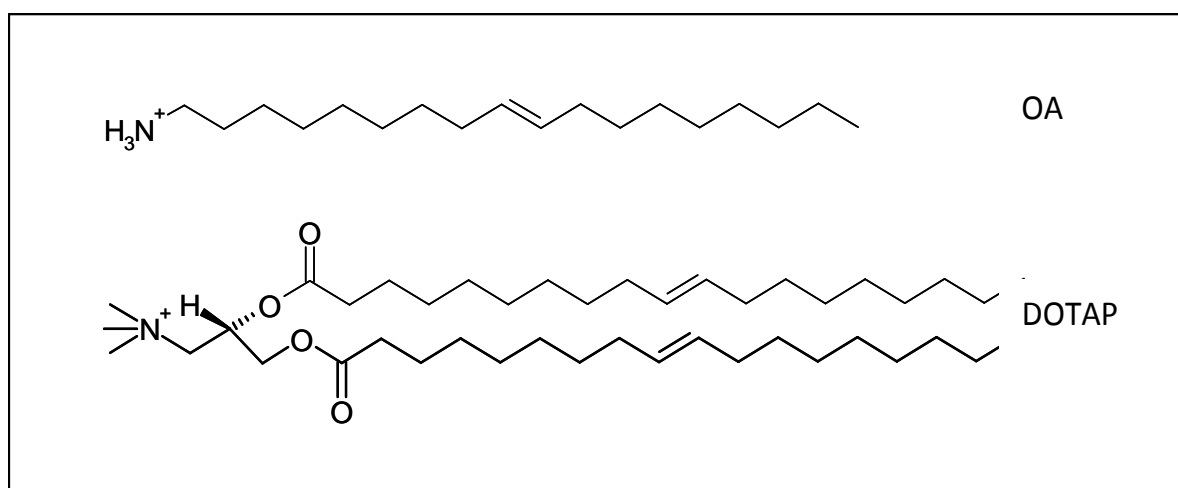


Figura 4. Estrutura química dos lipídeos catiônicos OA e DOTAP.

O uso do lipídeo catiônico que apresenta duas cadeias hidrofóbicas (DOTAP) parece ser a estratégia mais eficaz na associação e controle da liberação dos ON a partir das nanoemulsões catiônicas (KIM *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001b, 2003; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). Para lipídeos como o DOTAP, além das interações de natureza eletrostática, interações hidrofóbicas com os ON foram identificadas, devido à presença de dupla cadeia carbônica hidrofóbica, o que não ocorre com moléculas de estearilamina, por exemplo, compostas por apenas uma cadeia carbonada saturada (TEIXEIRA *et al.*, 2001b; HAGIGIT *et al.*, 2008).

Outra abordagem para gerar carga positiva foi descrita por TRIMAILLE e colaboradores (2001) através da funcionalização da interface das nanoemulsões através do uso de polímeros de diferentes domínios hidrofóbicos e de grupamentos produtores de cargas catiônicas. A funcionalização das emulsões com tais polímeros fornece uma maneira conveniente de modificar a interface das gotículas e possibilita a adsorção dos ON sobre a mesma (TRIMAILLE *et al.*, 2003).

Ainda em relação à modificação da interface, TEIXEIRA e colaboradores (2001a) avaliaram a influência da adição de lipídeo contendo cadeias polietilenoglicol (PEG) sobre as propriedades físico-químicas de nanoemulsões carreadoras de ON. Os resultados de transferência de energia de fluorescência demonstraram a possível interação dos ON com as cadeias de PEG, conduzindo a um afastamento dos ON da interface O/A e uma liberação mais rápida dos mesmos.

### 3.3.1.3 Fase aquosa

Em relação à fase aquosa da emulsão, são incorporados os agentes de tonicidade, antioxidantes, tampões, ou ainda, agentes conservantes. Para ajuste de tonicidade os fabricantes de emulsões parenterais têm preferido o glicerol, apesar da sua atividade hemolítica *in vitro* ser superior a de outros agentes isotonzantes, como o sorbitol e xilitol, que também são freqüentemente utilizados (FLOYD, 1999; JUMAA e MÜLLER, 1999). As substâncias ácido p-hidroxibenzóico e compostos de amônio quaternário estão entre os conservantes mais empregados, principalmente devido à alta solubilidade em água e baixa tendência a particionar para a fase oleosa (FLOYD, 1999). Os conservantes, assim como diversos outros componentes, podem alterar o pH das formulações (HAN e WASHINGTON, 2005). Nanoemulsões para uso parenteral devem ter seu pH normalmente ajustado para valores próximos de 7,4, com auxílio de NaOH ou HCl, a fim de manter a compatibilidade fisiológica e reduzir a formação de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise dos componentes do núcleo oleoso (KLANG e BENITA, 1998).

### **3.3.2 Métodos de preparo**

Diversos métodos têm sido empregados na obtenção de nanoemulsões como sistemas de liberação de ácidos nucleicos, incluindo a homogeneização à alta pressão (BIVAS-BENITA *et al.*, 2004), a microfluidização (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2001a, 2001b, 2003) e a ultrassonicação (KIM *et al.*, 2001; 2003).

Mais recentemente, o procedimento de preparação de nanoemulsões por emulsificação espontânea tem sido utilizado para a obtenção de nanoemulsões (SILVA *et al.*, 2006; TRIMAILLE *et al.*, 2003; MARTINI *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2008). Esse procedimento baseia-se na emulsificação espontânea dos constituintes da fase interna (previamente solubilizados em um solvente orgânico) em água, seguido da retirada do solvente geralmente por destilação sob pressão reduzida. A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente orgânico na água, observando-se rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; KELMANN *et al.*, 2007; MARTINI *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2008). Diversos parâmetros podem influenciar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas, entre eles, as condições de emulsificação empregadas e a composição quali e quantitativa das formulações. Como um exemplo recente, FRAGA e colaboradores (2008) demonstraram a redução progressiva do diâmetro de gotícula de nanoemulsões lipídicas com o aumento crescente da quantidade de solventes (etanol/água), até uma determinada proporção (1:2), a partir da qual o diâmetro permanece inalterado.

### **3.3.3 Propriedades das nanoemulsões**

A caracterização das propriedades físico-químicas de nanoemulsões é de extrema importância, visto que estas podem influenciar desde a estabilidade dos sistemas até diversos aspectos biofarmacêuticos (RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004; DRISCOLL, 2006). Para uso parenteral, estas formas farmacêuticas devem apresentar algumas propriedades físico-químicas definidas, como reduzido diâmetro

---

---

de gotícula, isotonia, pH próximo ao fisiológico, baixa viscosidade, esterilidade e apirogenicidade (WASHINGTON, 1996; ROLAND *et al.*, 2003; DRISCOLL, 2006).

### 3.3.3.1 Diâmetro e morfologia de gotícula

A avaliação do diâmetro e a distribuição de gotículas da fase interna são de grande importância no desenvolvimento de nanoemulsões de uso parenteral (DRISCOLL, 2006). Esses sistemas apresentam normalmente uma distribuição unimodal e diâmetro médio inferior a 500 nm (HASKELL, 1998; DRISCOLL, 2006). Entretanto, estes parâmetros podem ser influenciados por diversos fatores, principalmente pela composição quali e quantitativa das formulações (JUMAA e MÜLLER, 1998; MARTINI *et al.*, 2008) e a metodologia de preparo (ROLAND *et al.*, 2003; MARTINI *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2008).

A concentração e as propriedades físico-químicas do núcleo oleoso, como a viscosidade e a tensão superficial também podem influenciar o diâmetro médio das nanoestruturas, dependendo do método de preparação. Óleos de maior tensão interfacial ou de menor viscosidade, por exemplo, conduzem à obtenção de formulações de menores diâmetros de gotícula (JUMAA e MÜLLER, 1998; CHUNG *et al.*, 2001).

Ainda, constituintes da interface, como tensoativos não iônicos e lipídeos catiônicos, também têm demonstrado influenciar no diâmetro de gotícula das formulações (KIM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; MARTINI *et al.*, 2008). A adição de quantidades crescentes de lipídeos catiônicos OA e DOTAP conduziu a uma redução no diâmetro de gotícula de nanoemulsões catiônicas, sendo que o menor tamanho observado foi para lipídeos catiônicos na concentração de 2 mM (MARTINI *et al.*, 2008). Concentrações crescentes de lipídeo estearilamina e a presença de um tensoativo não iônico, Poloxâmero 188, também reduziram o diâmetro médio das gotículas das formulações (SILVA *et al.*, 2006). Outros autores não verificaram alterações significativas com adição de maiores concentrações de estearilamina (FRAGA *et al.*, 2008) ou de um lipídeo contendo dois grupamentos amina catiônicos (HAGIGIT *et al.*, 2008).

---

---

Além da espectroscopia de correlação de fótons, também denominada de espalhamento de luz dinâmico, técnicas microscópicas têm sido empregadas para a avaliação do diâmetro de gotícula de nanoemulsões, como transmissão, varredura e criofratura (BENITA e LEVY, 1993; HASKELL, 1998; TIAN e LI, 1998). O uso da microscopia visa verificar, além do diâmetro de gotícula, a morfologia das mesmas. Estas normalmente apresentam-se esféricas com bordas definidas, após o uso de reagentes de contraste negativo, como o acetato de uranila (MARTINI, 2005). Além destas estruturas ditas clássicas, a microscopia eletrônica de transmissão permite a visualização da coexistência de organizações em multicamada, estruturas em forma de bolsa de mão, ou ainda, do tipo cromatina (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; KIM *et al.*, 2003). A agregação das gotículas de nanoemulsões induzida pela adsorção de ácidos nucléicos também pode ser observada microscopicamente como no caso de formulações contendo lipídeos policatiônicos (TEIXEIRA *et al.*, 2001a).

### 3.3.3.2 Potencial zeta

A determinação do potencial zeta é geralmente realizada através de técnicas eletroforéticas específicas. Este parâmetro é um fator crítico na caracterização de nanoemulsões, uma vez que reflete a composição da interface do sistema, em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga, localizadas na interface. Além disso, é importante para a avaliação da estabilidade físico-química das emulsões. Se o potencial for relativamente elevado em módulo (maior de 25 mV) as forças repulsivas do sistema superam as forças de London que atraem as gotículas entre si, caracterizando um sistema defloculado (KLANG e BENITA, 1998; ROLAND *et al.*, 2003).

Conforme mencionado anteriormente, as lecitinas são misturas heterogêneas de fosfolipídeos neutros e negativamente carregados em pH fisiológico. Com essa carga global negativa, conduzem a valores de potencial zeta de -40 a -50 mV em sistemas coloidais compostos por elas (BENITA e LEVY, 1993). Este potencial contribui para a repulsão entre as gotículas e conseqüente estabilidade do sistema (ROLAND *et al.*, 2003). Com a adição de lipídeos catiônicos na formulação, visando à associação de ácidos nucléicos, origina-se uma interface carregada positivamente

---



( $\zeta=30-55$  mV) (TEIXEIRA *et al.*, 1999). Esta carga será dependente da concentração e do grau de ionização dos grupamentos de carga positiva dos lipídeos catiônicos.

Diversos estudos avaliam a influência do tipo e da concentração dos lipídeos catiônicos sobre o potencial zeta de nanoemulsões (KIM *et al.*, 2003; RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). A adição de quantidades crescentes de lipídeos catiônicos conduz a um aumento progressivo do potencial zeta até uma determinada concentração, a partir da qual a carga de superfície permanece inalterada, sendo esta relacionada com a saturação da interface (KIM *et al.*, 2003; FRAGA *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). No caso específico de lipídeos catiônicos contendo grupamentos amina primária, RABINOVICH-GUILATT e colaboradores (2004) descreveram fenômenos similares de manutenção de potencial zeta constante, entretanto, neste caso, sendo associado à redução da ionização dos lipídeos devido ao elevado pH da interface.

Alguns autores também têm avaliado o potencial zeta em função da concentração de ácido nucléico utilizado (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; MIN *et al.*, 2005; MARTINI *et al.*, 2007; 2008; HAGIGIT *et al.*, 2008). A associação de ON ou DNA pode conduzir a formação de agregados e desestabilização do sistema. Para evitar este fenômeno, utiliza-se normalmente uma relação de cargas [+/-] positiva, ou seja, um excesso de carga positiva (aportada pelos lipídeos catiônicos) em relação ao número de grupamentos fosfato dos ácidos nucléicos (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; KIM *et al.*, 2002; MARTINI *et al.*, 2007). Ou então, pode-se utilizar relação [+/-] negativa, desde que se situe após a zona de potencial zeta nulo (zona de agregação das gotículas da fase interna), de forma que a estabilidade das nanoemulsões seria assegurada pela repulsão eletrostática dos ácidos nucléicos adsorvidos na interface O/A (TRIMAILLE *et al.*, 2003).

### 3.3.3.3 pH

Nanoemulsões de uso parenteral devem apresentar um pH na faixa da neutralidade, próximo ao pH fisiológico de 7,4 (DRISCOLL, 2006). O controle do pH também tem importância na estabilidade destes sistemas, pois o pH inicial de uma emulsão tende a diminuir progressivamente com o tempo. Este fenômeno ocorre

---

---

devido à hidrólise dos triglicerídeos e fosfolipídeos do núcleo oleoso, que liberam ácidos graxos livres, os quais reduzem o pH das formulações (KLANG e BENITA, 1998).

A adição de lipídeos catiônicos às formulações pode conduzir a valores de pH alcalinos, em virtude da presença de grupamentos amina primárias, como no caso da estearilamina e OA (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2001a, 2001b). O ajuste do pH de nanoemulsões catiônicas com ácidos diluídos tem sido descrito principalmente para formulações contendo estes lipídeos (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2001a, 2003; RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004; MARTINI *et al.*, 2008), visando obter em teoria, uma interface completamente ionizada para a adsorção dos ácidos nucléicos (RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004).

#### 3.3.3.4 Viscosidade

A avaliação das propriedades reológicas de nanoemulsões de uso parenteral é de grande importância, uma vez que formulações demasiadamente viscosas podem representar uma limitação no momento da administração intravenosa (JUMAA e MÜLLER, 1998). Estas formulações apresentam um comportamento reológico do tipo newtoniano, sendo que a viscosidade é principalmente influenciada pela concentração de óleo da fase interna e pelo diâmetro de gotícula (JUMAA e MÜLLER, 1998; ROLAND *et al.*, 2003; SILVANDER *et al.*, 2003). Um menor diâmetro pode conduzir a uma maior superfície específica, o que resultaria em um aumento das interações interparticulares e, conseqüentemente, uma maior viscosidade (ISHII *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2006). Contudo, MARTINI (2005) e FRAGA (2007) não detectaram modificações expressivas na viscosidade com a variação do diâmetro de gotícula de cerca de 200 a 350 nm.

Entretanto, os mesmos autores relatam uma tendência significativa ( $p < 0,05$ ) ao aumento da viscosidade até cerca de 2,0 cP para elevadas concentrações dos lipídeos catiônicos OA e estearilamina (20 mM). Outros autores também têm relacionado um aumento na viscosidade de sistemas submicrométricos lipídicos com a presença de elevadas concentrações de tensoativos nas formulações (ISHII *et al.*, 1990; JUMAA e MULLER, 1998). Concentrações crescentes de estearilamina, ou a

---

---

presença de poloxâmero 188 disperso na fase aquosa externa das nanoemulsões, podem influenciar as propriedades reológicas destes sistemas através de um aumento na viscosidade (SILVA *et al.*, 2006).

A viscosidade de nanoemulsões, assim como os parâmetros mencionados anteriormente, também fornece dados sobre a estabilidade dos sistemas. A máxima viscosidade encontrada por SILVANDER e colaboradores (2003) para emulsões de uso parenteral, coincidiu com regiões de potencial zeta muito baixo (em módulo), o que indica uma relação com o processo de instabilidade do sistema (floculação).

### **3.3.4 Estudos de adsorção**

Diversos métodos têm sido empregados na avaliação da associação dos ácidos nucléicos com nanoemulsões catiônicas. Alguns deles baseiam-se na determinação qualitativa e/ou semiquantitativa da associação, através das modificações das propriedades físico-químicas das nanoemulsões ou dos ensaios de retardamento em gel de eletroforese (KIM *et al.*, 2002; BARUT *et al.*, 2005; FRAGA, 2007; HAGIGIT *et al.*, 2008). Em relação à técnica de retardamento em gel de eletroforese, a avaliação da associação do ácido nucléico com as nanoemulsões ocorre quando não se detecta banda característica de migração de ácido nucléico livre no gel (KIM *et al.*, 2002; HAGIGIT *et al.*, 2008).

Os métodos baseados na avaliação quantitativa são muitas vezes de determinação indireta da associação, através da diferença entre a quantidade de ácido nucléico adicionada às nanoemulsões e a quantidade determinada na fase aquosa externa da nanoestrutura (não associada). A centrifugação em altas velocidades permite a separação das fases oleosas e aquosas, para posterior determinação dos ácidos nucléicos livres na fase aquosa (OTT *et al.*, 2002). Já a técnica de ultrafiltração/centrifugação, amplamente utilizada, envolve a separação de uma pequena porção da fase aquosa externa, de forma a não interferir com o equilíbrio do sistema (TEIXEIRA *et al.*, 1999; TRIMAILLE *et al.*, 2003; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008; OEHLKE *et al.*, 2008).

