

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO ESTÁVEL UTILIZANDO MICROFLUIDIZAÇÃO PARA APLICAÇÃO COMO ADJUVANTES EM VACINAS

Nathalia Rezende Lordão¹; Katharine Valéria Hodel²; Gabriele de Abreu Barreto³; Bruna Aparecida Souza Machado⁴

¹Bolsista; Iniciação tecnológica – CNPQ; nathalialordao@hotmail.com

²Mestranda em Farmácia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Bahia; k2hodel@gmail.com

³Mestre em Ciências dos Alimentos; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Bahia; abreugabriele@gmail.com

⁴Doutora em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Bahia; Bruna.Machado@idri.org

RESUMO

A adição de adjuvantes às vacinas aumenta e direciona a imunogenicidade dos antígenos, modulando efetivamente as respostas imunológicas apropriadas, reduzindo a sua quantidade ou número de imunizações necessárias, além de melhorar a eficácia das vacinas em diversas populações. Uma maneira de obter esses adjuvantes é através de nanoemulsões, que são produzidas pelos sistemas modernos de emulsificação através da microfluidização. Diante disso, o objetivo da pesquisa será desenvolver nanoemulsões estáveis para posterior aplicação como adjuvante em vacina. Uma formulação contendo óleo de Canola foi obtida por microfluidização e posteriormente armazenada na temperatura de 4°C. Os resultados demonstraram que através do processo de microfluidização o diâmetro das partículas reduziu significativamente em grande parte da formulação, não sofrendo alterações significativas, porém uma pequena porcentagem apresentou um tamanho acima do desejado, demonstrando que com a utilização do óleo adequado, o processo de microfluidização é eficiente e viabiliza a utilização de nanoemulsões estáveis como adjuvantes.

PALAVRAS-CHAVE: Nanotecnologia; emulsões estáveis; adjuvantes.

1. INTRODUÇÃO

As vacinas desempenham um papel importante na prevenção de doença, sendo as vacinas de subunidades consideradas a alternativa mais segura, pois não contém componentes vivos do patógeno e as que não possuem ativadores imunitários inatos intrínsecos, podem ser adicionados adjuvantes para auxiliar numa melhor resposta do sistema imunitário. A Nanoemulsão consiste em uma dispersão muito fina, composta por uma fase de óleo e uma fase aquosa com que se apresenta como gotas com diâmetro menor que 100 nm¹. O método para obtenção de nanoemulsões carreadoras de fármacos é a homogeneização à alta pressão como a microfluidização baseando-se na utilização de uma bomba que força a passagem da emulsão através de uma série de microcanais². A determinação do diâmetro de gotícula e da sua distribuição é uma análise fundamental nas nanoemulsões, os limites de diâmetro são relacionados à segurança de uso da formulação, bem como à estabilidade do sistema (cuja desestruturação é manifestada pela fusão de gotículas, levando à coalescência). Em geral, emulsões contendo os menores diâmetros (200-500 nm) tendem a ser fisicamente mais estáveis³. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões estáveis para posterior aplicação como adjuvante em vacinas. Para isso, a formulação desenvolvida foi avaliada em função do tamanho, colorimetria, análise visual, microscópica e estabilidade em diferentes condições.

2. METODOLOGIA

Preparação na nanoemulsão: fase aquosa e oleosa

A formulação F1 foi elaborada de acordo com os componentes apresentados na Tabela 1. Conforme descrito por Baldwin et al⁴. (com adaptações), inicialmente, houve a preparação da fase aquosa e da fase oleosa, através da pesagem dos componentes na balança analítica. A fase oleosa foi sonicada num banho de água sonora com VWR 75D ou 50HT (West Chester, PA) a ~ 65 °C e então combinada com a fase aquosa. Depois, houve a homogeneização da formulação no homogeneizador (OMNI – modelo GLH850).

Tabela 1. Composição da fase aquosa e oleosa da emulsão (% , m/m)

Fase aquosa		Fase oleosa	
Componentes	Quantidade	Componentes	Quantidade
Água ultrapura	96	Óleo de canola	4
Fosfato monobásico	0,7021	Alfa tocoferol	20,50735mg
Fosfato dibásico	0,043345	Lecitina de soja	0,7612
Glicerol	5,9461		
Tween 80	0,036		

Microfluidização, análise do tamanho da partícula e filtração

A emulsão foi submetida a homogeneização a alta pressão em um microfluidizador (Microfluidics M110-EH Newton) durante 10 passagens a 3000 psi e temperatura de 10°C. Após a obtenção da nanoemulsão, o diâmetro da partícula foi investigado, utilizando-se o aparelho Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Zen 3600), a uma temperatura de 20°C, 10 µg da amostra diluída em 1 ml de água deionizada disposta na cubeta DTS 1070 e posteriormente a formulação foi filtrada com o filtro de seringa 0,22 µm (PVDF Millipore®).

