

Avaliação Projeto

Alunos (as): Ana Luísa Bigliassi Alporti; Bruno Vieira Felix da Silva; Felipe Santos Furlaneto; Gabriel Henrique Savietto; Isabela Wada Ferreira Pinto.

(Grupo 3, Turma A)

Título: Nanoencapsulamento da equinocandina Anidulafungina para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas em indivíduos adultos

Nota: 8,6

- Cada grupo irá entregar um trabalho escrito de no máximo 12 páginas contendo:
 1. Resumo (1 página);
 2. Introdução (máximo de 2-3 páginas);
 3. Métodos utilizados (descrevendo as massas pesadas, equipamentos, vidrarias, etc.);
 4. Resultados e discussão;
 5. Potencial aplicação da nanoestrutura indicando um produto que poderá ser obtido com essa nanoestrutura; **não indicou**
 6. Conclusão;
 7. Referências (Letra Times New Roman, 12, espaçamento 1,5).

Resumo	Clareza e objetividade; uso correto dos conceitos; resumo adequado ao relatório do projeto; capacidade de síntese sem perda de informações.	(1,5 pontos) Resumo adequado. Faltou falar do fármaco e da técnica usada para a caracterização das partículas (1,3)
Introdução	Embasamento teórico; contextualização; problematização; atualidade, originalidade e relevância.	(1,5 pontos) Adequado. Senti falta da explicação do pq escolheram lipossoma e sobre as características do fármaco (1,3)
Métodos	Clareza e objetividade; descrição correta dos procedimentos; coerência dos métodos com o intuito do projeto.	(2,0 pontos) Não descreveram as massas pesadas e não mencionaram a técnica usada para caracterização (1,8)
Resultados e discussão	Capacidade de comunicação;	(2,0 pontos)

	articulação; clareza e objetividade; concordância com o problema e os objetivos.	Não compararam com outros trabalhos, não discutiram sobre as características do fármaco. (1,8)
Potencial da nanoestrutura	Conhecimento da aplicação; referências adequadas.	(1,0 ponto) O tópico foi apresentado mas pareceu mais uma conclusão. Poderiam ter comentado mais sobre a liberação do ativo da estrutura, as vantagens dessa formulação, outros estudos que seriam necessários para aplicação proposta (0,5)
Conclusão	Clareza, objetividade, concordância com os objetivos.	(1,0 ponto) Concorda com os objetivos, resume os principais resultados. (1,0)
Referências	Organização, formatação; referências correspondem às citadas no texto.	(0,5 ponto) Referências não padronizadas (0,4)
Adequação à estrutura do documento	Formatação do documento; estrutura (resumo, introdução, métodos, resultados e discussão, conclusões, referências); número de páginas.	(0,5 ponto) Adequado (0,5).

Total: 8,6

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo



**Nanoencapsulamento da equinocandina Anidulafungina para o tratamento de infecções
fúngicas sistêmicas em indivíduos adultos**

Grupo:

Ana Luísa Bigliassi Alponi (11297131)

Bruno Vieira Felix da Silva (11787235)

Felipe Santos Furlaneto (11786787)

Gabriel Henrique Savietto (11787169)

Isabela Wada Ferreira Pinto (10782836)