---

Diversos estudos têm determinado a capacidade de associação de ácidos nucleicos a nanoemulsões catiônicas. TEIXEIRA e colaboradores (1999) avaliaram a taxa de associação de uma série de ON politimidilatos contendo de 16 até 50 nucleotídeos com nanoemulsões adicionadas do lipídeo catiônico estearilamina. Uma eficiência de associação de cerca de 100% foi obtida para ON contendo 16 nucleotídeos, enquanto fragmentos maiores mostraram uma redução progressiva da taxa de associação, até um mínimo de 50% para o ON contendo 50 nucleotídeos.

Recentemente, outros autores avaliaram a influência de diferentes lipídeos catiônicos sobre a capacidade de associação de fragmentos de ácidos nucleicos (MARTINI, 2005; SILVA *et al.*, 2006; FRAGA, 2007; HAGIGIT *et al.*, 2008). De acordo com SILVA e colaboradores (2006), formulações contendo estearilamina mostraram eficácia de associação superior (90%) em relação a formulações contendo apenas lecitina, evidenciando o efeito do lipídeo catiônico na formulação. HAGIGIT e colaboradores (2008) compararam formulações para uso oftálmico contendo ON de 17 bases complexados a nanoemulsões contendo três diferentes lipídeos catiônicos: OA, DOTAP e um lipídeo catiônico sintético contendo dois grupamentos amina. A taxa de complexação foi elevada para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de ON, chegando a valores de 96% para DOTAP. Essa formulação mostrou-se fisicamente mais estável e apresentou a maior capacidade de retenção dos ON em estudo de liberação *in vitro*.

Ainda comparando diferentes lipídeos catiônicos, MARTINI e colaboradores (2008) prepararam diversas nanoemulsões contendo OA e DOTAP para associação de um ON modelo ( $\text{pdT}_{16}$ ). Independente do lipídeo utilizado, os autores demonstraram um perfil de adsorção caracterizado por duas etapas distintas: um aumento progressivo da quantidade de ON associado até um máximo característico para cada lipídeo catiônico (até cerca de 70 mg/g para DOTAP e 40 mg/g para OA), seguido de uma etapa na qual a adição suplementar de ON não altera a quantidade adsorvida, provavelmente relacionado com a saturação dos sítios de interação dos lipídeos catiônicos.

No estudo de FRAGA e colaboradores (2008), a complexação de ON e de DNA a nanoemulsões catiônicas contendo estearilamina também foi elevada (95%) em relação a formulações contendo apenas lecitina. Esta elevada taxa de

---

associação obtida nos estudos mencionados (FRAGA *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008) foi atribuída ao excesso de moléculas de lipídeos catiônicos presente na interface das gotículas, disponível para interagir com o DNA. De maneira geral, essas interações eletrostáticas governam as interações entre os ON e os lipídeos catiônicos, sendo a relação de cargas o principal fator que influencia a taxa de associação com as nanoemulsões (TEIXEIRA *et al.*, 2001a, 2001b).

#### 3.3.4.1 Modelos de adsorção em interface

Estudos do mecanismo de adsorção de moléculas são de extrema importância no desenvolvimento de formulações. Um processo de adsorção favorável de uma determinada molécula, provavelmente será relacionado a um processo de eluição ou liberação desfavorável (PERRY e CHILTON, 1986). O fenômeno de adsorção pode ser classificado em físico ou químico. Quando o adsorvato se liga a superfície apenas por forças de van der Waals, com baixos calores de adsorção, de forma não-específica e reversível, denomina-se adsorção física. A adsorção química é específica e irreversível, geralmente envolvendo a formação de uma única camada sobre o adsorvente (SINKO, 2006). Algumas vezes, uma etapa preliminar de adsorção física precede a adsorção química (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002).

As isotermas de adsorção se caracterizam por uma relação entre a quantidade adsorvida e a concentração do adsorvato, a uma temperatura constante (PERRY e CHILTON, 1986). Sua representação gráfica tem sido utilizada em alguns trabalhos para demonstrar a adsorção de moléculas de ácidos nucleicos sobre a interface de nanoemulsões (TRIMAILLE *et al.*, 2003; MARTINI *et al.*, 2007; 2008).

Existem vários modelos de adsorção baseados em diversas equações destinadas a estimar o adsorvato presente, a uma dada temperatura. Um dos modelos teóricos mais simples é o de Langmuir, que é utilizado para representar sistemas com adsorção em monocamadas homogêneas, assumindo que todos os sítios de adsorção são equivalentes, finitos, bem definidos e localizados, sendo que cada sítio pode acomodar somente uma entidade adsorvida. Além disso, assume que o processo ocorre com interações laterais desprezíveis entre as moléculas do

---

adsorvato (PERRY e CHILTON, 1986; NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002; PINO, 2005; GUO e GEMEINHART, 2008).

Em outros casos o sistema pode ser descrito pela Isoterma de Freundlich, que é um dos modelos mais utilizados em adsorção não linear, pois além de aplicável a superfícies muito heterogêneas, pode ser considerado também para superfícies homogêneas (PINO, 2005; GUO e GEMEINHART, 2008). As isotermas de Freundlich correspondem a uma distribuição exponencial dos calores de adsorção, indicando uma adsorção em multicamada (PERRY e CHILTON, 1986). Este modelo, entretanto, falha quando a concentração de adsorvato é muito elevada (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002).

Os modelos de Langmuir e Freundlich são importantes na descrição da adsorção química, embora sejam igualmente importantes para a descrição da adsorção física, juntamente com outros modelos (BANSAL e GOYAL, 2005). Os modelos de Langmuir e Freundlich são os mais simples e mais utilizados para descrever sistemas de adsorção, apesar de terem sido inicialmente propostos para sistemas sólido-vapor. Eles descrevem isotermas do tipo I, favoráveis, representadas por curvaturas convexas para cima nos gráficos das isotermas de adsorção, conforme classificação de Brunauer e colaboradores. As curvas côncavas para cima (tipo III) são as ditas desfavoráveis ao processo de adsorção. As isotermas podem ainda possuir um ou mais pontos de inflexão em suas curvaturas (tipos II, IV ou V) (PERRY e CHILTON, 1986; SINKO, 2006).

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---





## **4.1 Materiais**

### **4.1.1 Ácido Nucléico**

- ON antisense de seqüência 5'ATG TAA TAT TCT TTT GAA CCA TAC GAT TCT 3' em séries fosfodiéster e fosforotioato (Invitrogen, Brasil).

### **4.1.2 Outras Matérias-Primas**

- 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano (DOTAP) (Sigma, EUA);
- Glicerol (Merck, Alemanha);
- Lecitina de gema de ovo (Lipoid AG, Alemanha);
- Oleilamina (>98% de aminas primárias) (Aldrich, EUA);
- Triglicerídeos de cadeia média (cáprico/caprílico) (Lipoid AG, Alemanha).

### **4.1.3 Aparelhos e Equipamentos**

- Agitador magnético TE-085 (Tecnal, Brasil);
  - Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Suíça);
  - Banho com sistema de refrigeração Frigomix<sup>®</sup> B equipado com aquecedor termostaticado Thermomix<sup>®</sup> BM (B. Braun Biotech International, Alemanha);
  - Bomba de vácuo VAC<sup>®</sup> V-500 (Büchi, Labortechnik AG, Alemanha);
  - Centrífuga refrigerada 5417R (Eppendorf, Alemanha);
  - Espectrofotômetro de varredura, dotado de sistema multicélulas Hewlett-Packard 8452A, com programa computacional para avaliação e gerenciamento de dados (*software* HP Chemstation);
-

- Evaporador rotatório B480 (Büchi Labortechnik AG, Suíça);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Japão);
- Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil);
- Viscosímetro capilar Durchlaufzeit 20-75s (Normschliff Glasgerate, Alemanha);
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK).

#### **4.1.4 Reagentes e Solventes**

- Acetato de uranila PA (Reagen, Brasil);
  - Ácido clorídrico PA (Nuclear, Brasil);
  - Água ultrapura, obtida de equipamento Milli-Q (Millipore, Billerica, USA);
  - Etanol PA (Quimex Ind. Químicas, Brasil);
  - Hidróxido de sódio PA (Merck, Alemanha).
-

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas através do procedimento de emulsificação espontânea, conforme previamente descrito na literatura (MARTINI *et al.*, 2008). O método consiste em solubilizar os constituintes da fase oleosa em solvente orgânico e os constituintes da fase aquosa em água. O solvente orgânico escolhido foi etanol, utilizado na proporção 15:30 (etanol:água, m/m), conforme previamente estudado por MARTINI (2005). A fase orgânica é então vertida na fase aquosa, com o auxílio de um funil específico e sob agitação moderada e constante, a temperatura ambiente. O solvente orgânico e uma porção da água presente são retirados por destilação sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, a temperatura inferior a 50° C, até volume final desejado.

Foram preparadas três formulações em triplicata em lotes de 10 mL com diferentes composições, conforme apresentado na tabela 2. A primeira delas (PC) isenta de lipídeo catiônico, contendo apenas lecitina de gema de ovo (Lipoid E-80<sup>®</sup>) como emulsionante, servindo como controle para as demais formulações. A segunda e a terceira continham os lipídeos catiônicos OA (PC/OA) e DOTAP (PC/DT) além da lecitina. A concentração final de cada lipídeo catiônico foi de 2 mM, correspondendo a 0,05 e 0,14% (m/m), respectivamente.

Tabela 2. Composição das nanoemulsões (% m/m) sem lipídeo catiônico (PC), com OA (PC/OA) e com DOTAP (PC/DT) em relação ao volume final obtido após evaporação dos solventes.

	PC	PC/OA	PC/DT
Lipoid E-80 <sup>®</sup>	2,00	2,00	2,00
Triglicerídeos de cadeia média	8,00	8,00	8,00
Oleilamina	-	0,05	-
DOTAP	-	-	0,14
Glicerol	2,25	2,25	2,25
Água q.s.p.	100,00	100,00	100,00

## **4.2.2 Caracterização das nanoemulsões**

As propriedades físico-químicas das nanoemulsões foram avaliadas imediatamente após o preparo e em função do tempo de armazenamento. As formulações foram armazenadas por 90 dias a 4° C, em frascos selados de vidro de boro silicato âmbar, do tipo I.

### *4.2.2.1 Determinação do pH*

A determinação do pH das nanoemulsões foi realizada sem diluição prévia das formulações, nos três diferentes lotes preparados. O potenciômetro utilizado foi previamente calibrado com pH 4 e 7 e os resultados foram expressos como média de 3 determinações. O pH inicial determinado, imediatamente após o preparo, foi ajustado para cerca de 7,4.

### *4.2.2.2 Determinação do diâmetro de gotícula*

As formulações foram caracterizadas em termos de diâmetro de gotícula e índice de polidispersidade, através do espalhamento de luz dinâmico, em equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. A técnica consiste na difusão de um raio monocromático através da dispersão coloidal observando-se o espalhamento de luz a 90°. Ela determina o diâmetro através do movimento Browniano das mesmas. As amostras foram previamente diluídas em água purificada e filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®). Os resultados foram expressos como média de três determinações de três lotes preparados.

### *4.2.2.3 Determinação do potencial zeta*

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas utilizando-se um equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. As amostras dos três diferentes lotes foram previamente diluídas em solução de NaCl 1 mM filtrada em membrana de 0,2 µm (Millipore®) e os resultados foram

---

---

expressos como média de três determinações. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55 mV (látex poliestireno carboxilato).

#### 4.2.2.4 Avaliação morfológica

Para avaliar a morfologia das gotículas de nanoemulsões, as diferentes formulações foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET), a 80 kV de voltagem e em aumento de 100.000 vezes. As amostras foram preparadas 24 horas antes da realização das análises e mantidas em dessecador. A técnica de preparo consistiu em prévia diluição das amostras em água, na proporção de 1:10 (nanoemulsão:água, v/v). Após diluição, as amostras foram depositadas em suportes metálicos de cobre com revestimento de carbono e Formvar (200 *mesh*) e submetidas a contraste negativo com uma solução aquosa de acetato de uranila a 2%.

#### 4.2.2.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade das nanoemulsões foi determinada através da técnica de viscosimetria capilar, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988), com auxílio de um viscosímetro de Ostwald. As análises foram realizadas a 20° C, determinando-se o tempo de escoamento de 5 mL de cada amostra através do capilar. A viscosidade relativa foi determinada através da equação 1 abaixo:

$$\eta = k \cdot t \cdot \rho \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

$\eta$  = viscosidade absoluta (cP);

$k$  = constante do viscosímetro (constante de Ostwald);

$\rho$  = densidade do fluido a temperatura de 20°C (g/mL);

$t$  = tempo de escoamento (s).

---

O valor da constante de Ostwald ( $k=0,0212$ ) foi determinado experimentalmente verificando-se o tempo de escoamento de um líquido padrão (água) e aplicando-se na fórmula acima o valor de sua viscosidade teórica a 20°C (1,0087 cP). A densidade de todas as amostras foi de 1 g/mL, experimentalmente determinada através do uso de picnômetro. Os resultados de viscosidade foram expressos como média de três determinações dos três lotes preparados.

#### **4.2.3 Determinação da densidade ótica (DO) dos ON**

Os ON sintéticos foram obtidos de Invitrogen (Brasil) na forma liofilizada. A quantidade real de ON adquirida foi calculada através da densidade ótica (DO), obtida por absorção em região do ultravioleta (UV), a 260 nm, conforme descrito pela empresa de produtos biofarmacêuticos Eurogentec (EUROGENTEC, 2008).

Primeiramente, os ON de série PO e PS adquiridos foram hidratados para uma concentração teórica de 200 nmol/mL, de acordo com dados teóricos fornecidos pela empresa fornecedora. Calculou-se então o número de unidades de DO através da equação 2, abaixo descrita.

$$OD_{260} = A_{260} \cdot FD \cdot V \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

$OD_{260}$  = unidades de DO;

$A_{260}$  = absorvância determinada a 260 nm;

$FD$  = fator de diluição;

$V$  = volume utilizado para hidratação do ON liofilizado (mL).

Em seguida, para o cálculo da quantidade real de ON em unidades molares e de massa, utilizou-se as equações 3 e 4, respectivamente:

---

$$Q_{nmol} = \frac{OD_{260} \cdot 10^6}{\mathcal{E}_{260}} \quad (\text{Equação 3})$$

$$Q_{\mu g} = PM \cdot Q_{nmol} \cdot 10^{-3} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde,

$Q_{nmol}$  = quantidade de ON (nmol);

$OD_{260}$  = unidades de DO;

$\mathcal{E}_{260}$  = coeficiente de extinção molar do ON (L/mol\*cm);

$Q_{\mu g}$  = quantidade de ON ( $\mu g$ );

$PM$  = peso molecular do ON (g/mol).

Finalmente, ajustaram-se as concentrações das soluções iniciais de PO e PS para 200 nmol/mL, a partir das quais foram retiradas diversas alíquotas para desenvolvimento de todo trabalho.

#### **4.2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento dos ON**

O método analítico para determinação dos ON de série PO e PS no ultrafiltrado, após procedimento de ultrafiltração/centrifugação em membranas Ultrafree® (Millipore®), foi validado com auxílio de espectrofotômetro de varredura com *software HP Chemstation* para avaliação e gerenciamento de dados. As análises foram realizadas na região do UV, na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 200 a 400 nm. Os parâmetros utilizados seguiram as normas de validação de procedimentos analíticos e de metodologias do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (ICH, 2005), as especificações da *The United States Pharmacopoeia (USP)* (USP, 2007) bem como do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contida na RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003a). Foram avaliados a linearidade, os limites de detecção e

---

quantificação, a precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária), a exatidão e a especificidade.

#### *4.2.4.1 Seleção do comprimento de onda*

A seleção do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção ( $\lambda_{\max}$ ) dos ON PO e PS foi realizada através da varredura de soluções aquosas contendo cada um dos ON na concentração de 0,7 nmol/mL, correspondendo a 6,4  $\mu\text{g/mL}$  de PO e 6,7  $\mu\text{g/mL}$  de PS. A partir destas soluções foi realizado um espectro de varredura de 200 a 400 nm.

#### *4.2.4.2 Avaliação da especificidade*

Para avaliar a especificidade do método analítico utilizado, foram comparados os espectros de absorção (200 a 400 nm) das soluções aquosas dos ON com soluções adicionadas de 2,25% de glicerol. As soluções continham PO ou PS na concentração de 0,7 nmol/mL (6,4  $\mu\text{g/mL}$  de PO e 6,7  $\mu\text{g/mL}$  de PS).

#### *4.2.4.3 Determinação da linearidade*

Para a determinação da faixa de linearidade a ser utilizada na quantificação de PO e PS, foram realizadas três curvas por cada dia de análise, por três dias consecutivos. Cada curva apresentava 7 pontos de concentrações: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 nmol/mL de ON em água, correspondendo aos pontos 3,7; 4,6; 5,5; 6,4; 7,3; 8,2 e 9,1  $\mu\text{g/mL}$  de PO e 3,8; 4,8; 5,8; 6,7; 7,7; 8,6 e 9,6  $\mu\text{g/mL}$  de PS. A absorvância foi determinada três vezes para cada amostra preparada, em comprimento de onda de 262 nm para ambos ON, selecionado conforme previamente descrito.

A linearidade do método foi avaliada através da análise de variância (ANOVA). A equação da reta e o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) para cada uma das séries de ON foram calculados através do método dos mínimos quadrados.

---



#### 4.2.4.4 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método analítico desenvolvido foram determinados matematicamente, baseados no desvio padrão dos interceptos e na média das inclinações das curvas de linearidade. As equações utilizadas estão descritas abaixo (equações 5 e 6), conforme preconizado pelo ICH (2005):

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{l} \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{l} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde,

$s$  = desvio padrão do intercepto das três curvas obtidas nos três diferentes dias do estudo de linearidade;

$l$  = inclinação média obtida nas três curvas obtidas nos três diferentes dias do estudo de linearidade.