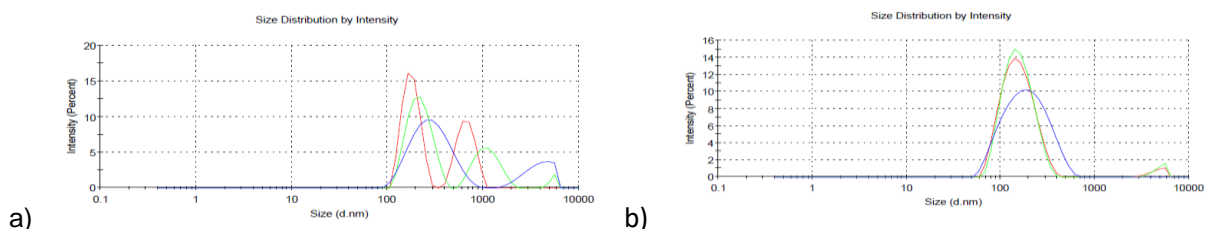
Armazenamento e pontos de análise

A emulsão foi armazenada nas temperaturas de 4° C e depois analisada em triplicata nos dias 1, 7, 15, 30, 45 e 60 depois da sua produção em relação ao tamanho de partícula, análise visual e microscópica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

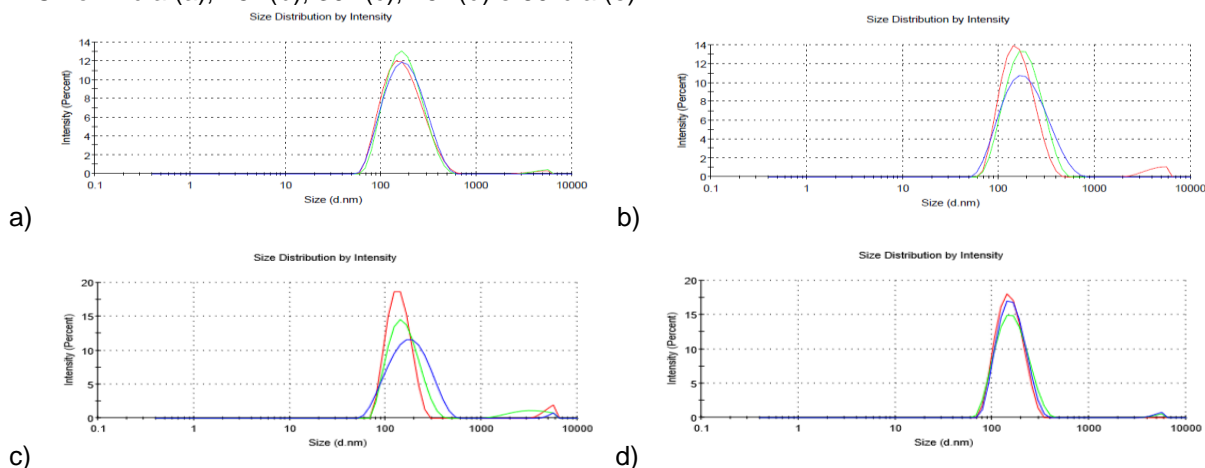
O tamanho médio e a distribuição do tamanho de partícula foram avaliados para verificar se a formulação apresenta tamanho nanométrico. Segundo Gaumet et al.⁵ o índice de polidispersão indica a distribuição de tamanho da partícula, considerando-se um bom índice de polidispersão aquele que apresenta valor inferior a 0,1 indicando partículas com elevada homogeneidade, um índice elevado sugere uma ampla distribuição do tamanho ou mesmo a existência de várias populações.⁵ As medições foram realizadas no 1º, 7º, 15º, 30º e 60º dia para verificar alterações no tamanho da partícula da nanoemulsão. A figura 1 (a) apresenta a estatística referente ao tamanho das partículas antes da passagem da formulação pelo microfluidizador, destacando-se que o diâmetro médio de partículas encontrado foi de 334,10nm e índice de polidispersão de 0,5, indicando uma distribuição multimodal polidispersa. Após a microfluidização e filtração foi analisado em triplicata o tamanho de partícula da nanoemulsão de óleo de Canola, representado pela figura 1 (b). As partículas apresentaram um valor médio de 155,5 nm e índice de dispersão 0,2.