Ribeirão Preto

2023

RESUMO

Lipossomas são estruturas nanométricas constituídas por bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de fármacos, sendo útil no tratamento de doenças. No Brasil, verifica-se que um grande número de indivíduos sofreram algum tipo de infecção fúngica sistêmica e há gastos consideráveis para esse tratamento, devido ao caráter crônico dessas infecções, demandando longos períodos de tratamento, além de características dos fármacos que dificultam a biodisponibilidade e eficácia do tratamento. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi buscar uma maneira eficaz de produzir um lipossoma que contenha Anidulafungina para aumentar a adesão e eficácia do tratamento para infecções fúngicas sistêmicas. A técnica utilizada foi a hidratação do filme lipídico com uso de técnicas de *top-down*, como a sonicação. Antes da sonicação, obteve-se um resultado com um índice de polidispersão (Pdl) de 0,311; tamanho médio (*Z-average*) de 950,8 nm e potencial zeta de -57,8 mV. Depois de sonicar um minuto obteve-se Pdl de 0,251, tamanho médio de 182,4 nm e potencial zeta de -57,7 mV, porém não suficientes para as devidas finalidades. Na segunda tentativa antes de sonicar o Pdl foi de 0,466, tamanho médio de 828,7 nm e potencial zeta de -66,3 mV, retratando partículas grandes e pouco homogêneas. Depois de sonicar por dois minutos tiveram partículas menores e mais homogêneas, com tamanho médio (*Z-average*) de 131,6 nm, Pdl 0,228 e potencial zeta de -52,2. Os resultados promissores, no fim da segunda tentativa, mostram o potencial do procedimento empregado e abrem possibilidades para trabalhos futuros sobre o tema.

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas, também chamadas genericamente de micoses, podem ocorrer nos mais diversos ambientes. Segundo Marcio Lourenço Rodrigues, pesquisador do Instituto Carlos Chagas, estes microrganismos estão presentes em todo o ambiente de natureza: árvores, solo e fezes de alguns animais (como pombos e gatos). Dentre as infecções fúngicas, uma delas é mais preocupante, a micose sistêmica; que pode acometer diversos sistemas: nervoso, digestivo, respiratório e circulatório. Estas infecções, no entanto, estão mais associadas a um momento de fragilidade do sistema imunológico, como em pacientes que fazem uso de imunossupressores, ou que estejam acometidos de outras condições.

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, no ano de 2016 foi estimado que mais de 3 milhões de pacientes sofreram com algum tipo de infecção fúngica importante (sistêmica), além disso estimou-se que o valor gasto por paciente poderia superar 250 mil reais. Nos Estados Unidos uma infecção fúngica específica se apresenta na 4^o posição de causa de infecção na corrente sanguínea, a *Candida spp*.

As equinocandinas representam uma classe de medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Dentro desta classe, um dos fármacos considerados para primeira linha de tratamento é a Anidulafungina. O mecanismo de ação desta classe de medicamentos consiste na inibição de uma enzima presente em células fúngicas (e não mamíferas), levando à inibição da formação de um importante constituinte da estrutura da parede celular do fungo, que resulta em fragilidade osmótica (por conta da perda de integridade da parede), levando a um efeito fungicida (CORTÉS, et al. 2011). Embora o alvo terapêutico (inibição da β -(1,3) d-glucana sintetase) seja seletivo e os efeitos tóxicos ao ser humano tendem a ser mínimo, o uso do medicamento é realizado por via intravenosa uma vez ao dia, desta maneira, o paciente há de se deslocar para receber seu tratamento (ou há de ser internado em alguns casos).

O crescente aumento de infecções fúngicas relacionado ao também crescente aumento na resistência de antifúngicos traz a necessidade de buscar novos tratamentos e/ou trabalhar com tratamentos com maior aderência dos pacientes (VIEIRA, et al. 2017), que sejam eficazes e que não sejam tão custosos para os sistemas de saúde. Uma alternativa é encapsular o fármaco em lipossomas, que são vesículas aquosas envoltas por uma bicamada lipídica, que podem ser utilizadas como carreadores de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos (Lasic, 1998).