#### 4.2.4.5 Avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária

A precisão do método de determinação de ON PO e PS foi acessada através da repetibilidade (precisão intradia) e da precisão intermediária (interdia) em dois diferentes solventes: em água purificada e em água glicerinada (2,25% glicerol). A precisão intradia foi avaliada considerando-se uma série de análises realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições. A precisão interdia foi avaliada considerando-se as análises de três dias consecutivos, realizadas por um mesmo executor, no mesmo equipamento e nas mesmas condições (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

---

### *Precisão em solução aquosa*

Inicialmente, para determinação da precisão do método, foram avaliados os dados da linearidade, que correspondiam a soluções aquosas de ON PO e PS em 7 diferentes concentrações, conforme previamente descrito.

A avaliação da repetibilidade foi obtida através do cálculo dos desvios padrões relativos (DPR) entre as medidas de absorvância obtidas para cada ponto da curva padrão, em relação às três amostras preparadas em um mesmo dia, possibilitando a determinação de uma faixa abrangendo estes três valores. O DPR calculado entre as medidas realizadas nos três dias diferentes, calculado para cada ponto da curva, foi utilizado na avaliação da precisão intermediária do método.

### *Em solução glicerinada*

Ainda para a determinação da precisão do método, foram avaliadas soluções a 0,7 nmol/mL de PO ou PS em solução aquosa adicionada de 2,25% de glicerol. A concentração testada corresponde ao ponto intermediário da curva padrão. Foram preparadas 6 amostras por dia, em três diferentes dias.

Para avaliação da repetibilidade do método, calcularam-se os DPR entre as seis amostras testadas em cada dia separadamente. Para determinação da precisão intermediária os DPR foram calculados considerando-se os três diferentes dias.

#### *4.2.4.6 Avaliação da exatidão*

A avaliação da exatidão foi realizada através da adição de uma solução de concentração conhecida de PO e PS, separadamente, em soluções glicerinadas, representativas dos ultrafiltrados das nanoemulsões. Foram adicionadas três concentrações diferentes de ON: baixa, média e alta (correspondendo respectivamente a 0,5; 0,7 e 0,9 nmol/mL), em triplicata. Para determinação da recuperação de PO e PS, foram então realizadas três leituras para cada solução de recuperação (SR). O modo de preparo destas SRs está descrito na tabela 3.

---

Tabela 3. Modo de preparo das amostras pra realização do teste de recuperação dos ON PO e PS por espectrofotometria de absorção no UV.

	Ultrafiltrado contendo ON 0,75 nmol/mL ( $\mu$ l)	Solução de ON 2,9 nmol/mL ( $\mu$ l)	Concentração final de ON (nmol/mL)*
SR1	200	105	0,50
SR2	200	175	0,70
SR3	200	245	0,90

\* Para um volume final de 900  $\mu$ l.

As percentagens de recuperação dos ON foram calculadas através da equação 7:

$$R = 100 \cdot \frac{C_{det}}{C_{ad}} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

$R$  = Porcentagem de recuperação dos ON (PO ou PS) (%);

$C_{det}$  = Concentração dos ON obtida através da absorvância determinada pelo método (nmol/mL ou  $\mu$ g/mL);

$C_{ad}$  = Concentração teórica de ON adicionada ao ultrafiltrado (solução glicerinada) (nmol/mL ou  $\mu$ g/mL).

#### 4.2.5 Associação dos ON às nanoemulsões

Para o estudo de associação dos ON às nanoemulsões, utilizou-se membranas de ultrafiltração constituídas de celulose regenerada de 30 kDa de *cut off* (Ultrafree®, Millipore®) submetidas a procedimento de centrifugação.

#### *4.2.5.1 Determinação da taxa de recuperação das membranas*

A fim de avaliar a taxa de recuperação dos ON através das membranas de ultrafiltração e verificar se as mesmas constituíam um fator limitante para a passagem de ON livres em solução, submeteram-se soluções aquosas de PO e PS ao procedimento de ultrafiltração/centrifugação.

Após a otimização dos parâmetros de centrifugação (tempo e velocidade), soluções aquosas contendo concentrações crescentes do ON (0,5; 1,0; 5,0; 10 e 20 nmol/mL) foram submetidas ao procedimento de ultrafiltração. O ultrafiltrado foi recolhido e a quantidade de PO e PS foi determinada por espectrofotometria na região do UV, em um comprimento de onda fixo de 262 nm. As concentrações recuperadas no ultrafiltrado foram calculadas utilizando-se as equações das retas obtidas no procedimento de validação do método analítico, anteriormente desenvolvido e descrito. Por diferença entre a quantidade inicial (antes do procedimento de centrifugação) e a quantidade final detectada no ultrafiltrado, foi determinada a taxa de recuperação (%) dos ON através da membrana. Os resultados foram expressos como média de duas determinações.

#### *4.2.5.2 Determinação da taxa de associação dos ON*

A fim de estudar a associação dos ON às nanoemulsões, soluções aquosas contendo PO ou PS em concentrações crescentes foram preparadas: 1,0; 5,0; 7,5; 10, 20 e 40 nmol/mL, correspondendo respectivamente a 9,1; 45,7; 68,6; 91,5; 182,9 e 365,8 µg/mL de PO e 9,6; 48,1; 72,1; 96,1; 192,2 e 384,4 µg/mL de PS. As nanoemulsões catiônicas PC/OA e PC/DT, bem como aquela isenta de lipídeo catiônico (PC) foram então diluídas 10 vezes e adicionadas às soluções aquosas dos ON, por mistura simples à temperatura ambiente. Em todos os casos, a concentração final do meio de associação foi de 2 mg/mL.

Após trinta minutos em repouso para a formação dos complexos, as amostras foram colocadas em unidades de ultrafiltração e centrifugadas a uma velocidade de 5.000 rpm por 10 minutos, da mesma maneira que as soluções aquosas dos ON utilizadas para o teste de recuperação das membranas. O ultrafiltrado obtido foi

---

analisado por espectrofotometria na região do UV em um comprimento de onda fixo de 262 nm e as quantidades de PO e PS livres (não associadas), foram determinadas. As concentrações de ON foram calculadas utilizando-se as equações das retas obtidas conforme método validado na seção anterior. Para todas as amostras foi realizado um espectro de absorção no UV na faixa de 200 a 400 nm, a fim de verificar a ausência de qualquer pico interferente. Os resultados foram expressos como a média de dois experimentos independentes e a quantidade associada por grama de nanoemulsão foi obtida através da equação 8.

$$Q_a = \frac{(C_i - C_r) \cdot PM \cdot 10^{-6}}{C_{ne}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde,

$Q_a$  = Quantidade de ON associado (mg de ON/g de fase interna);

$C_i$  = Concentração de ON inicial adicionada as nanoemulsões (nmol/mL);

$C_r$  = Concentração residual de ON recuperada no ultrafiltrado (nmol/mL);

$PM$  = Peso molecular do ON (g/mol);

$C_{ne}$  = Concentração de fase interna de nanoemulsão no meio de associação (g/mL).

#### 4.2.5.3 Caracterização do sistema ON/nanoemulsão

A fim de avaliar a influência dos ON nas propriedades físico-químicas das nanoemulsões, os sistemas formados foram avaliados quanto ao diâmetro e morfologia de gotícula e potencial zeta. Os experimentos seguiram as mesmas técnicas descritas anteriormente. Para avaliação do diâmetro de gotícula e do potencial zeta, quantidades crescentes de ON foram adicionadas às nanoemulsões catiônicas. Para estudo da morfologia, soluções aquosas de PO e PS na concentração de 5 nmol/mL (45,7 µg/mL de PO e 48,1 µg/mL de PS), a qual representa condições de totalidade de associação, foram adicionadas às três diferentes formulações em estudo (PC, PC/OA e PC/DT).

#### 4.2.5.4 Aplicação de modelos de adsorção

Após o cálculo da quantidade de ON associado às nanoemulsões catiônicas, conforme descrito na seção 4.2.5.2, foram elaboradas as representações gráficas das isotermas de adsorção dos ON de série PO e PS para as diferentes formulações.

Em seguida, foram aplicados aos dados experimentais, os modelos de isotermas de adsorção de Langmuir (equação 9) e Freundlich (equação 10), em sua forma linearizada, para elaboração dos gráficos para cada modelo. Os gráficos linearizados foram elaborados com auxílio do programa Origin 6.0.

$$\frac{C_{eq}}{Q} = \frac{1}{K_L Q_m} + \frac{C_{eq}}{Q_m} \quad (\text{Equação 9})$$

$$\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_{eq} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde,

$C_{eq}$  = concentração do ON livre no equilíbrio (mg/mL);

$Q$  = quantidade de ON adsorvido (mg/g de fase interna);

$K_L$  = constante de Langmuir (mL/mg);

$Q_m$  = capacidade de adsorção (mg/g);

$K_F$  = constante de Freundlich;

$n$  = constante de Freundlich.

#### 4.2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando programa Excel® versão 2007 (Microsoft, EUA), através de ANOVA fator único, teste t de Student e regressão linear. Os gráficos foram elaborados em programa Origin 6.0.

---

#### **4.2.7 Disposição de resíduos**

Os resíduos de solventes gerados foram basicamente etanol, armazenado e identificado conforme normas da Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) da Faculdade de Farmácia (UFRGS). A coleta e o encaminhamento dos resíduos para posterior tratamento foram realizados conforme rotinas e procedimentos da COSAT. Os resíduos do Grupo D, classificados como não recicláveis, foram acondicionados em sacos pretos resistentes, e os recicláveis em sacos de cor azul, conforme adotado pela coleta seletiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), definido pelo Sistema de Gestão Ambiental da instituição. Os resíduos do Grupo E, do tipo não contaminado, foram descartados separadamente dos demais resíduos, em recipientes rígidos e impermeáveis. Os resíduos gerados no experimento de MET foram descartados no próprio local de realização das análises, conforme rotinas pré-existentes.

---





## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## 5.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões

Entre diversas técnicas existentes para preparo de nanoemulsões, a emulsificação espontânea tem sido amplamente descrita (YU *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2001a, 2003; SILVA *et al.*, 2006; MARTINI *et al.*, 2007), sendo considerada como uma técnica simples, de baixo custo e rápida. Além disso, a emulsificação espontânea apresenta como vantagem o uso de temperaturas moderadas durante a obtenção dos sistemas (cerca de 40-50°C), apenas durante a etapa de retirada do solvente, limitando assim os fenômenos de degradação dos componentes lipídicos empregados. Diversos fatores podem influenciar as propriedades físico-químicas de nanoemulsões obtidas por essa técnica, incluindo aqueles relacionados às condições de emulsificação, bem como a composição quali e quantitativa dos sistemas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MARTINI *et al.*, 2007).

As formulações e as condições de emulsificação espontânea utilizadas neste estudo foram recentemente descritas por MARTINI (2005) e FRAGA (2007). Os trabalhos otimizaram a proporção, volume e tipo de solventes em uma primeira etapa. A composição quali e quantitativa dos sistemas foi então estudada, com ênfase na avaliação do efeito da adição de quantidades crescentes de lipídeos catiônicos OA e DOTAP na carga de superfície das nanoemulsões, visto que este parâmetro pode ser relacionado com o número de sítios de interação disponíveis para adsorção de ON, negativamente carregados.

### 5.1.1 Propriedades físico-químicas

A tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas de nanoemulsões obtidas através da técnica de emulsificação espontânea utilizando as formulações propostas por MARTINI (2005).

---

Tabela 4. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea.

	PC	PC/OA	PC/DT
Diâmetro de gotícula (nm)	249 ± 34	261 ± 9	200 ± 11
Viscosidade (cP)	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-34,3 ± 2,0	49,9 ± 3,9	55,5 ± 3,5
pH*	7,2 ± 0,3	8,7 ± 0,1	6,2 ± 0,1

\* Após a determinação, o pH foi ajustado para cerca de 7,4.

De acordo com os resultados da tabela 4, independente da composição da formulação, um tamanho de gotícula entre aproximadamente 200 e 260 nm foi encontrado, com índice de polidispersão inferior a 0,25. Esses valores estão de acordo com o previsto para este tipo de nanoemulsão obtida por emulsificação espontânea (TRIMAILLE *et al.*, 2003; FRAGA, 2007; MARTINI *et al.*, 2007). Além disso, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros apresentados pelas formulações PC/OA e PC/DT, que poderia estar relacionada à existência de duas cadeias carbonadas em DOTAP comparado a uma existente na molécula da OA. Resultados similares foram descritos por MARTINI e colaboradores (2008).

A viscosidade de sistemas submicrométricos, com comportamento reológico do tipo newtoniano, pode ser influenciada por diversos fatores, como a concentração de óleo da fase interna, a natureza do surfactante e o diâmetro de gotícula das formulações (JUMAA e MÜLLER, 1998; SILVANDER *et al.*, 2003). A viscosidade apresentada pelas formulações estudadas variou entre 1,3 cP para formulações contendo apenas lecitina de gema de ovo (PC) e 1,6 cP para formulações contendo os lipídeos catiônicos (tabela 4). Estes valores estão abaixo do máximo sugerido para produtos parenterais (3,9 mPa\*s ou 3,9 cP), visto que essas formulações, quando muito viscosas, podem provocar dor ao paciente após administração intravenosa (JUMAA e MÜLLER, 2001). De acordo com PAL (1998), a viscosidade do sistema aumenta à medida que o diâmetro de gotícula diminui. Apesar da variação observada no diâmetro das gotículas das formulações catiônicas, sua viscosidade permaneceu inalterada, pois a influência do diâmetro neste parâmetro só deve ocorrer em formulações contendo frações de óleo maiores que 0,5,

---

diferentes das formulações aqui estudadas, que possuem uma fração oleosa de 0,1 (SILVANDER *et al.*, 2003).

Em relação ao potencial zeta (tabela 4), a formulação controle apresentou valor negativo, o que pode ser atribuído a presença de fosfolipídeos carregados negativamente na lecitina de gema de ovo (i.e. fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico), os quais em pH neutro encontram-se ionizados (LI e TIAN, 2002; LI *et al.*, 2008). A adição dos lipídeos catiônicos conduziu a um potencial zeta positivo, entre +50 e +55 mV aproximadamente, indicando a localização dos lipídeos catiônicos na interface O/A das nanoemulsões. Conforme já observado por outros autores (HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008), esses valores não foram influenciados de forma estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) pelo tipo de lipídeo catiônico empregado (OA ou DOTAP).

O pH obtido para as formulações logo após o preparo, variou de 6,2 a 8,7 unidades, mas foi imediatamente ajustado para próximo ao pH fisiológico. O ajuste é de extrema importância para minimizar a formação de ácidos graxos livres na preparação e manter estável o diâmetro médio de gotícula, visando à estabilidade química destas formulações (KLANG e BENITA, 1998; GANTA *et al.*, 2008). Observou-se um pH inicial mais elevado para formulações PC/OA, pois conforme previamente relatado por MARTINI e colaboradores (2008), a adição do lipídeo catiônico OA eleva o pH das emulsões proporcionalmente. Os resultados permaneceram na faixa de valores esperados para concentrações de 2 mM do lipídeo. O ajuste do pH nas formulações PC/OA também foi realizado com o objetivo de favorecer a forma ionizada das moléculas de OA, cujo pK é próximo de 10 (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004).

Técnicas microscópicas têm sido utilizadas na determinação do tamanho das gotículas de nanoemulsões, confirmando resultados de outras técnicas e na avaliação morfológica da fase dispersa (HASKELL, 1998; DRISCOLL, 2006). Os resultados da análise das nanoemulsões por MET estão apresentados na figura 5.

---

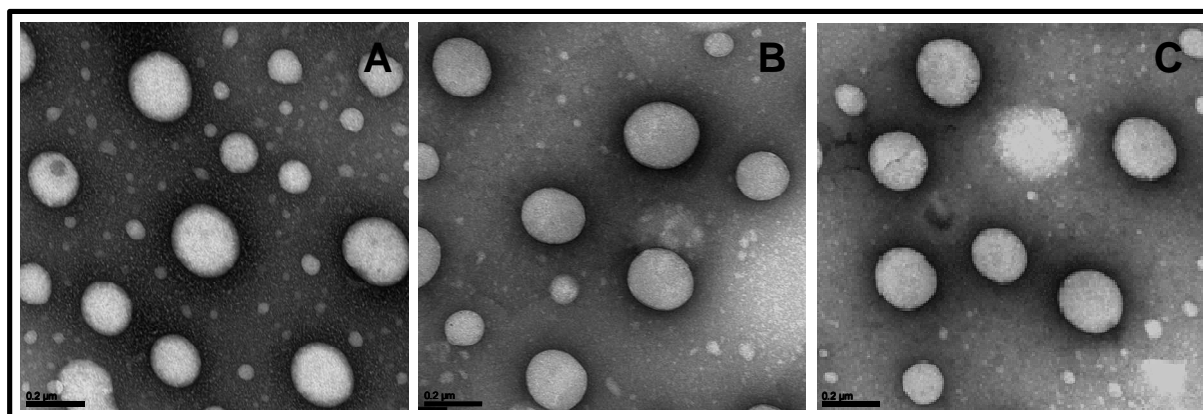


Figura 5. Fotomicrografias das nanoemulsões PC (A); PC/OA (B) e PC/DT (C), obtidas por MET, em aumento de 100.000X.