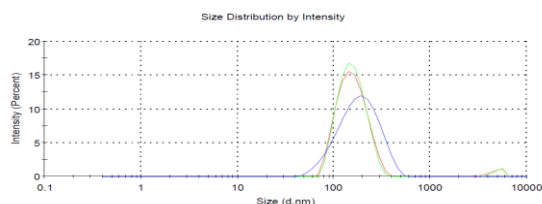
Figura 1 - Distribuição de Tamanho por Intensidade das partículas da nanoemulsão do óleo de canola antes da microfluidização (a) e após microfluidização/ filtração (b).



A figura 2 representa a formulação armazenada a 4°C que foi caracterizada em relação ao tamanho de partícula no 7º, 15º, 30º, 45º e 60º dia, apresentando médias de 160,83 nm; 161,60 nm; 156,63 nm; 150,77 e 155,07 respectivamente, com índice de polidispersão variando de 0,178; 0,195; 0,222; 0,150 e 0,1

Figura 2 - Distribuição de Tamanho por Intensidade das nanopartículas da nanoemulsão do óleo de Canola a 4°C no 7º dia (a), 15º (b), 30º (c), 45º (d) e 60º dia (e).

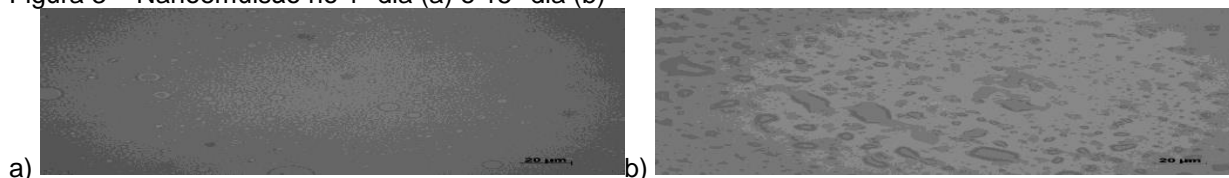




e)

Antes do processo de microfluidização a formulação obteve valores de diâmetro de partícula superiores a 300nm, indicando uma distribuição polidispersa, polimodal. De acordo com Constantinides et al.⁶ partículas com tamanho menor que 200nm tendem a ser mais estáveis, após a microfluidização os tamanhos de partículas nas diversas temperaturas se apresentaram abaixo de 200 nm, porém observou-se uma pequena porcentagem de partículas superiores a 1000 nm, tal fato pode ser devido a elevada concentração de partículas nessa amostra ou fatores de agregação, isso demonstra que algumas partículas ficaram em tamanho micrométrico ao invés de nanométrico. O índice de dispersão indica partículas com relativa homogeneidade de tamanho, sendo demonstradas essas variações no gráfico. Apesar das nanoemulsões serem cineticamente estáveis, a determinação da estabilidade a longo prazo de uma emulsão pode ser um desafio, devido a formação de uma barreira mecânica entre as gotículas de óleo e a fase aquosa e as forças de repulsão eletrostática entre as gotículas.⁷ Date et al.⁷ relata que quando uma destas forças é rompida, a tendência final do sistema é separar completamente a fase oleosa da aquosa, com estágios de instabilização: floculação, cremagem e coalescência, sendo os dois primeiros reversíveis. As análises microscópicas foram realizadas para observar esses processos, sendo possível visualizar um estágio inicial de coalescência.

Figura 3 – Nanoemulsão no 1º dia (a) e 15º dia (b)



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo de canola apresentou bons resultados na redução do tamanho de partícula, mais de 90% de sua partículas apresentaram tamanho nanométrico, porém uma pequena concentração permaneceu em tamanho superior a 1000 nm. Visualmente com o passar dos dias, as gotículas de óleo sofreram um processo de coalescência o que não é desejado, indicando a necessidade de utilização de outro óleo com características adequadas. Além desta formulação, outras onze serão realizadas com diferentes surfactantes, fosfatidilcolinas e o óleo de esqualeno, no qual espera-se obter excelentes resultados, pois o emprego do esqualeno na fase oleosa forma nanoemulsões estáveis com pequenos diâmetros de gotículas.

Agradecimentos

Ao SENAI CIMETAC pela estrutura laboratorial e ao CNPQ pela concessão da bolsa.

5. REFERÊNCIAS

- ¹SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, Oxford, v. 108-109, p. 145-149, 2004.
- ²DATE, A.; A. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.
- ³JUMAA, 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**, v. 163, n. 1-2, p. 81-89, 1998.
- ⁴BALDWIN, S. L. et al. Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone® adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5956-5963, 2009.
- ⁵GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ⁶CONSTANTINIDES, P. P.; TUSTIAN, A.; KESSLER, D. R. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 9, p. 1243-1255, 2004.
- ⁷DATE, A. A. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.