Desta maneira, a presente pesquisa buscou uma maneira de desenvolver um lipossoma carreador de fármaco, cujo diâmetro almejado é de até 150 nm para que possa fornecer ao paciente um estoque maior de medicamento sem necessitar receber a dose intravenosa uma vez ao dia, aumentando a aderência ao tratamento e um tratamento com maior segurança.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa busca uma maneira eficaz de produzir um lipossoma que contenha como princípio ativo a Anidulafungina, e cujo diâmetro máximo seja de 150 nm. Em etapas futuras será avaliado a PEGlação do lipossoma, de maneira que o mesmo tenha maior permanência no organismo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Primeira tentativa

- Fosfatidilcolina de soja
- Colesterol
- Clorofórmio
- Etanol
- Água Mili-Q
- Provetas volumétricas (10 mL e 50 mL)
- Balão de vidro para rotaevaporação
- Rotaevaporador
- Sonicador
- Balança analítica
- Espátulas

Procedimento experimental

Os lipossomas foram preparados utilizando o método de hidratação do fino filme lipídico. Para o procedimento, foram adicionados os lipídeos, fosfatidilcolina (120 mg) e colesterol (15 mg), e os solventes orgânicos clorofórmio (10 mL) e etanol (2 mL) no balão de rotaevaporação e com uma leve agitação os lipídeos foram solubilizados. Após a solubilização, a solução foi submetida ao rotaevaporador (condições de 60°C em 70 rpm) para retirar todo o solvente orgânico, criando um filme fino lipídico na parede do balão.

O filme apresentou um aspecto úmido por conta das condições de rota-evaporação e a quantidade de etanol (solvente mais polar com um alto ponto de evaporação) usada no procedimento para simular a solubilização do fármaco. A fase contendo o filme lipídico foi ressuspensa com 30 mL de água Mili-Q.

Os lipossomas multilamelares foram submetidos ao processo de sonicação de 85 W por 1 minuto sem pulso para diminuir o tamanho das partículas.

b. Segunda tentativa

- Fosfatidilcolina de soja
- Colesterol
- Clorofórmio
- Etanol
- Água Mili-Q
- Provetas volumétricas (10 mL e 50 mL)
- Balão de vidro para rotaevaporação
- Rotaevaporador
- Sonicador
- Balança analítica
- Espátulas

Procedimento experimental

Os lipossomas foram preparados utilizando o método de hidratação do fino filme lipídico. As etapas para a preparação dessa forma farmacéutica foram similares a primeira tentativa, sendo adicionados no balão os lipídios, em mesma quantidade, (fosfatidilcolina 120 mg e colesterol 15 mg) e os solventes orgânicos clorofórmio (10 mL) e uma quantidade reduzida de etanol (1 mL). Com leve agitação os lipídeos foram solubilizados.

Após a solubilização, a solução foi submetida ao rotaevaporador (condições de 70°C e 80 rpm) para retirar todo o solvente orgânico, criando um filme fino lipídico na parede do balão, porém, com aspecto mais seco em comparação com a tentativa anterior. A fase obtida do rotaevaporador foi ressuspensa com 30 mL de água Mili-Q.

Os lipossomas multilamelares foram submetidos ao processo de sonicação de 85 W por 2 minutos sem pulso para diminuir o tamanho das partículas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeira tentativa

A primeira tentativa gerou um resultado promissor mas que demonstrou a necessidade de melhorias futuras. Ao se analisar o aspecto visual do filme fino lipídico, observou-se que não foi possível retirar todo o solvente utilizado após rotaevaporar visto o seu aspecto úmido nas paredes do balão, sendo provavelmente derivado do uso de um solvente orgânico de difícil evaporação como o etanol.

Com a dispersão lipossomal pronta, colheu-se uma alíquota para a realização da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e medição do potencial zeta para análises posteriores.

Através da técnica de DLS, foi possível observar que a nanopartícula lipossomal apresentou um índice de polidispersão (Pdl) de 0,311, sendo esse valor muito próximo ao da faixa adequada (0,08 - 0,3) e indicando a presença de uma população com baixa polidispersão, ou seja, uma população de nanopartículas lipossomais homogêneas em relação ao seu tamanho e que irá gerar menos efeitos biológicos nocivos ao organismo do paciente (BADRAN, 2014). Além disso, o lipossoma apresentou um tamanho médio (*Z-average*) de 951 nm, sendo esse valor muito elevado para as finalidades terapêuticas (administração intravenosa) e, assim, necessário realizar uma técnica para reduzir seu tamanho após o seu preparo. Dessa forma, optou-se por realizar uma técnica *top-down*, sendo a sonicação o método escolhido.