As fotomicrografias revelam gotículas tipicamente esféricas, com bordas bem definidas, coradas pelo contraste acetato de uranila. Além disso, um diâmetro de cerca 200 nm corrobora os resultados observados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (tabela 4). Não foram observadas diferenças no tamanho e morfologia das gotículas das diferentes formulações, independente da presença e da natureza do lipídeo catiônico utilizado.

### **5.1.2 Propriedades físico-químicas após armazenamento**

Sistemas dispersos possuem inúmeras vantagens na administração de fármacos, mas devido a sua natureza coloidal, problemas de estabilidade existem e devem ser controlados. Diversas forças atuam sobre estes sistemas, podendo ser de atração (Van der Waals) ou de repulsão, como as forças eletrostáticas, de hidratação e estéricas, as quais possuem um importante papel em sua estabilização (WASHINGTON, 1996; FLOYD, 1999). Três fases distintas estão envolvidas no processo de instabilização: (i) *cremagem* ou *sedimentação*, reversível, promovida pelas forças gravitacionais; (ii) *floculação*, ainda reversível, que ocorre quando as forças de atração são superiores as de repulsão, e (iii) *coalescência*, irreversível, com completa separação de fases (WASHINGTON, 1996; TADROS *et al.*, 2004).

Visando observar a estabilidade das formulações preparadas, elas foram armazenadas por 90 dias a 4° C, em frascos âmbar do tipo I. Os resultados da caracterização físico-química das formulações após o armazenamento estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões após armazenamento a 4°C por 90 dias.

	PC	PC/OA	PC/DT
Diâmetro de gotícula (nm)	375 ± 84	247 ± 8	178 ± 4
Viscosidade (cP)	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Potencial zeta (mV)	-45 ± 6	34 ± 0,9	45 ± 3,5
pH	6,5 ± 2,0	6,1 ± 0,1	6,4 ± 0,4

Como se pode observar, comparando-se as tabelas 4 e 5, os diâmetros médios das gotículas das formulações catiônicas não apresentaram variações significativas ( $p > 0,05$ ), indicando a eficiência do filme interfacial na manutenção da estabilidade do sistema. O diâmetro médio determinado para as formulações contendo apenas lecitina (PC) mostrou-se, contudo, aumentado, sugerindo um efeito da carga positiva proveniente dos lipídeos catiônicos (atuando como co-emulsionantes) na estabilidade das formulações. Observa-se ainda que a viscosidade das formulações permaneceu inalterada ( $p > 0,05$ ) para todas as formulações estudadas.

Entretanto, observou-se uma diferença no potencial zeta das formulações antes e após o armazenamento, que variou significativamente ( $p < 0,05$ ) para valores mais negativos, tanto para formulações contendo apenas lecitina de gema de ovo (PC) quanto para formulações adicionadas do lipídeo catiônico. Paralelamente ao decréscimo do potencial zeta, um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH, previamente ajustados próximos ao pH fisiológico, foram observados para as 3 formulações. Estas alterações podem estar relacionadas à formação de ácidos graxos livres no sistema, a partir da oxidação e hidrólise dos fosfolipídeos e triglicerídeos (RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004). A localização dos ácidos graxos livres na interface se manifesta através da redução do potencial zeta para valores

---

mais negativos, seja através do aumento do número de cargas negativas na interface, como nas formulações PC, ou através da neutralização de parte da carga positiva decorrente da presença dos lipídeos catiônicos, como nas formulações PC/OA e PC/DT (CHANSIRI *et al.*, 1999; RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2005). Além disso, não foram observadas diferenças no pH entre as diferentes formulações, visto que os principais contribuidores para a formação de ácidos graxos livres, os triglicerídeos e fosfolipídeos, estavam igualmente presentes nas diferentes nanoemulsões (DRISCOLL, 2006).

## 5.2 Validação do método analítico

A validação de um método analítico é um processo pelo qual se verifica se as características de *performance* do método cumprem os requisitos para a aplicação analítica a que se destina. O desenvolvimento de uma série bem definida de experimentos de validação deve garantir que todos os dados obtidos através do uso de um método analítico sejam realmente confiáveis, pois procedimentos inapropriados de análise podem levar a decisões incorretas (ERMER, 2001; USP, 2007).

As medidas de absorção na região do UV são simples, de baixo custo, de fácil automatização, rápidas e sensíveis, por isso podem ser utilizadas na análise de grande variedade de substâncias. A identificação de uma molécula através da espectrofotometria na região do UV se dá através das características de absorção de energia em um comprimento de onda específico. A elevada quantidade de estruturas que apresentam grupamentos cromóforos como é o caso dos ON, facilitam a utilização deste tipo de método (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a validação do método analítico por espectrofotometria na região do UV para a determinação dos ON de série PO e PS (figura 6) incorporados às nanoemulsões obtidas na primeira etapa do trabalho.

---



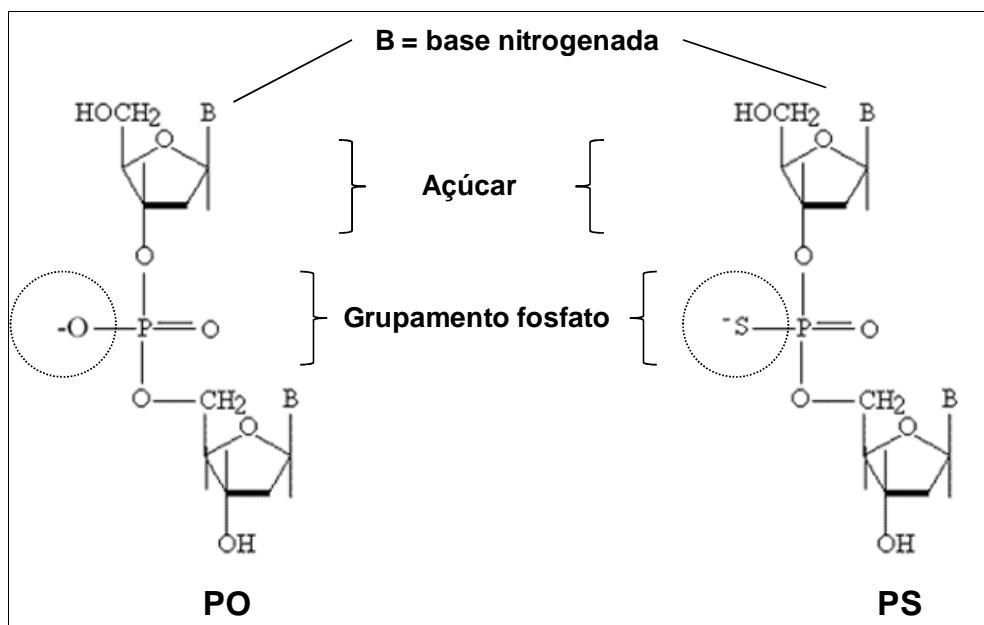


Figura 6. Estrutura química dos ON de série PO e PS (quimicamente modificado).

Os ON utilizados neste estudo apresentam 30 nucleotídeos em sua estrutura, cada um deles apresentando bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas capazes de absorver energia na região do UV. Conforme observado na figura 6, os ON de série PO e PS diferem entre si apenas pela ligação fosfodiéster. Em PS ocorre a substituição de um dos oxigênios não ligantes do grupamento fosfato (presente em PO) por um enxofre (COUVREUR e MALVY, 2000).

Os parâmetros de validação selecionados para o doseamento dos ON seguiram as normas de validação dos procedimentos analíticos e de metodologias do ICH, da USP e da ANVISA/RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP, 2007). Segundo suas diretrizes, os testes que devem compor um processo de validação incluem a linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade, limites de detecção e quantificação, robustez. Entretanto, cada tipo de procedimento analítico deve seguir os parâmetros que suas características exigem (ICH, 2005). Assim, é de responsabilidade do analista identificar quais são estes parâmetros e desenvolver protocolos próprios de validação, para assegurar a confiança do método e o desenvolvimento de uma análise apropriada. Um método validado indica que o mesmo foi avaliado estatisticamente e é adequado para o seu propósito (ERMER, 2001).

### 5.2.1 Determinação da DO dos ON

ON sintéticos são disponibilizados na forma liofilizada pelas empresas fornecedoras. Entretanto, devido à alta capacidade de hidratação de moléculas de ácidos nucleicos, a determinação da massa do liofilizado não é confiável para determinar o produto final. A pesagem dos ON é apenas utilizada como um controle aproximado do processo produtivo (EUROGENTEC, 2008).

Desta forma, a fim de determinar a quantidade real de ON adquirida, a DO dos mesmos foi determinada por absorção em região do UV, a 260 nm. Este procedimento é de extrema importância neste trabalho, visto que não existe um padrão disponível para comparação durante a quantificação dos ON.

Uma unidade de DO é definida como a quantidade de ON que resulta na absorvância de uma unidade, quando dissolvida em um volume de 1 mL e determinada a 260 nm em uma cubeta de quartzo, com caminho ótico de 1 cm. Uma unidade de DO corresponde aproximadamente a 33 µg de uma fita simples de DNA. Entretanto, esta relação pode ser imprecisa para fragmentos de tamanhos pequenos, como os ON. Além disso, a composição das bases afeta a absorvância do DNA, de forma que o valor preciso da relação de massas com a DO deveria ser calculado para cada seqüência de ON. Conforme apresentado na seção “Materiais e Métodos”, a relação entre a quantidade de ON e a DO determinada foi estabelecida com base no peso molecular e nos coeficientes de extinção molar ( $\mathcal{E}_{260}$ ) de PO e PS, conforme dados das especificações do produto, fornecidos pela empresa fornecedora Eurogentec (EUROGENTEC, 2008). Os resultados deste experimento estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Cálculo da quantidade de PO e PS, em nmol e µg de ON, através de resultados provenientes da determinação da DO dos mesmos.

ON	Absorvância	DO	$\mathcal{E}_{260}$ (L/mol*cm)	PM (g/mol)	Quantidade de ON (nmol)	Quantidade de ON (µg)
PO	0,510	141,47	291300	9146	485,7	4442,2
PS	0,334	42,83	291300	9610	147,0	1412,7

As quantidades de PO e PS determinadas, para serem utilizadas ao longo do trabalho, foram 485,7 e 147,0 nmol, respectivamente.

### 5.2.2 Seleção do comprimento de onda de leitura

Após determinar a real concentração dos ON adquiridos, ajustou-se as soluções previamente hidratadas para 200 nmol/mL, tanto para PO quanto para PS. Com a diluição adequada para obter-se uma concentração de 0,7 nmol/mL de ON, o espectro de absorção das soluções aquosas de PO e PS foram traçados, em uma região de 200 a 400 nm, como pode ser observado na figura 7.

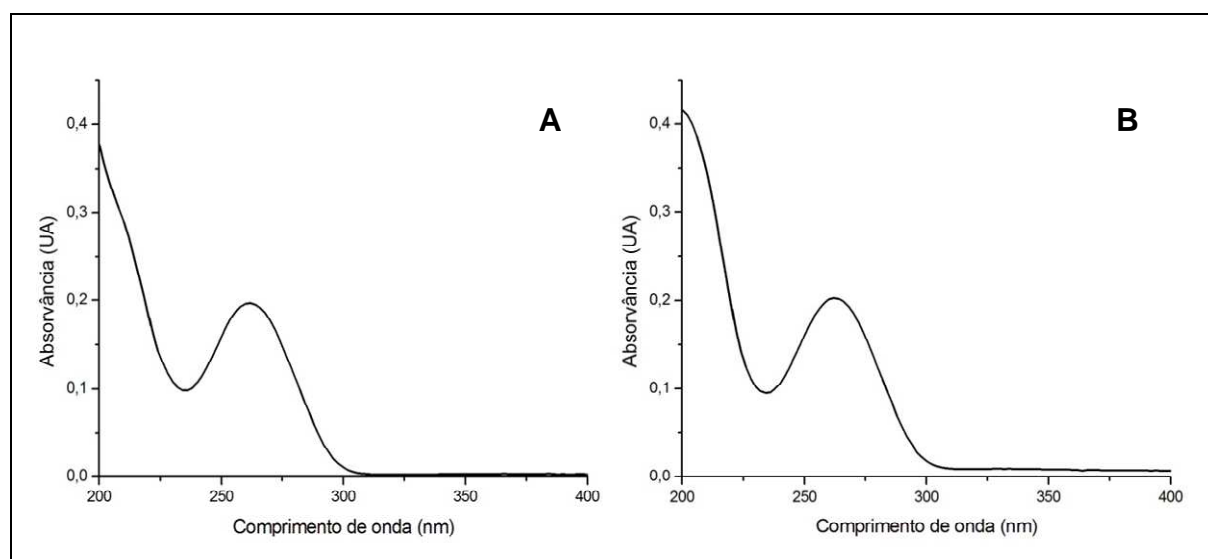


Figura 7. Espectros de absorção de PO (A) e PS (B) em solução aquosa, na faixa de 200 a 400 nm.

Como observado na figura 8, espectros muito semelhantes foram obtidos para PO (figura 7A) e PS (figura 7B), visto que a substituição na ligação fosfodiéster de ON não deve influenciar no coeficiente de extinção molar e, portanto, nos espectros de absorção destes ON em região do UV (COUVREUR e MALVY, 2000).

Tanto os ON de série PO quanto PS apresentaram uma absorção máxima em um comprimento de onda de 262 nm ( $\lambda_{max}$ ), semelhante ao já descrito na literatura para estas estruturas (260 nm) (COUVREUR e MALVY, 2000; UNGARO *et al.*, 2003;

---

FATTAL *et al.*, 2004). Assim, todos os ensaios subseqüentes de quantificação do PO e PS foram realizados neste comprimento de onda.

### **5.2.3 Especificidade**

A especificidade do método indica a sua capacidade de avaliar um composto de interesse, sem equívoco, em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e adjuvantes. A especificidade pode ser comprovada mediante a comparação dos espectros de absorção do analito na presença e na ausência da mistura de adjuvantes, cujo resultado não deve ser afetado por estes compostos (ICH, 2005).

Em um primeiro experimento, a avaliação da especificidade foi realizada através da comparação dos espectros de absorção dos ON (0,7 nmol/mL) em solução aquosa, na ausência (figura 8A) e na presença de glicerol (figura 8B), bem como de uma solução glicerinada 2,25% na ausência dos ON (figura 8B). O glicerol foi escolhido por ser o único adjuvante adicionado a fase externa das nanoemulsões e que poderia estar presente no ultrafiltrado, após o procedimento de ultrafiltração/centrifugação, onde deverão ser determinadas as concentrações dos ON nos estudos subseqüentes. O glicerol está presente nas formulações em concentração de 2,25% e possui a função de agente isotonzante, visto que estas nanoemulsões objetivam o uso parenteral e, portanto, devem apresentar características de tais produtos. Considerando-se a elevada estabilidade de moléculas de DNA em solução, produtos de degradação não foram avaliados.

---

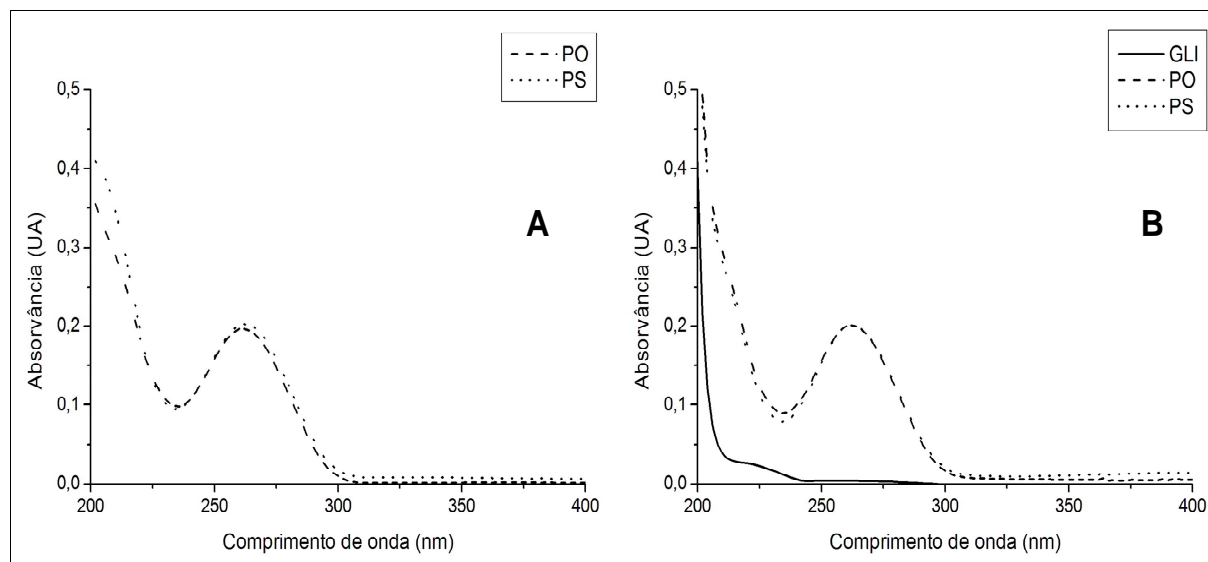


Figura 8. (A) Espectros de absorção dos ON (PO e PS) em solução aquosa. (B) Espectro de absorção de uma solução glicerinada 2,25% (GLI), e adicionada dos ON (PO e PS).

Como observado nos espectros apresentados, de fato o glicerol não interfere nos resultados de absorvância no comprimento de onda de análise. Dessa forma, os ON de série PO e PS podem ser quantificados na presença do adjuvante a uma concentração de 2,25%.

#### 5.2.4 Linearidade

Após a confirmação da ausência de interferência dos componentes do ultrafiltrado das formulações na quantificação dos ON, nas condições experimentais utilizadas, foi determinada a faixa de linearidade do método.

A linearidade representa a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um determinado intervalo de variação. Ela é avaliada através da elaboração de uma curva padrão, observada graficamente, correspondendo ao intervalo das concentrações de interesse, e da análise estatística dos resultados obtidos, através da análise de regressão linear (BRASIL, 2003a).

As curvas padrão determinadas para quantificação de PO e PS foram obtidas em uma faixa de concentração compreendida entre 0,4 e 1,0 nmol/mL, com sete pontos de análise, sendo cinco pontos o mínimo recomendado (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). A cada dia de experimento, a partir dos sete pontos preparados em triplicata, gerou-se uma curva padrão. As determinações das absorvâncias foram realizadas três vezes para cada amostra. Os gráficos representativos das curvas padrão, referentes aos três dias de análise para PO e PS, estão apresentados na figura 9.

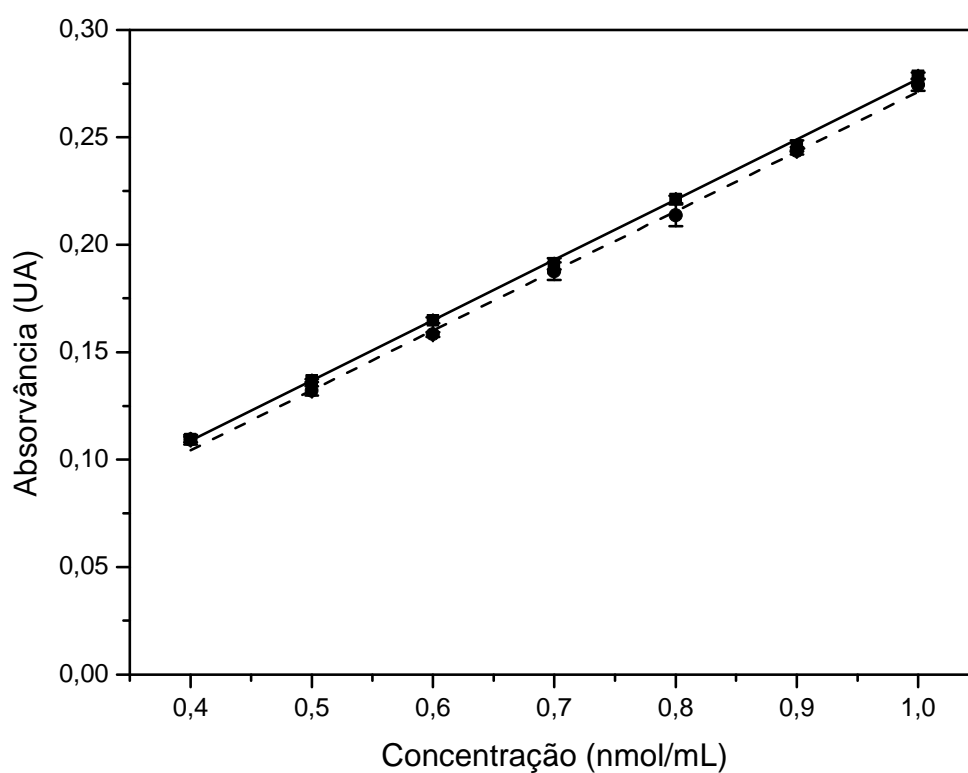


Figura 9. Representação gráfica das curvas padrão obtidas para PO (quadrado/linha) e PS (círculo/linha tracejada) por espectrofotometria de absorção em UV a 262 nm.

Na tabela 7 está demonstrada a análise de variância (ANOVA) realizada a partir dos valores experimentais obtidos.

Tabela 7. ANOVA dos resultados experimentais obtidos através do ensaio de linearidade para PO e PS por espectrofotometria de absorção em UV a 262 nm.

	Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F calculado
PO	Entre	6	0,065606	0,010934	3435,88 *
	Regressão linear	1	0,065563	0,065563	20601,71*
	Desvio de linearidade	5	0,000043	0,000009	2,71 <sup>NS</sup>
	Dentro	14	0,000045	0,000003	
	Total	20	0,065651		
PS	Entre	6	0,064414	0,010736	1160,76 *
	Regressão linear	1	0,064300	0,064300	6952,24 *
	Desvio de linearidade	5	0,000114	0,000023	2,46 <sup>NS</sup>
	Dentro	14	0,000129	0,000009	
	Total	20	0,064543		

\* Significativo para  $p < 0,05$ <sup>NS</sup> Não significativo.

Como observado na tabela 7, não houve desvios de linearidade significativos nos valores obtidos. Na análise de resíduos, também não foram detectados pontos discrepantes (*outliers*). Além disso, houve significância entre as concentrações determinadas e nos resultados da análise de regressão linear ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a avaliação da linearidade é estatisticamente válida.

Os valores do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) e das equações da reta obtidos por regressão linear, através do método dos mínimos quadrados, bem como a faixa de linearidade e os limites do intercepto, estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Dados do estudo de linearidade do método para PO e PS, considerando três dias diferentes de experimentos.

	PO	PS
Faixa de concentração (nmol/mL)	0,4 - 1,0	0,4 - 1,0
Equação da reta	$y = 0,2794x - 0,0032$	$y = 0,2767x - 0,0053$
Intercepto	[-0,007; 0,001]	[-0,011; 0,001]
$r$	0,9993	0,9981

Os intervalos dos interceptos obtidos para PO e PS incluem o valor nulo, indicando ausência de erros sistemáticos no método. Além disso, os valores de  $r$  obtidos, próximos da unidade ( $r > 0,99$ ), demonstram a elevada relação existente entre a concentração de ON presente na amostra e os valores de absorvância observados.

Adicionalmente, para comparação das retas obtidas (figura 9), realizou-se o teste  $t$  para igualdade de interceptos e o teste  $t$  para igualdade de inclinações. Os resultados não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os interceptos ( $F_{\text{calculado}} = 0,892$ ) nem entre as inclinações ( $F_{\text{calculado}} = 0,228$ ) das duas retas, comprovando novamente que a modificação no grupamento fosfato não altera a capacidade de absorção de luz na região do UV para estes ON (COUVREUR e MALVY, 2000).

### 5.2.5 Limites de Detecção e Quantificação

O método para quantificação de PO e PS foi então avaliado quanto a sua sensibilidade, através da determinação dos limites LD e LQ. O LD representa a menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, enquanto o LQ representa a menor quantidade que pode ser quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas, com precisão e exatidão adequadas (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Os valores de LD e LQ podem ser obtidos com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação de no mínimo três curvas padrão, através de fórmulas já apresentadas neste trabalho (ICH, 2005). Calculados com base nas curvas do ensaio de linearidade, os valores de LD e LQ estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Limites de detecção e quantificação determinados matematicamente a partir dos valores obtidos pelas curvas padrão.

	PO	PS
LD (nmol/mL) *	0,0278	0,0233
LQ (nmol/mL) *	0,0927	0,0706

\* Considerando 3 curvas de calibração, referentes aos 3 dias diferentes de análise.



---

O método apresentou sensibilidade adequada para as análises propostas e os valores de LD e LQ mostraram-se relativamente similares para ambos os ON.

### **5.2.6 Precisão**

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas de amostragens múltiplas, analisadas em diferentes dias, por diferentes analistas, equipamentos ou laboratórios (BRASIL, 2003a). A precisão normalmente é expressa na forma de desvio padrão relativo (DPR) entre as determinações realizadas e pode ser avaliada em três diferentes níveis: precisão intermediária, repetibilidade ou reprodutibilidade (ICH, 2005). A reprodutibilidade do método avalia a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios e é um procedimento exigido para inclusão de procedimentos analíticos a farmacopéias. Como não corresponde ao objetivo deste trabalho, este parâmetro não foi avaliado.

Para avaliação do parâmetro precisão, preconiza-se a utilização de amostras autênticas, ou artificialmente preparadas (ICH, 2005; USP, 2007). Considerando-se os resultados obtidos no ensaio de especificidade, que indicam ausência de interferência do glicerol nas determinações, os dados da linearidade foram utilizados para avaliação da precisão do método em um primeiro momento.

A repetibilidade (precisão intradia) representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, nas mesmas condições de análise, por um mesmo analista. Para determinação, exige-se um mínimo de 9 determinações, em 3 concentrações (em triplicata) abrangendo a faixa de análise para a qual o método está sendo validado (ICH, 2005). Desta forma, neste trabalho foram calculados os DPR para cada ponto da curva padrão, para cada um dos três dias de análise do ensaio de linearidade. Os resultados foram expressos na tabela 10 e 11, para ON de série PO e PS respectivamente, na forma de faixa de variação dos DPR calculados.

---

Tabela 10. Precisão do método de determinação de ON de série PO por espectrofotometria de absorção em UV, com base nos resultados obtidos no estudo de linearidade.

Concentração (nmol/mL)	Absorvância DIA 1	Absorvância DIA 2	Absorvância DIA 3	DPR (%) Intradia	DPR (%) Interdia <sup>a</sup>
0,4	0,111	0,108	0,110	1,39 - 2,60	1,16
0,5	0,136	0,137	0,137	0,59 - 1,78	0,49
0,6	0,165	0,163	0,166	1,23 - 1,86	0,82
0,7	0,193	0,188	0,192	0,44 - 1,82	1,34
0,8	0,223	0,220	0,221	0,30 - 1,15	0,79
0,9	0,243	0,246	0,248	0,89 - 1,98	1,02
1,0	0,277	0,280	0,279	0,75 - 1,03	0,57

<sup>a</sup> Representa três dias diferentes de análise.

Tabela 11. Precisão do método de determinação de ON de série PS por espectrofotometria de absorção em UV, com base nos resultados obtidos no estudo de linearidade.

Concentração (nmol/mL)	Absorvância DIA 1	Absorvância DIA 2	Absorvância DIA 3	DPR (%) Intradia	DPR (%) Interdia <sup>a</sup>
0,4	0,107	0,109	0,112	1,07 - 2,42	2,02
0,5	0,134	0,131	0,130	0,78 - 1,34	1,61
0,6	0,158	0,160	0,158	0,37 - 1,63	0,68
0,7	0,190	0,190	0,183	0,87 - 1,51	2,20
0,8	0,219	0,214	0,209	0,74 - 1,70	2,38
0,9	0,244	0,242	0,246	0,42 - 1,64	0,70
1,0	0,276	0,277	0,271	0,24 - 1,29	1,05

<sup>a</sup> Representa três dias diferentes de análise.

Para os ON de série PO e PS, os DPR máximos obtidos entre análises de um mesmo dia, foram de 2,60% e 2,42% respectivamente. Ambos ocorreram para a concentração de 0,4 nmol/mL de ON, provavelmente por ser a menor concentração, gerando uma absorvância também muito baixa (na ordem de 0,1) e, portanto, passível de maiores variações.

A precisão intermediária (interdia) representa a variação intra-laboratorial, em dias diferentes, por analistas diferentes, ou equipamentos diferentes (USP, 2007). Para tanto, foram calculados os DPR entre os resultados da linearidade nos três diferentes dias de análise, os quais também se encontram expressos nas tabelas 10 e 11. Para ON da série PO, o DPR máximo obtido entre diferentes dias de análise foi de 1,34%, enquanto para PS, o DPR máximo foi de 2,38%.

A legislação brasileira preconiza um DPR máximo de 5,0% para métodos analíticos (BRASIL, 2003a). Considerando-se ainda, o tipo de amostra analisada, a concentração das soluções, a faixa de absorvância de determinação e a técnica utilizada, o método foi considerado preciso com base nos dados do estudo de linearidade.

Em uma segunda etapa, soluções glicerinadas 2,25% contendo PO ou PS foram utilizadas para avaliação da precisão. O ICH e a ANVISA preconizam também, para a determinação da repetibilidade do método, a verificação de um mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste da amostra (BRASIL, 2003a; ICH, 2005). Desta maneira, seis amostras contendo 0,7 nmol/mL de PO ou PS em solução glicerinada foram analisadas em três dias diferentes. O DPR foi calculado para cada dia de análise e o maior valor calculado foi de 2,03% para PO (tabela 12) e 1,40% para PS (tabela 13). A precisão interdia também foi determinada através do cálculo do DPR entre os 3 diferentes dias, sendo observado valores de 1,16% e 0,34% para PO e PS respectivamente, conforme apresentado nas mesmas tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Precisão do método por espectrofotometria de absorção em UV, com base nas análises de PO e PS em solução glicerinada.

	PO		PS	
	Concentração média (nmol/mL) <sup>a</sup>	DPR (%)	Concentração média (nmol/mL) <sup>a</sup>	DPR (%)
DIA 1	0,703	2,03	0,706	1,40
DIA 2	0,698	1,80	0,702	1,21
DIA 3	0,687	1,39	0,702	1,07
Interdia <sup>b</sup>	0,696	1,16	0,703	0,34

<sup>a</sup> Considerando n=6, determinadas em triplicata.

<sup>b</sup> Considerando n=3.

Os DPR inferiores a 5,0% novamente demonstraram que através desse método pode-se determinar a concentração de ON de série PO e PS em solução glicerinada com precisão adequada (BRASIL, 2003a).

### 5.2.7 Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o resultado determinado por um método analítico com um valor verdadeiro ou aceito como referência (ICH, 2005). Existem vários métodos para determinação da exatidão, entre os quais a adição de padrão e posterior determinação da porcentagem de recuperação do mesmo na solução da amostra. Preconiza-se a adição do padrão em 3 níveis de concentrações (alto, médio e baixo), em triplicata (BRASIL, 2003a; ICH, 2005).

Neste estudo, o método de recuperação foi utilizado e os resultados foram expressos em porcentagens de recuperação, calculados como previamente descrito na seção “Materiais e Métodos”. Soluções glicerinadas de PO e PS foram adicionadas de quantidades conhecidas de solução aquosa destes ON nos níveis de concentração 0,5; 0,7 e 0,9 nmol/mL, preparadas em triplicata. Os resultados estão apresentados na tabela 13 e 14 para ON de série PO e PS, respectivamente.

Tabela 13. Resultados obtidos no teste de recuperação (exatidão) por espectrofotometria de absorção em UV para PO.

	Concentração (nmol/mL)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada *			
SR1	0,500	0,502	100,3		
SR2	0,700	0,693	99,0	99,4	0,82
SR3	0,900	0,889	98,8		

\* Os valores representam uma média de 3 experimentos individuais, determinados em triplicata.

Tabela 14. Resultados obtidos no teste de recuperação (exatidão) por espectrofotometria de absorção em UV para PS.

	Concentração (nmol/mL)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada *			
SR1	0,500	0,518	103,6		
SR2	0,700	0,697	99,5	101,0	2,25
SR3	0,900	0,898	99,8		

\* Os valores representam uma média de 3 experimentos individuais, determinados em triplicata.

Os resultados apresentados nas tabelas 13 e 14 indicam taxas de recuperação elevadas dos ON, compreendidas entre 98,8 a 100,3% para PO e 99,5 a 103,6% para PS. O conjunto destes resultados permitiu concluir que o método é exato para determinação dos ON.

### 5.3 Estudo de associação dos ON às nanoemulsões

O estudo de associação dos ON de série PO e PS foi realizado através da técnica de ultrafiltração/centrifugação. Esta técnica consiste na separação de uma fração da fase externa contínua das nanoemulsões após centrifugação das mesmas em membranas de ultrafiltração. Após a centrifugação das nanoemulsões contendo os ácidos nucleicos, a quantidade de ON livres (não complexados) é determinada no ultrafiltrado por espectrofotometria em UV, com auxílio do método previamente validado. O equilíbrio e a estrutura do sistema não sofrem interferências, visto que a separação completa das fases da emulsão não ocorre (OEHLKE *et al.*, 2008).

A escolha de uma membrana apropriada em termos de tamanho de poro e características hidrofílicas é de extrema importância para realização deste experimento, visto que processos interação de moléculas com a membrana, bem como permeação de emulsificantes têm sido descritos na literatura (LOBO *et al.*, 2006; JAMES-SMITH *et al.*, 2007; OEHLKE *et al.*, 2008). Neste trabalho, devido ao caráter hidrofílico e ao tamanho dos ON, foram escolhidas membranas constituídas de celulose regenerada de 30 kDa de *cut off* (Ultrafree®, Millipore®). As condições de centrifugação foram otimizadas a 5000 rpm por 10 minutos.

Em uma primeira etapa, a fim de verificar a existência de limitantes para a passagem dos ON livres em solução, um estudo de recuperação em membranas foi desenvolvido. Concentrações crescentes dos ON de série PO e PS em solução aquosa foram ultrafiltrados/centrifugados nas mesmas condições dos estudos de associação. Os resultados estão apresentados na figura 10.