Comparando-se os resultados da técnica de DLS antes e após sonicar, é notável que o tamanho do lipossoma diminuiu de 951 nm para 182 nm, indicando que a técnica *top-down* foi efetiva ao seu propósito e será incorporada ao procedimento de preparo da formulação. Além disso, o Pdl também apresentou uma melhora (0,311 para 0,251) o que pode indicar que além de reduzir o tamanho do lipossoma, a sonicação também ajudou a ter nanopartículas mais homogêneas. A diferença entre os valores pode ser visualizada nas Figuras 1 e 2.

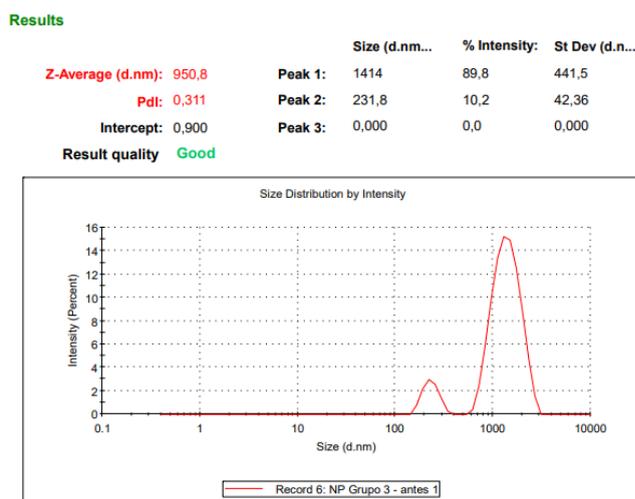


Figura 1. Resultados do experimento de espalhamento dinâmico de luz obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C antes de sonicar. Em vermelho estão destacados o valor do tamanho médio (*Z-average*) das nanopartículas e o índice de polidispersão (Pdl).

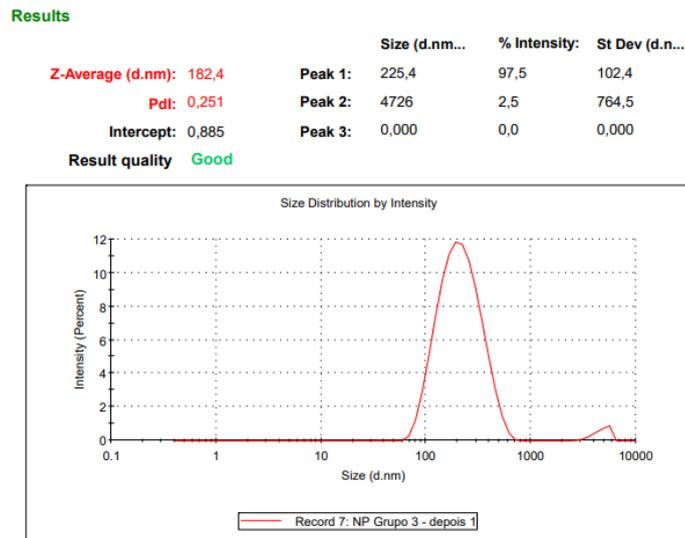


Figura 2. Resultados do experimento de espalhamento dinâmico de luz obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C depois de sonicar. Em vermelho estão destacados o valor do tamanho médio (*Z-average*) das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI).

O potencial zeta é uma medida (em mV) que reflete a carga superficial da nanopartícula, sendo possível determinar os mecanismos de estabilidade envolvidos, como por exemplo se a nanopartícula apresenta estabilidade elétrica (estabilidade por carga) ou estabilidade eletroestérica.

Os resultados obtidos para o experimento de potencial zeta apresentaram valores de -57,8 mV, antes de sonicar o produto e -57,7 mV após sonicar o produto. Desta forma, nota-se que não houve mudanças significativas no potencial zeta da nanopartícula após a homogeneização. Além disso, sabe-se da literatura que a estabilidade elétrica de nanopartículas é dada quando o valor de potencial zeta, em módulo, é maior que 30 mV (LOWRY, et al. 2016). Dessa forma, verificando as figuras 3 e 4, nota-se que os lipossomas apresentaram valores maiores (em módulo) que 30 mV e, assim, pode-se dizer que apresentam estabilidade elétrica.

A análise de tais figuras permite ainda observar que antes da sonicação (**Figura 3**), a base da curva do gráfico Contagem Total x Potencial Zeta Aparente se apresenta mais larga em comparação às partículas após sonicação (**Figura 4**), tal processo indica que, apesar de apresentarem valores muito próximos de Potencial Zeta, as partículas após sonicação são mais uniformes.

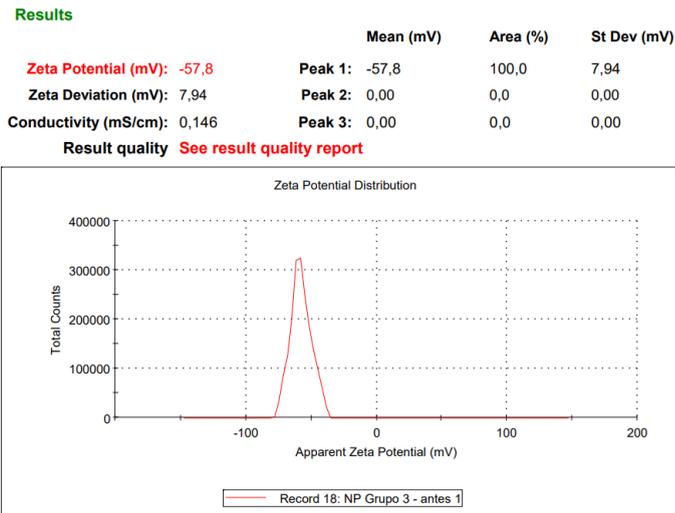


Figura 3. Resultado do experimento de potencial zeta obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C antes de sonicar. Em vermelho está destacado o valor do potencial zeta em mV das nanopartículas.

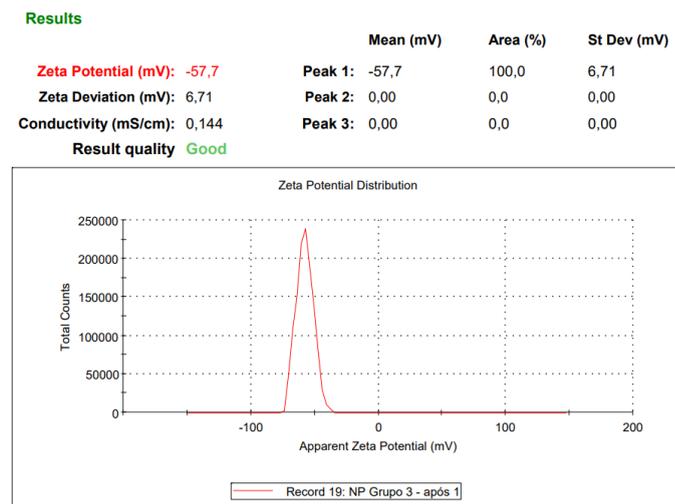


Figura 4. Resultado do experimento de potencial zeta obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C depois de sonicar. Em vermelho está destacado o valor de potencial zeta em mV das nanopartículas.

4.2 Segunda tentativa

Visando melhorar alguns aspectos relacionados à formação do filme fino lipídico e ao tamanho final dos lipossomas, utilizou-se um volume menor de etanol (solvente necessário para solubilizar o fármaco) e aumentou-se o tempo na etapa de sonicação do produto.