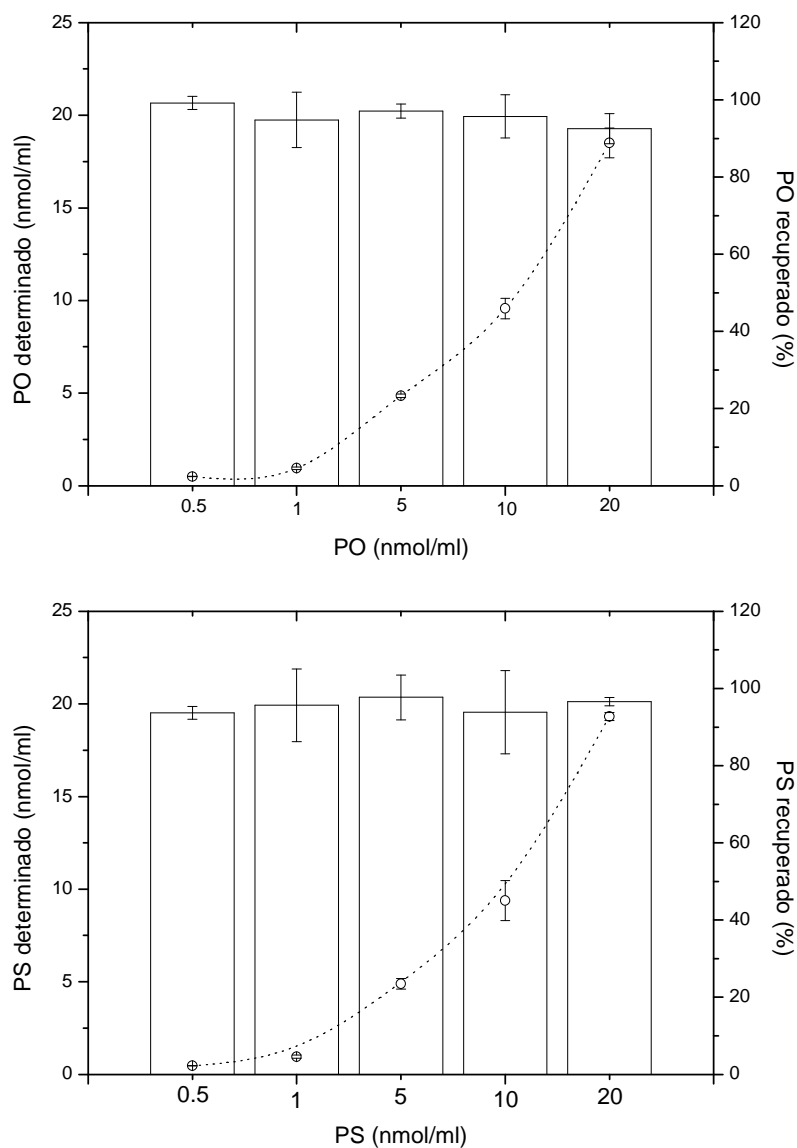


Figura 10. Estudo de recuperação de soluções aquosas de PO e PS em membranas de ultrafiltração após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Os símbolos representam a concentração de ON determinada e as barras a porcentagem de ON recuperado.

Visto que a recuperação de PO e PS no ultrafiltrado foi superior a 92% para todas as concentrações testadas, as membranas de ultrafiltração foram consideradas adequadas para a determinação da taxa de associação dos ON às nanoemulsões, pois não constituíram-se um fator limite para a passagem de ON livres em solução. Em uma segunda etapa, determinou-se a taxa de associação dos ON as nanoemulsões a temperatura ambiente. Os resultados foram apresentados na forma de isotermas de adsorção na figura 11, para a adsorção de PO e PS às três formulações preparadas, PC, PC/OA e PC/DT.

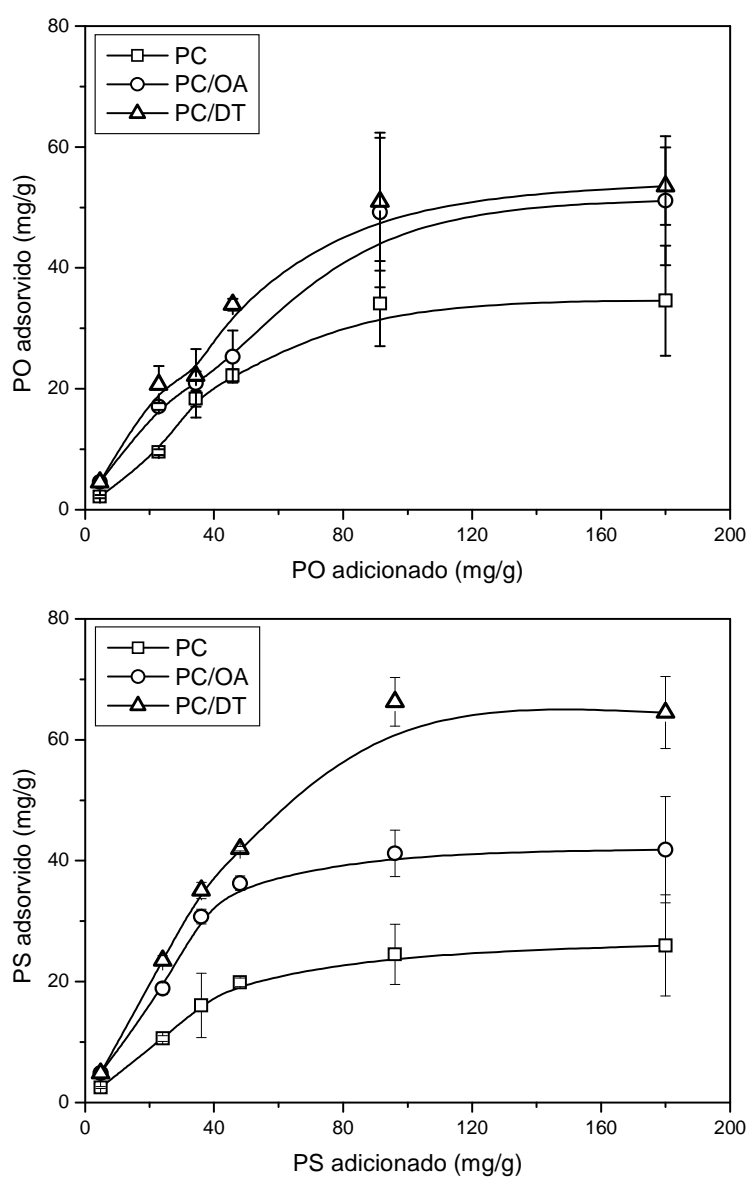


Figura 11. Isotermas de adsorção para ON de série PO e PS obtidas no estudo de associação por ultrafiltração/centrifugação.

---

A adsorção em uma superfície pode ser avaliada quantitativamente através das isotermas de adsorção. Elas expressam a relação entre a quantidade da substância que é adsorvida (ON) por unidade de massa do adsorvente (fase interna das nanoemulsões), e a concentração do adsorvente a uma determinada temperatura constante. Como observado experimentalmente (figura 11), a expressão gráfica da isoterma é uma hipérbole, mas depende do tipo de adsorção que ocorre. A forma da isoterma depende da natureza da substância a ser adsorvida e o seu perfil depende da natureza do adsorvente (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002; PINO, 2005). As isotermas de PO e PS apresentaram-se na forma de curvas convexas para cima, representativas de isotermas do tipo I, ditas “favoráveis” à adsorção. Existem ainda as isotermas “desfavoráveis” ou côncavas para cima (tipo III), as “lineares” e as isotermas com um ou mais pontos de inflexão (tipos II, IV e V) (PERRY e CHILTON, 1986; SINKO, 2006).

Nas isotermas observam-se duas etapas envolvidas no processo de adsorção. A primeira demonstra que a adição de quantidades crescentes de ON a uma mesma quantidade de fase interna de nanoemulsão, proporciona um aumento progressivo na adsorção dos ácidos nucléicos. Isto ocorre até uma segunda etapa, quando o sistema atinge um platô, em concentrações maiores de ON. Após a adição de quantidades superiores a 96 mg de ON por grama de fase interna (ou 20 nmol de ON/mL), o aumento na quantidade de ON adsorvido foi mínimo, indicando a provável existência de um processo de saturação. Outros autores também já haviam observado este fenômeno para adsorção de ON de menor tamanho a nanoemulsões (TRIMAILLE *et al.*, 2003; MARTINI *et al.*, 2007; 2008; HAGIGIT *et al.*, 2008). MARTINI e colaboradores (2008) verificaram que a saturação da interface ocorria após a adição de 90 mg de ON (pdT<sub>16</sub>) por g de fase interna. Assim, o perfil de adsorção parece manter-se semelhante para ON com 30 pares de bases, quando comparados a seqüências menores, bem como para ON PO ou quimicamente modificados a PS.

A formulação contendo apenas lecitina de gema de ovo (PC) apresentou taxa de associação de PO e PS significativamente menor ( $p < 0,05$ ), de 20 a 30 mg/g de fase interna, em relação às formulações catiônicas (superior a 40 mg/g) para a maior concentração de ON adicionada (180 mg/g de fase interna). Estes resultados estão

---



de acordo com os obtidos por MARTINI (2005) para um ON modelo (pdT<sub>16</sub>), de cerca de 20 mg/g de fase interna, e com os obtidos por HAGIGIT e colaboradores (2008) para seqüência de ON de 17 pares de bases. De fato, essa reduzida capacidade de adsorção pode ser relacionada às propriedades de superfície dessas formulações, que apresentam um potencial zeta negativo, devido à presença de fosfolídeos negativamente carregados na lecitina de gema de ovo, como previamente mencionado (LI e TIAN, 2002; LI *et al.*, 2008). O acesso dos ON negativamente carregados a interface é limitado devido a fenômenos de repulsão eletrostática. Entretanto, considerando que os fosfolídeos presentes na interface, utilizados para estabilização das emulsões, são moléculas zwitteriônicas, se pode sugerir que a existência de cargas positivas na cabeça polar dos mesmos permite a atração de ON, mesmo que a carga global da superfície seja negativa (HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008).

Para as formulações contendo os lípídeos catiônicos, a capacidade de adsorção dos ON aumenta substancialmente, devido às interações eletrostáticas entre os lípídeos catiônicos e os ON (TEIXEIRA *et al.*, 1999; 2001a; 2003; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). Observando-se a figura 11, se pode ainda perceber que formulações contendo o lípídeo catiônico DOTAP (PC/DT) parecem permitir uma maior adsorção de ON que formulações PC/OA, especialmente para o ON de série PS. Outros autores têm relatado este fenômeno e o relacionam a estrutura dos lípídeos catiônicos (TEIXEIRA *et al.*, 2001a; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). Considerando-se a presença de apenas uma cadeia hidrofóbica no lípídeo OA (figura 4), a interface destas emulsões apresentaria maior fluidez, limitando a ancoragem das moléculas de ON na interface. Os autores também mencionam a contribuição de interações hidrofóbicas suplementares, existentes entre as monocamadas compostas por DOTAP e lecitina, devido à presença da dupla cadeia hidrofóbica no lípídeo catiônico DOTAP (figura 4).

Visando compreender melhor o mecanismo de adsorção dos ácidos nucléicos às nanoestruturas, modelos de isotermas de adsorção foram aplicados aos dados experimentais de adsorção. As representações gráficas juntamente com análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, têm se mostrado uma ferramenta útil na identificação e classificação das isotermas (DANTAS *et al.*, 2001;

---

HINZ, 2001; DU *et al.*, 2008; GUO e GEMEINHART, 2008). Em estudos prévios, o cálculo dos valores dos coeficientes das equações de cada modelo, através do método da linearização (regressão linear), tem permitido a obtenção de valores muito próximos aos obtidos através do cálculo não linear destes parâmetros (RINGOT *et al.*, 2007).

Dessa forma, os dados experimentais foram utilizados para elaboração de gráficos baseados nas equações das formas linearizadas dos modelos de Langmuir e Freundlich, os mais comumente citados na literatura. O primeiro foi utilizado porque tem sido aplicado com sucesso a diversos sistemas de adsorção, geralmente para baixas concentrações de adsorvato (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002; SINKO, 2006). Recentemente, a adsorção de quitosana sobre nanopartículas poliméricas foi descrita por GUO e GEMEINHART (2008), obedecendo ao modelo de Langmuir em baixas concentrações. Um estudo comparando os modelos de Langmuir e Freundlich para descrever a adsorção de metais pesados, presentes em efluentes industriais, em microemulsões, concluiu que o melhor modelo para descrever o sistema seria o de Langmuir (DANTAS *et al.*, 2001). Em 2003, TRIMAILLE e colaboradores, que estudaram a adsorção de ON modelos, também analisaram os dados de acordo com o modelo de Langmuir. Entretanto, este modelo é descrito em condições ideais de adsorção em superfícies totalmente homogêneas (SINKO, 2006; NADAVALA *et al.*, 2008). O modelo de Freundlich considera a não uniformidade das superfícies reais e descreve bem a adsorção dentro de certos limites de concentração, não muito elevadas (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002; SINKO, 2006).

Os gráficos elaborados a partir dos modelos de Langmuir e Freundlich estão representados na figura 12. Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos para os dois modelos, com base na regressão linear dos dados plotados, conforme equações previamente descritas na seção 4.2.5.4 (Materiais e Métodos). Os resultados dos valores de  $R^2$  estão apresentados na tabela 15.

---

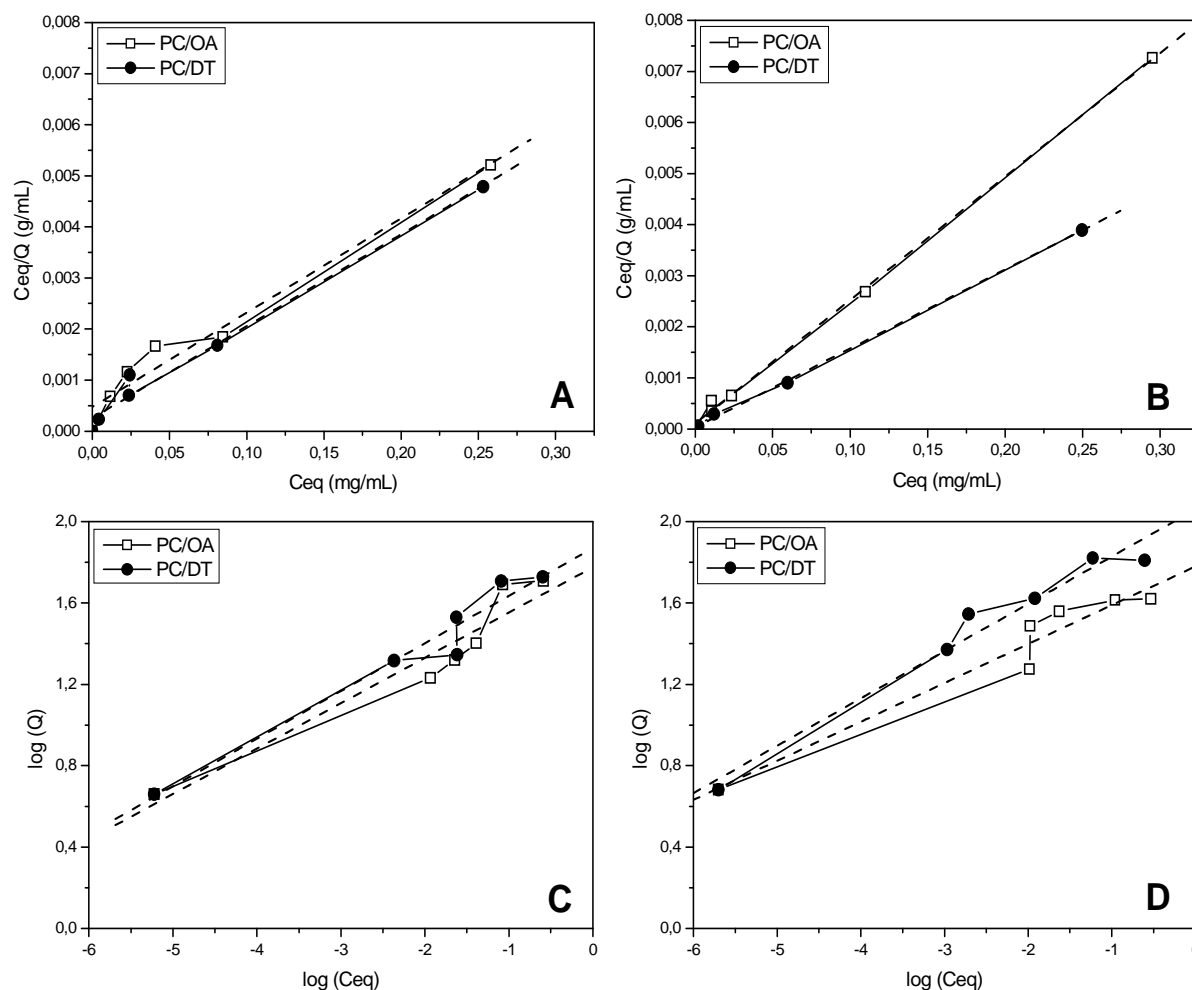


Figura 12. Representação linear dos modelos de adsorção de ON às nanoemulsões catiônicas. Modelo de Langmuir para PO (A) e PS (B) e modelo de Freundlich para PO (C) e PS (D). As linhas cheias representam os dados experimentais e as linhas tracejadas, os dados linearizados.

Tabela 15. Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos por regressão linear, baseados nos modelos de Langmuir e Freundlich, para adsorção de PO e PS a nanoemulsões catiônicas.

Modelos de adsorção	PO		PS	
	PC/OA	PC/DT	PC/OA	PC/DT
Langmuir	0,9839	0,9921	0,9993	0,9996
Freundlich	0,9619	0,9792	0,9728	0,9830

Considerando-se a figura 12, um melhor ajuste dos dados experimentais com os dados linearizados é visualizado nas figuras 12A e 12B, representando o modelo de Langmuir. Com base nos valores de  $R^2$  (tabela 15), estes dados se confirmam, indicando que o modelo que melhor descreve o processo de adsorção dos ON nas formulações catiônicas é o de Langmuir. A isoterma de Freundlich também apresentou valores de  $R^2$  superiores a 0,9, pois também pode ser aplicada a descrição de fenômenos de adsorção em superfícies homogêneas (PINO, 2005; GUO e GEMEINHART, 2008).