Optou-se por utilizar apenas 1 mL de etanol para solubilizar o fármaco e após rotaevaporar, foi possível observar a formação do filme fino lipídico mais homogêneo

nas paredes do balão, como pode ser observado na Figura 5 (indicado pela seta). Esse resultado evidencia que o novo preparo do lipossoma através da redução do volume de etanol foi bem sucedido.



Figura 5. Foto demonstrativa do filme fino lipídico observado após a evaporação dos solventes na segunda tentativa.

Para comparar o novo resultado com a primeira tentativa, foi realizada a medição do potencial zeta, do tamanho da nanopartícula e do índice de polidispersão. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 6 e 7.

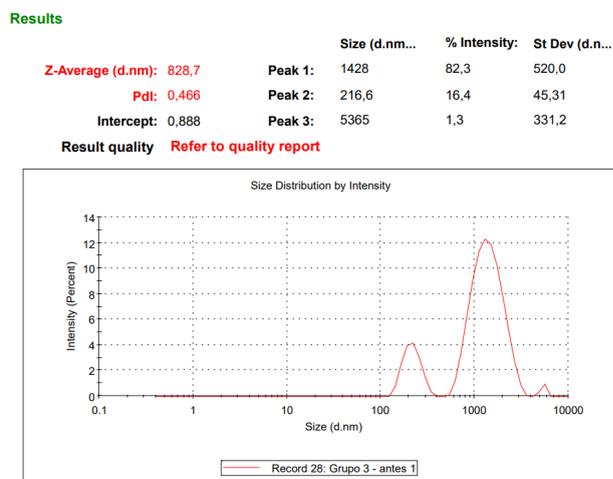


Figura 6. Resultados do experimento de espalhamento dinâmico de luz obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C antes de sonicar. Em vermelho estão destacados o valor do tamanho médio (*Z-average*) das nanopartículas e o índice de polidispersão (Pdl).

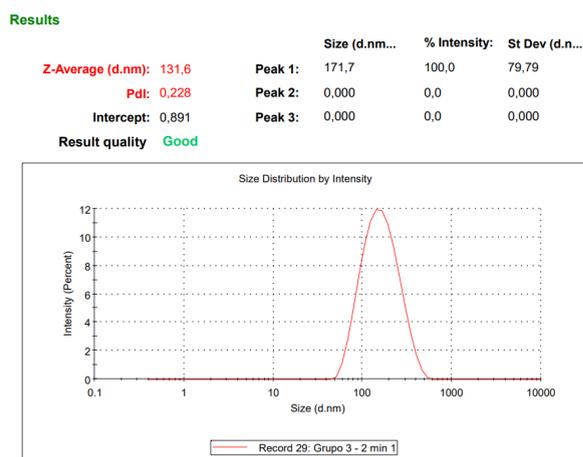


Figura 7. Resultados do experimento de espalhamento dinâmico de luz obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C depois de sonicar. Em vermelho estão destacados o valor do tamanho médio (*Z-average*) das nanopartículas e o índice de polidispersão (PdI).

O lipossoma gerado apresentou um tamanho de 828,7 nm e após sonicar por 2 minutos apresentou um tamanho de 131,6 nm. Essa redução significativa demonstra que os parâmetros utilizados no sonicador são os ideais para obter um lipossoma com tamanho adequado para a administração intravenosa. Além disso, as novas condições resultaram em uma leve redução do PdI mas que ainda está dentro da faixa de baixa polidispersão, indicando que esse parâmetro não se altera negativamente pelo aumento do tempo no sonicador.

A alteração no volume de etanol e o tempo do sonicador não impactaram significativamente os valores de potencial zeta antes e após sonicar, pois eles permanecem maiores que 30 mV em módulo, como demonstrado nas Figuras 8 e 9.

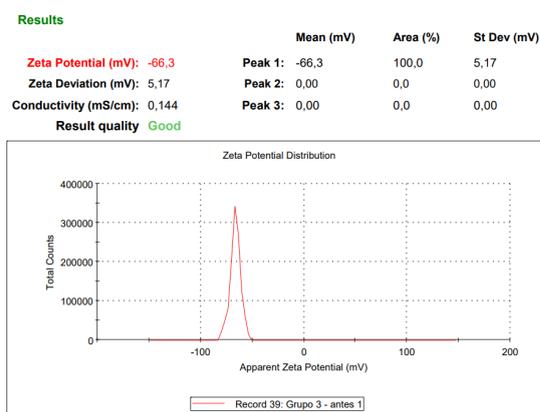


Figura 8. Resultado do experimento de potencial zeta obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C antes de sonicar. Em vermelho está destacado o valor do potencial zeta em mV das nanopartículas.

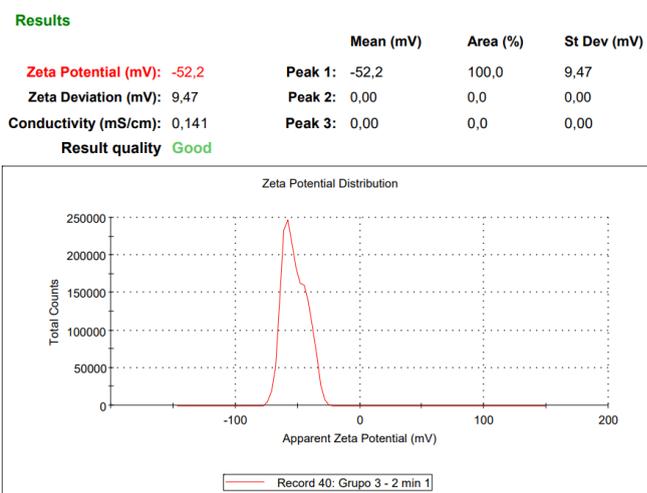


Figura 9. Resultado do experimento de potencial zeta obtido para a dispersão de lipossomas em água a 25 °C depois de sonicar. Em vermelho está destacado o valor do potencial zeta em mV das nanopartículas.

4.3 Comparando as tentativas

Através da visualização das dispersões geradas pela primeira e segunda tentativa, é possível notar diferenças que podem ser visualizadas pela Figura 10. A amostra 10-A refere-se a dispersão lipossomal gerada na primeira tentativa e sem sonicar, sendo possível observar um aspecto mais esbranquiçado o que indica a presença de nanopartículas maiores. 10-B refere-se a dispersão lipossomal da segunda tentativa e sem sonicar, já 10-C indica a dispersão da segunda tentativa após sonicar 2 minutos. Observa-se que a dispersão 10-C apresenta uma coloração mais transparente devido a presença de nanopartículas com diâmetro reduzido (gerado através da sonicação do produto).



Figura 10. Comparação do aspecto visual das dispersões de lipossomas antes e após sonicar. Em 10-A está evidenciada a dispersão da primeira tentativa antes de sonicar, em 10-B a dispersão da segunda tentativa sem sonicar e 10-C a dispersão da segunda tentativa após sonicar.

Além disso, as diferenças dos tamanhos das partículas geradas pelas tentativas podem ser visualizadas ao incidir um feixe de laser sobre as dispersões. Sabe-se que as

partículas são capazes de espalhar luz, existindo uma relação entre o tamanho das partículas presentes no meio com a dispersão da luz incidida. Mais especificamente, partículas menores dispersam menos a luz incidida, enquanto partículas maiores dispersam mais.

Assim, analisando a Figura 11 é possível observar que a dispersão 11-A (1ª tentativa sem sonicar) apresenta uma dispersão da luz do laser maior (solução com meio mais avermelhado) quando comparada com a dispersão 11-B (1ª tentativa e sonicando por 1 minuto), pois a mesma apresenta partículas de tamanhos maiores, como indicado pelo *Z-average* de 951 nm.