Entretanto, apesar de altos valores de  $R^2$  observados, na figura 12 também se observam alguns desvios da reta nos dados experimentais, indicando que a isoterma de Langmuir não descreve perfeitamente o fenômeno. No estudo de TRIMAILLE e colaboradores (2003), os autores não observaram linearidade nos dados tratados pelo modelo de Langmuir, sugerindo então que interações laterais entre as moléculas poderiam estar presentes. Além disso, os autores relacionam o processo de interação ao fenômeno de repulsão eletrostática ou estérica entre os ON livres e os ON já adsorvidos.

Considerando-se a melhor concordância do fenômeno de adsorção de ON às nanoemulsões com o modelo proposto por Langmuir, foram calculados os valores das constantes da equação descrita pelo modelo, apresentada na seção 4.2.5.4 (Materiais e Métodos). As constantes foram calculadas com base na equação da reta ( $y = a + bx$ ) obtida na análise de regressão linear dos dados plotados. Os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Constantes calculadas através das equações das retas, obtidas experimentalmente na análise de regressão linear, e da equação proposta pelo modelo de adsorção de Langmuir.

	PO		PS	
	PC/OA	PC/DT	PC/OA	PC/DT
$Q_m$ (mg/g)	54,23	55,62	41,37	64,72
$K_L$ (mL/mg)	38,68	69,73	226,65	509,12

---

Com base nestes resultados, observa-se que os valores da capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) para PO e para PS correspondem aos valores máximos observados experimentalmente nas isotermas de adsorção (figura 11). A constante de Langmuir ( $K_L$ ) é um parâmetro relacionado à afinidade dos sítios de adsorção (RINGOT *et al.*, 2007) e mostrou-se superior para ON de série PS. Para uma elevada capacidade de adsorção, os dois parâmetros ( $Q_m$  e  $K_L$ ) devem ser preferencialmente altos (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

### **5.3.1 Caracterização físico-química dos complexos**

Após a demonstração da associação dos ON PO e PS com as nanoemulsões, os complexos formados foram caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas e morfológicas, para verificar a influência da presença dos ON nestas propriedades. Para avaliação do diâmetro de gotícula e do potencial zeta, os complexos foram formados em concentrações crescentes de ON, para a mesma concentração de fase interna de emulsão catiônica. Os resultados estão apresentados nas figuras 13, 14 e 15.

---

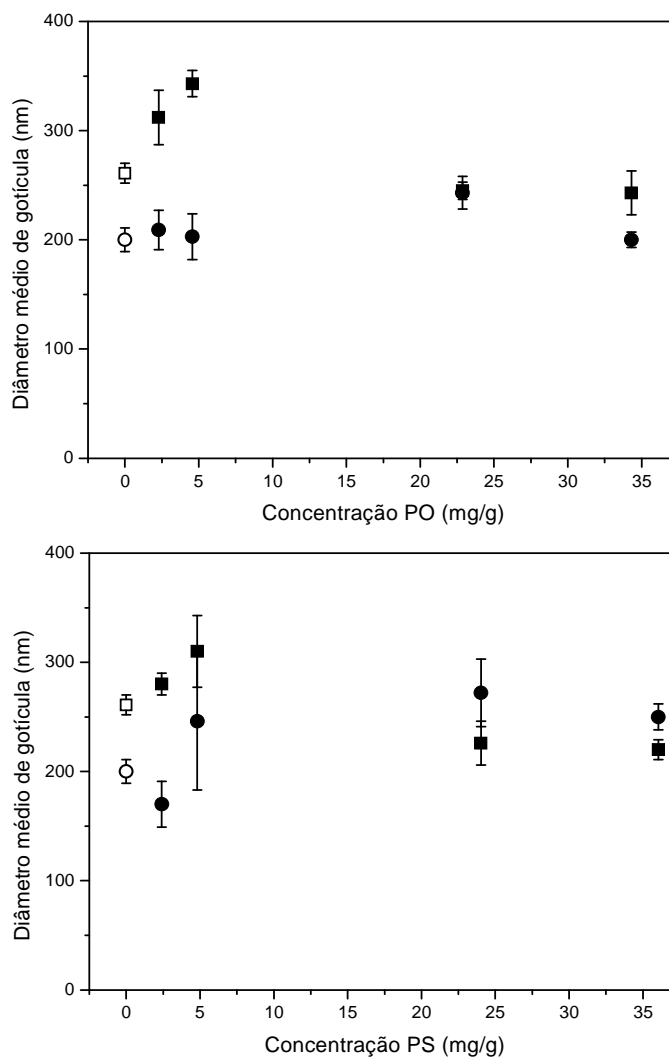


Figura 13. Diâmetro médio de gotícula dos complexos formados com as nanoemulsões PC/OA (■) e PC/DT (●) após adição de quantidades crescentes de PO ou PS. Diâmetro médio de gotícula inicial das nanoemulsões PC/OA (□) e PC/DT (○), antes da adição do ON.

Os resultados da determinação do diâmetro médio de gotícula dos complexos, representados na figura 13, demonstram que os valores médios permaneceram entre 170 e 350 nm, independente do tipo de ON complexado. De maneira geral, após a adição de quantidades crescentes do ON, observou-se um pequeno aumento do diâmetro de gotícula de todas as formulações em relação aos valores originais, antes da adição do ON. Entretanto, este aumento não parece ter sido diretamente proporcional ao aumento progressivo das concentrações de PO e PS.

Comparando-se as duas diferentes formulações avaliadas (PC/OA e PC/DT), pode-se perceber uma tendência da formulação PC/DT a apresentar um menor diâmetro de gotícula, especialmente após adsorção do ON de série PO. Provavelmente, isto deve estar relacionado às duas cadeias carbonadas presentes na estrutura do DOTAP, que permitiriam uma interação mais forte dos ON à interface, inclusive através de interações hidrofóbicas suplementares, mantendo-os mais próximos à superfície das gotículas e reduzindo o diâmetro hidrodinâmico determinado pela técnica.

Os resultados da avaliação do potencial zeta dos complexos após a adição de quantidades crescentes de ON podem ser visualizados na figura 14.

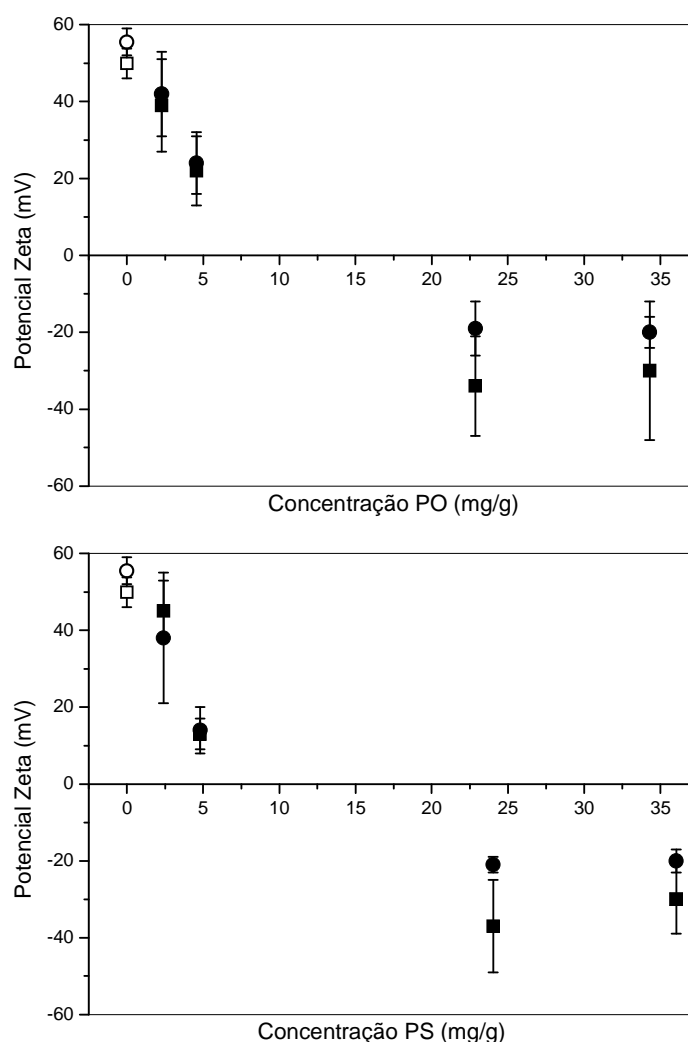


Figura 14. Potencial zeta dos complexos formados com as nanoemulsões PC/OA (■) e PC/DT (●) após adição de quantidades crescentes de PO ou PS. Potencial zeta inicial das nanoemulsões PC/OA (□) e PC/DT (○), antes da adição do ON.

Independente da natureza do lipídeo catiônico (OA ou DOTAP) empregado, observa-se uma redução do potencial zeta das nanoemulsões com a adição de ON de série PO e PS (figura 14). Após a adição de pequenas quantidades de ON, ocorre uma leve redução do potencial zeta positivo, inicialmente superior a +50 mV. A adição de maiores concentrações de PO e PS, conduz a uma redução mais intensa deste potencial, levando a uma inversão completa dos valores originais positivos, para valores negativos até cerca de -40 mV, indicando a neutralização das cargas positivas dos lipídeos catiônicos pelas cargas negativas dos ON na interface das nanoemulsões. Este fenômeno tem sido descrito em outros estudos (TRIMAILLE *et al.*, 2001, 2003; FRAGA *et al.*, 2008; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008). Além disso, neste experimento, a relação de cargas [+/-] dos complexos caracterizados foi de 2,76; 1,38; 0,28 e 0,18, para as concentrações 2,28; 4,57; 22,87 e 34,30 mg de PO por grama de fase interna e 2,4; 4,81; 24,03 e 36,04 mg de PS por grama de fase interna. Assim, corroborando com os resultados da caracterização, formulações contendo proporção maior de ON em relação ao lipídeo catiônico conduziram a um potencial zeta mais negativo.

Ainda em relação ao potencial zeta, observam-se valores mais negativos para formulações PC/OA em comparação a formulações PC/DT, após a adição das maiores concentrações de ON. Entretanto, esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ) para PO, nem para PS.

Em uma última etapa, foi avaliada a morfologia das gotículas por MET após a associação dos ON. As fotomicrografias representativas estão apresentadas na figura 16. Conforme descrito na seção "Materiais e Métodos", para este estudo foram utilizadas concentrações de 5 nmol/mL de ON (45,7 µg/mL de PO ou 48,1 µg/mL de PS) para a associação, que correspondem a primeira etapa das isotermas de adsorção (figura 11), representando a totalidade de associação.



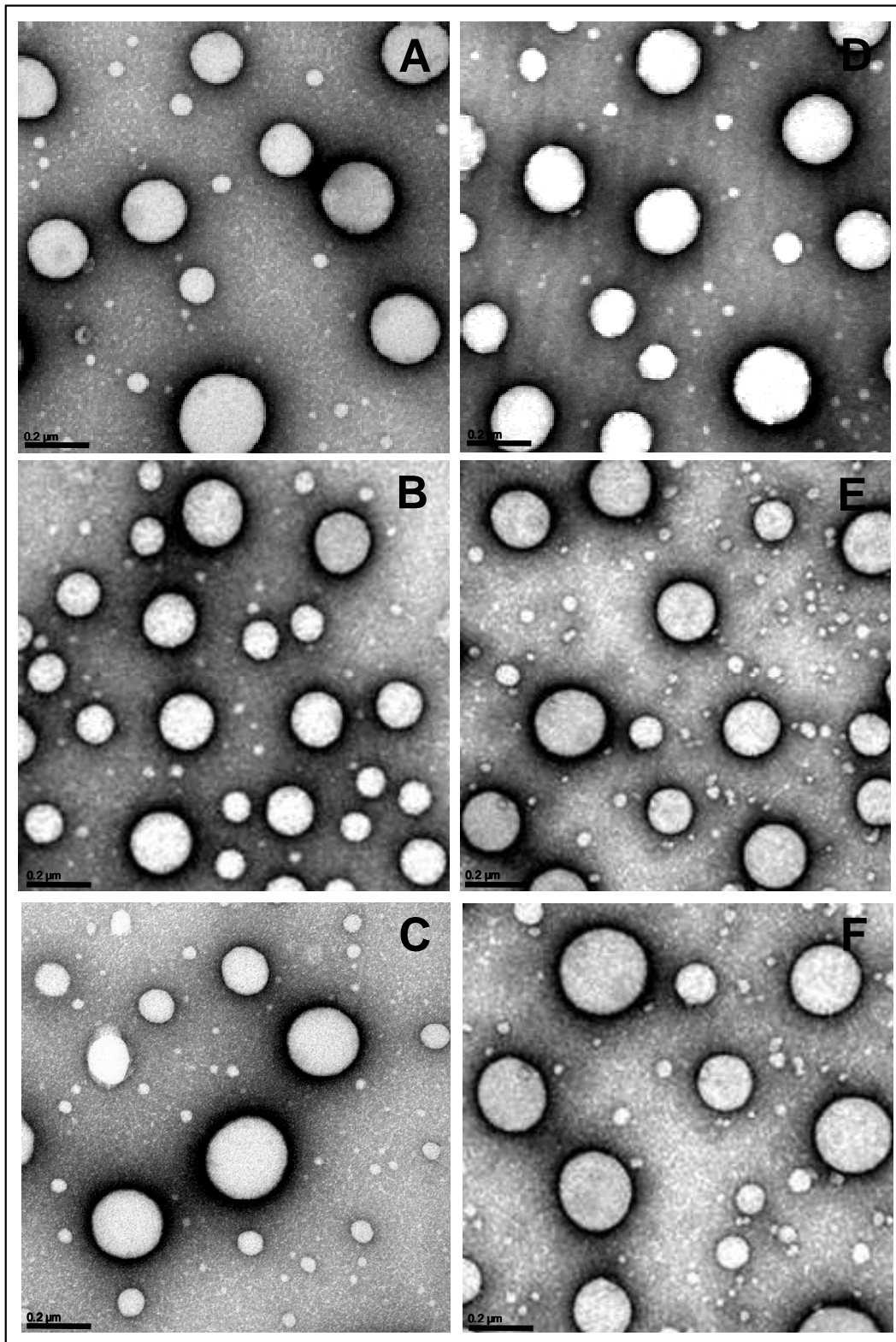


Figura 15. Fotomicrografias dos complexos de PO com as nanoemulsões PC (A); PC/OA (B) e PC/DT (C), e de PS com as nanoemulsões PC (D); PC/OA (E) e PC/DT (F), obtidas por MET, em aumento de 100.000X.

---

Conforme as fotomicrografias, a análise por MET permitiu a visualização de gotículas esféricas, uniformemente distribuídas e com diâmetro médio situado entre 100 e 300 nm, concordando com os resultados obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (figura 15). Além disso, não foram visualizadas alterações marcantes neste diâmetro em relação às fotomicrografias das nanoemulsões apresentadas anteriormente (figura 5), antes da associação dos ON. Entretanto, visualiza-se uma camada mais espessa no limite das gotículas oleosas, sugerindo a presença do PO ou PS associado à interface das nanoemulsões. As áreas mais escuras observadas na interface após a associação dos ON podem ser atribuídas à elevada afinidade do contraste utilizado na técnica (acetato de uranila) pelos ácidos nucléicos. De acordo outros autores (TARAHOVSKY *et al.*, 1996; CHEVALLIER, 2004; MARTINI *et al.*, 2008), as cargas positivas existentes no acetato de uranila se ligam irreversivelmente aos ácidos nucléicos, permitindo assim sua visualização por MET.

De fato, a interação dos ON com as nanoemulsões parece ser de origem eletrostática, com a localização dos mesmos na interface das nanoemulsões, conforme demonstrado pelas alterações do potencial zeta e pelo aumento no diâmetro médio das gotículas da fase interna, em acordo com os resultados já relatados para diferentes ON (TEIXEIRA *et al.*, 1999, 2001a, 2003; HAGIGIT *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008).

---

## **6. CONCLUSÕES**

---



- 
- O procedimento de emulsificação espontânea conduziu a obtenção de nanoemulsões catiônicas monodispersas com propriedades físico-químicas adequadas à adsorção de ON.
  - O armazenamento das formulações por 90 dias não alterou significativamente o diâmetro de gotícula. Contudo, alterações no potencial zeta e no pH foram detectadas, sugerindo a provável formação de ácidos graxos livres.
  - O método analítico validado para quantificação dos ON por espectrofotometria no UV mostrou-se linear, preciso, exato e específico para a determinação dos ON de série PO e PS, sem efeito da modificação química do ON.
  - A eficiência de associação de PO e PS foi influenciada pela composição da interface das nanoemulsões, mas não pela modificação química dos ON.
  - O fenômeno de adsorção de PO e PS as nanoemulsões foi caracterizado por duas etapas e foi melhor descrito pelo modelo de adsorção de Langmuir, considerando, entretanto, a possibilidade de existência de interações laterais entre moléculas de ácidos nucléicos.
  - A adsorção dos ON na interface foi evidenciada pelo aumento do diâmetro de gotícula, inversão do potencial zeta e pela morfologia das gotículas oleosas avaliadas por MET.
  - O conjunto dos resultados obtidos demonstra as potencialidades das nanoemulsões catiônicas obtidas como carreadores de ON com atividade antimalárica.
-



## **7. REFERÊNCIAS**

---





---

BANSAL, R. C.; GOYAL, M. **Activated Carbon Adsorption**. Boca Raton (EUA): CRC, 2005. 497 p.