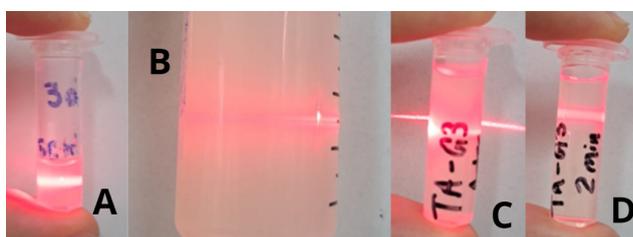


Figura 11. Comparação da dispersão da luz de um feixe incidido nas dispersões de lipossomas obtidas. Em 11-A está destacada a dispersão da primeira tentativa sem sonicar, em 11-B a dispersão da primeira tentativa após sonicar, em 11-C a dispersão da segunda tentativa antes de sonicar e em 11-D a dispersão da segunda tentativa após sonicar.

Esse efeito também pode ser observado na segunda tentativa com a dispersão 11-C (antes de sonicar) e a dispersão 11-D (após sonicar), pois é visível que 11-D dispersou menos a radiação incidida (meio menos avermelhado) do que a dispersão 11-C e isso é um efeito da redução do tamanho das partículas após o produto ser sonicado.

5. POTENCIAL APLICAÇÃO DA NANOESTRUTURA

O trabalho teve como intuito produzir um lipossoma que contenha Anidulafungina para o tratamento de infecções fúngicas, por meio da técnica de hidratação do filme lipídico e com uso da sonicação (técnica *top-down*). Na primeira tentativa, com sonicação de um minuto, teve - se um Pdl de 0,251, tamanho médio de 182,4 nm e potencial zeta de -57,7 mV, entretanto não adequadas para o objetivo. Já na segunda tentativa, após dois minutos de sonicação, o resultado foi satisfatório com partículas menores e mais homogêneas, com tamanho médio de 131,6 nm, Pdl 0,228 e potencial zeta de -52,2 mV. Dessa maneira, o lipossoma obtido poderá conter o fármaco Anidulafungina para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas via

administração intravenosa. Esse produto traz vantagens de aumentar a adesão, segurança e eficácia do tratamento.

6. CONCLUSÃO

Dada a relevância em se propor formas de aumentar a biodisponibilidade e conseqüentemente a adesão e eficiência do tratamento com antifúngicos administrados por via intravenosa, a formulação proposta foi bem sucedida na obtenção de partículas de lipossomas estáveis, homogêneos e com tamanho adequado para administração intravenosa após a sonicação na segunda tentativa, visto que o potencial zeta da partícula (-52,2mV) é maior em módulo que 30mV, o PDI de 0,228 se encontra dentro da faixa ideal de 0,08 - 0,3 e tamanho de 131,6 nm, que atende as expectativas de partículas menores que 150 nm.

Tendo em vista o presente trabalho, mostra-se grande potencial no uso dessa técnica de liberação do fármaco, se fazendo necessário estudos mais aprofundados utilizando essa abordagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, jun. 2007.

CCI/ENSP. Avanço dos fungos no Brasil: Radis alerta sobre infecções fúngicas que deixam sequelas e podem levar à morte. **Revista Radis**. Ed. 196. (2019).

CORTÉS, Jorge A ; JULY. Equinocandinas. **Revista Chilena De Infectologia**, v. 28, n. 6, p. 529–536. (2011)

FRÉDÉRIC FRÉZARD; SCHETTINI, Dante A; FERREIRA, Geralda; et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511–518. (2005)

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. D. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3. (2017)

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.16, p.307-321. (1998)

Gregory V. Lowry, Reghan J. Hill, Stacey Harper *et al.* Guidance to improve the scientific value of zeta potential measurements in nanoEHS. *Environ. Sci.: Nano.* 3, 953–965 (2016).

Mohamed B. Formulation and in vitro evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. *Digest J. Nanomater. Biostruct.* 9, 83–91(2014).

JitKang L, Swee P, Hui X, *et al.* Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters.* , 8:381 (2013).