BARKER JR., R. H.; METELEV, V.; RAPAPORT, E.; ZAMECNIK, P. Inhibition of *Plasmodium falciparum* malaria using antisense oligodeoxynucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, p. 514-518, 1996.

BARUT, K. D.; COSKUN ARI, F. F.; ÖNER, F. Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system. **Turkish Journal of Chemistry**, vol. 29, p. 27-40, 2005.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.

BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMEIJN, S.; VAN MEIJGAARDEN, C.; KOERTEN, H.; VAN DER MEULEN, H.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; JUNGINGER, H.; BORCHARD, G. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **Journal of Controlled Release**, vol. 100, p. 145-155, 2004.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 280, p. 241-251, 2004.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. 6<sup>a</sup>. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 104 p. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu\\_terapeutica\\_malaria.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_terapeutica_malaria.pdf)>. Acesso em 30/09/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n<sup>o</sup>. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003b. 132 p. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncm.pdf>>. Acesso em 30/09/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **A malária no Brasil**. 2005. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be\\_malaria\\_01\\_2005.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf)>. Acesso em 30/09/2008.

BROWN, M. D.; SCHÄTZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 229, p. 1-21, 2001.

---

- 
- CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.
- CAMPBELL, R. B.; BALASUBRAMANIAN, S. V.; STRAUBINGER, R. M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1512, p. 27-39, 2001.
- CDC, Centers for Disease of Control and Prevention. **Malaria**. EUA, 2005. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/malaria/distribution\\_epi/distribution.htm](http://www.cdc.gov/malaria/distribution_epi/distribution.htm)>. Acesso em 08/10/2008.
- CHANSIRI, G.; LYONS, R. T.; PATEL, M. V.; HEM, S. L. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 88, n. 4, p. 454-458, 1999.
- CHESNOY, S.; HUANG, L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, vol. 29, p. 27-47, 2000.
- CHEVALLIER, P. Étude au microscope électronique de l'interaction de l'acide désoxyribonucléique et des polyamines. **Experimental Cell Research**, vol. 58, p. 213-224, 2004.
- CHOI, W.; KIM, J.; CHOI, S.; PARK, J.; AHN, W. S.; KIM, C. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. **Biomaterials**, vol. 25, p. 5893-5903, 2004.
- CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, vol. 71, p. 339-350, 2001.
- CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.
- CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 60, p. 757-767, 2008.
- COUVREUR, P.; MALVY, C. (Ed.) **Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides**. London: Taylor & Francis, 2000. 321 p.
- DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; MOURA, M. C. P. A. Removal of Chromium from aqueous solutions by diatomite treated with microemulsion. **Water Research**, vol. 35, n. 9, p. 2219-2224, 2001.
- DATE A. A.; NAGASENKER, M. S. Parenteral microemulsions: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 355, p. 19-30, 2008.
- DIERLING, A. M., CUI, Z. Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 303, p. 143-152, 2005.
-

---

DRISCOLL, D. F. Lipid Injectable Emulsions: Pharmacopeial and Safety Issues. **Pharmaceutical Research**, vol. 23, n. 9, p. 1959-1969, 2006.

DU, W. L.; XU, Z. R.; HAN, X. Y.; XU, Y. L. MIAO, Z. G. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 153, p. 152–156, 2008.

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

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 24, p. 755-767, 2001.

EUROGENTEC. **Frequently asked questions – FAQs**. Disponível em <<http://www.eurogentec.com/FAQs.html>>. Acesso em 08/05/2008.

**FARMACOPÉIA Brasileira**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt. 1, cap. V.2.7.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; AYNIE, Y.; NAKADA, Y.; LAMBERT, G.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. **Journal of Controlled Release**, vol. 53, p. 137-143, 1998.

FATTAL, E.; DE ROSA, G.; BOCHOT, A. Gel and solid matrix systems for the controlled delivery of drug carrier-associated nucleic acids. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 277, p. 25-30, 2004.

FICHOU, Y.; FÉREC, C. The potential of oligonucleotides for therapeutic applications. **Trends in Biotechnology**, vol. 24, n. 12, p. 563-570, 2006.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3ª. Ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003. 732 p.

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

FÖGER, F.; NOONPAKDEE, W.; LORETZ, B. JOOJUNTR, S.; SALVENMOSER, W.; THALER, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Inhibition of malarial topoisomerase II in *Plasmodium falciparum* by antisense nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 319, p. 139–146, 2006.

FRAGA, M. **Complexação de pDNA com nanoemulsões catiônicas: estudos de formulação e toxicidade em células Hep G2**. 90 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

FRAGA, M.; LAUX, M.; ZANDONÁ, B.; SANTOS, G. R.; GIUBERTI, C. S.; OLIVEIRA, M. C.; MATTE, U.; TEIXEIRA, H. F. Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol. 18, n. 2, p. 1-6, 2008.

---

---

GANTA, S.; PAXTON, J. W.; BAGULEY, B. C.; GARG, S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 360, p. 115–121, 2008.

GRIFFITH, K. S.; LEWIS, L. S.; MALI, S.; PARISE, M. E. Treatment of Malaria in the United States, A Systematic Review. **The Journal of the American Medical Association**, vol. 297, n. 20, p. 2264-2277, 2007.

GUO, C.; GEMEINHART, R. A. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 70, p. 597–604, 2008.

HAGIGIT, T.; NASSAR, T.; BEHAR-COHEN, F.; LAMBERT, G.; BENITA, S. The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic nanoemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 70, p. 248–259, 2008.

HAN, J.; WASHINGTON, C. Partition of antimicrobial additives in an intravenous emulsion and their effect on emulsion physical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 288, p. 263–271, 2005.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron systems via optical Methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 87, n. 2, p. 125-129, 1998.

HINZ, C. Description of sorption data with isotherm equations. **Geoderma**, vol. 99, p. 225–243, 2001.

HUGHES, M. D.; HUSSAIN, M.; NAWAZ, Q.; SAYYED, P.; AKHTAR, S. The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. **Drug Discovery Today**, vol. 6, n. 6, p. 303-315, 2001.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. IFPMA, Switzerland. 2005.

ISHII, F.; SASAKI, I.; OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 42, p. 513-515, 1990.

JAASKELAINEN, I.; URTTI, A. Cell membranes as barriers for the use of antisense therapeutic agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 2, n. 4, p. 307-318, 2002.

JAMES-SMITH, M. A.; ALFORD, K.; SHAH, D. O. A novel method to quantify the amount of surfactant at the oil/water interface and to determine total interfacial area of emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 310, p. 590–598, 2007.

JUMAA, M.; MÜLLER B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 163, p. 81-89, 1998.

---

- 
- JUMAA, M.; MÜLLER B. W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 183, p. 175-184, 1999.
- JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. Development of a novel parenteral formulation for tetrazepam using a lipid emulsion. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol. 27, n. 10, p. 1115-1121, 2001.
- JURKIEWICZ, P.; OKRUSZEK, A.; HOF, M.; LANGNER, M. Associating oligonucleotides with positively charged liposomes. **Cellular & Molecular Biology Letters**, vol. 8, p. 77-84, 2003.
- KABANOV, A. V. Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 58, p. 1597–1621, 2006.
- KANAGARATNAM, R.; MISIURA, K.; REBOWSKI, G.; RAMASAMY, R. Malaria merozoite surface protein antisense oligodeoxynucleotides lack antisense activity but function as polyanions to inhibit red cell invasion. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 30, p. 979-985, 1998.
- KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 342, p. 231-239, 2007.
- KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as *in vitro* and *in vivo* transfection agents. **Pharmaceutical Research**, vol. 18, n. 1, p. 54-60, 2001.
- KIM, T. W.; KIM, Y. J.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer. **Journal of Controlled Release**, vol. 82, p. 455-465, 2002.
- KIM, Y. J.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; KWON, I. C.; SUNG, H. C.; JEONG, S. Y. The effects of serum on the stability and the transfection activity of the cationic lipid emulsion with various oils. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 252, p. 241-252, 2003.
- KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. (Ed.). **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam: OPA, 1998. p. 119-152.
- KLANG, S. H.; PARNAS, M.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers – possibilities, limitations and future perspectives. In: MÜLLER, R. H.; BENITA, S.; BÖHM, B. (Ed) **Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs**. Stuttgart: Medpharm Scientific, 1998. p. 31-64.
- KRIEG, A. M.; STEIN, C. A. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or antiprotein? **Antisense Research and Development**, vol. 5, p. 241, 1995.
- LAMBERT, G.; FATTAL, E.; COUVREUR, P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 47, p. 99-112, 2001.
-

- LAPPALAINEN, K.; URTTI, A.; SÖDERLING, E.; JÄÄSKELÄINEN, I.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1196, p. 201-208, 1994.
- LI, L. C.; TIAN, Y. Zeta potential. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 3096.
- LI, J.; NIE, S.; YANG, X.; WANG, C.; CUI, S.; PAN, W. Optimization of tocol emulsions for the intravenous delivery of clarithromycin. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 356, p. 282–290, 2008.
- LIANG, E.; AJMANI, P. S.; HUGHES, J. A. Oligonucleotide delivery: a cellular prospective. **Pharmazie**, vol. 54, p. 559-566, 1999.
- LOBO, A.; CAMBIELLA, A.; BENITO, J. M.; PAZOS, C.; COCA, J. Ultrafiltration of oil-in-water emulsions with ceramic membranes: Influence of pH and crossflow velocity. **Journal of Membrane Science**, vol. 278, p. 328–334, 2006.
- MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 94 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.
- MARTINI, E., CARVALHO, E., TEIXEIRA, H., LEÃO, F., OLIVEIRA, M. C. Adsorção de Oligonucleotídeos em Nanoemulsões obtidas por Emulsificação Espontânea. **Química Nova**, vol. 30, n. 4, p. 930-934, 2007.
- MARTINI, E.; FATTAL, E.; OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 352, p. 280–286, 2008.
- MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O. I.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, vol. 150, p. 552–558, 2007.
- MIN, K. A.; LEE, S. K.; KIM, C. -K. Improved gene expression pattern using Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid and cationic emulsion. **Biomaterials**, vol. 26, p. 1063-070, 2005.
- MÖNKKÖNEN, J.; URTTI, A. Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 34, p. 37-49, 1998.
- MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.
-

---

NADAVALA, S. K.; SWAYAMPAKULA, K.; BODDU, V. M.; ABBURI, K. Biosorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads. **Journal of Hazardous Materials**, 2008. No prelo.

NETZ, P. A.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 299 p.

NOONPAKDEE, W.; POTHIKASIKORN, J.; NIMITSANTIWONG, W.; WILAIRAT, P. Inhibition of Plasmodium falciparum proliferation in vitro by antisense oligodeoxynucleotides against malarial topoisomerase II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 302, p. 659–664, 2003.

OEHLKE, K.; GARAMUS, V. M.; HEINS, A.; STÖCKMANN, H.; SCHWARZ, K. The partitioning of emulsifiers in o/w emulsions: A comparative study of SANS, ultrafiltration and dialysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 322, p. 294–303, 2008.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Informe sobre el paludismo en el mundo**. EUA, 2005. Disponível em <[http://rbm.who.int/wmr2005/pdf/adv\\_sp.pdf](http://rbm.who.int/wmr2005/pdf/adv_sp.pdf)>. Acesso em 01/04/2007.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva, 2006. Disponível em <<http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>>. Acesso em 29/07/2008.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Malaria**. Fact Sheet N° 94, 2007. Disponível em <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>>. Acesso em 30/09/2008.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **World Malaria Report 2008**. Geneva, 2008. Disponível em <<http://www.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>>. Acesso em 26/09/2008.

OPALINSKA, J. B.; GEWIRTZ, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. **Nature Publishing Group**, vol. 1, p. 503-514, 2002.

OTT, G.; SINGH, M.; KAZAZ, J.; BRIONES, M.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; O'HAGAN, D. T. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. **Journal of Controlled Release**, vol. 79, p. 1-5, 2002.

PAL, R. A novel method to correlate emulsion viscosity data. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 137, p. 275-286, 1998.

PERRY, H.; CHILTON, C. H. (Ed) **Manual de engenharia química**. 5ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1986.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

---

---

PINO, G. A. H. **Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*)**. 113 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em <[http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/db2www/PRG\\_0651.D2W/SHOW?Cont=7596:pt&Mat=&Sys=&Nr=&Fun=&CdLinPrg=pt](http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/db2www/PRG_0651.D2W/SHOW?Cont=7596:pt&Mat=&Sys=&Nr=&Fun=&CdLinPrg=pt)>. Acesso em 18/09/2008.

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; GOLDSTEIN, D.; BENITA, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 131, p. 1-13, 2004.

RABINOVICH-GUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K.; LAMBERT, G.; COUVREUR, P.; CHAMINADE, P. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 61, p. 69–76, 2005.

RAMASAMY, R.; KANAGARATNAM, R.; MISIURA, K.; REBOWSKI, G.; AMERAKOON, R.; STEC, W. J. Anti-sense oligodeoxynucleoside phosphorothioates nonspecifically inhibit invasion of red blood cells by malaria parasites. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, vol. 218, p. 930–933, 1996.

RAPAPORT, E.; MISIURA, K.; AGRAWAL, S.; ZAMECNIK, P. Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 89, p. 8577-8580, 1992.

RBMP. Roll Back Malaria Partnership. **Brazil – Country profile**. 2005. Disponível em <<http://www.rbm.who.int/wmr2005/profiles/brazil.pdf>>. Acesso em 17/07/2008.

RBMP. Roll Back Malaria Partnership. **The Global Malaria Action Plan**. 2008. Disponível em <<http://www.rollbackmalaria.org/gmap/index.html>>. Acesso em 02/10/08.

RINGOT, D.; LERZY, B.; CHAPLAIN, K.; BONHOURE, J.; AUCLAIR, E.; LARONDELLE, Y. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. **Bioresource Technology**, vol. 98, p. 1812–1821, 2007.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 263, p. 85-94, 2003.

RUXIN, J.; PALUZZI, J. E.; WILSON, P. A.; TOZAN, Y.; KRUK, M.; TEKLEHAIMANOT, A. Emerging consensus in HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and access to essential medicines. **Lancet**, vol. 365, p. 618–21, 2005.

SARTORIUS, C.; FRANKLIN, R. M. Hybridization arrest of the cell-free translation of the malarial dihydrofolate reductase/thymidylate synthase mRNA by anti-sense oligodeoxyribonucleotides. **Nucleic Acids Research**, vol. 19, n. 7, p. 1613-1618, 1991.

---



---

SENIOR, J. H.; TRIMBLE, K. R.; MASKIEWICZ, R. Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1070, p. 173-179, 1991.

SILVA, C. A.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, vol. 25, p. 17-21, 2006.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAEISSON, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions--effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 252, p. 123-132, 2003.

SINKO, P.J. (Ed) **Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences**. 5<sup>a</sup>. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 795 p.

STAHEL, R. A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy - an overview. **Lung Cancer**, vol. 41, n. 1, p. S81-S88, 2003.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 108-109, p. 303-318, 2004.

TARAHOVSKY, T. S.; KHUSAINOVA, R. S.; GORELOV, A. V.; NICOLAEVA, T. I.; DEEV, A. A.; DAWSON, A. K.; IVANITSKY, V. R. DNA initiates polymorphic structural transitions in lecithin. **FEBBS Letters**, vol. 390, n. 2, p. 133-136, 1996.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, vol. 16, n. 1, p. 30-36, 1999.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; DEVERRE, J. R.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Factors influences the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. **Journal of Controlled Release**, vol. 70, p. 243-255, 2001a.

TEIXEIRA, H.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; LEPAULT, J.; ERK, I; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. Characterization of oligonucleotide / lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. **Biophysical Chemistry**, vol. 92, p. 169-181, 2001b.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICH, L.; BOUTET, T.; DEVERRE, J. R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. **Journal of Controlled Release**, vol. 89, n. 3, p. 473-482, 2003.

TIAN, Y.; LI, L. C. Light-scattering method in particle size analysis of parenteral emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, vol. 24, n. 3, p. 275-280, 1998.

---

---

TOUB, N.; MALVY, C.; FATTAL, E.; COUVREUR, P. Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 60, p. 607–620, 2006.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Jr. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: Malária. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 803-822.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, vol. 279, p. 784-792, 2001.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 258, p. 135-45, 2003.

UNGARO, F.; DE ROSA, G.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 31, p. 143-149, 2003.

URBAN, E.; NOE, C. R. Structural modifications of antisense oligonucleotídeos. **II Farmaco**, vol. 58, p. 243-258, 2003.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

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

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, vol. 26, p. 266–291, 2008.

WANIDWORANUN, C.; NAGEL, R. L.; SHEAR, H. L. Antisense oligonucleotides targeting malarial aldolase inhibit the asexual erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 102, p. 91–101, 1999.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 20, p.131-145, 1996.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WESNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 209-218, 2002.

YI, S. W.; YUNE, T. Y.; KIM, T. W.; CHUNG, H.; CHOI, Y. W.; KWON, I. C.; LEE, E. B.; JEONG, S. Y. A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serumresistant gene delivery system. **Pharmaceutical Research**, vol. 17, n. 3, p. 314-20, 2000.

---

---

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E. S.; BARRAT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 89, p. 139-146, 1993.

ZELPHATI, O.; SZOKA, F. C. Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotide: a real or magic bullet? **Journal of Controlled Release**, vol. 41, p. 99-119, 1996.

---