

PRODUÇÃO DE NANOEMULSÕES ADJUVANTES ESTÁVEIS CONTENDO QS-21 E ÓLEOS VEGETAIS A PARTIR DA TÉCNICA DE MICROFLUIDIZAÇÃO

Fabricia Oliveira Oliveira¹; Danielle Devequi Gomes Nunes²; Larissa Moraes dos Santos Fonseca³; Gabriele de Abreu Barreto⁴; Katharine Valeria Saraiva Hodel⁵; Bruna Aparecida Machado Souza⁶

¹ Mestre em Biotecnologia; DIT 3A – FAPESB; fabriciaoliveira6@gmail.com

² Mestre em Patologia Humana e Experimental; danielledevequinunes@gmail.com

³ Mestre em Microbiologia, larimfonseca@gmail.com

⁴ Mestre em Ciência dos Alimentos; gabriele.barreto@fieb.org.br

⁵ Mestranda em Farmácia; k2hodel@gmail.com

⁶ Doutora em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

RESUMO

Introdução. O QS-21 é uma saponina extraída da casca da árvore sul-americana *Quillaja saponaria*. É um bioativo conhecido por sua capacidade de ativação do sistema imunológico, caracterizando assim sua potencial utilização como adjuvante em vacinas de subunidades. **Materiais e Métodos.** Para melhor biodisponibilizar esse princípio ativo, o objetivo deste trabalho foi o de produzir nanoemulsões estáveis a partir da utilização de óleo vegetais para a incorporação do QS-21 por meio da técnica de microfluidização; e avaliação da estabilidade das formulações ao longo do tempo quanto ao diâmetro de partícula, índice de polidispersão, pH e análise visual. **Resultados esperados.** Os resultados obtidos apontaram melhores estabilidades para os óleos de oliva, semente de uva e abacate quanto aos parâmetros avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: nanoemulsão; QS-21; microfluidização; adjuvante.

1. INTRODUÇÃO

As vacinas de subunidades são opções modernas de vacinas e oferecem a vantagem da não utilização do patógeno vivo inteiro, sendo assim consideradas opções mais seguras frente as vacinas tradicionais. No entanto, devido a essa característica esse tipo de vacina não possui adjuvantes imunogênico naturais, necessitando da co-administração de um imunoadjuvante.¹ Dentre os potenciais bioativos candidatos está o QS-21, bioativo extraído da casca da árvore sul-americana *Quillaja saponaria*², que representa uma classe de potentes adjuvantes por sua capacidade de estimular a resposta imunológica Th1 e a produção de linfócitos T citotóxicos contra agentes exógenos.³ O meio no qual esse adjuvante é formulado influencia diretamente em sua biodisponibilidade e eficiência. A nanoemulsão é um sistema de encapsulamento a base de lipídios, composta por fase oleosa e aquosa estabilizadas pelo uso de um surfactante e co-surfactante adequados, sendo considerada uma tecnologia promissora empregada na entrega e liberação de compostos bioativos.⁴ As nanoemulsões do tipo O/A são aquelas que possuem núcleo oleoso e oferecem várias vantagens, especialmente a de serem os sistemas mais indicados para o carregamento de fármacos hidrofílicos e lipofílicos simultaneamente, característica do QS-21.⁵ A técnica de encapsulamento também influencia diretamente na estabilidade dos sistemas produzidos. A microfluidização vem recentemente sendo aplicada no desenvolvimento de nanoemulsões, conseguindo aprimorar a estabilidade e a biodisponibilidade do bioativo.⁶ Dessa forma, o objetivo deste estudo foi produzir nanoemulsões estáveis a partir da técnica de microfluidização e avaliar a estabilidade quanto aos óleos vegetais utilizados em relação ao diâmetro de partícula, índice de polidispersão, pH e análise visual.

2. METODOLOGIA

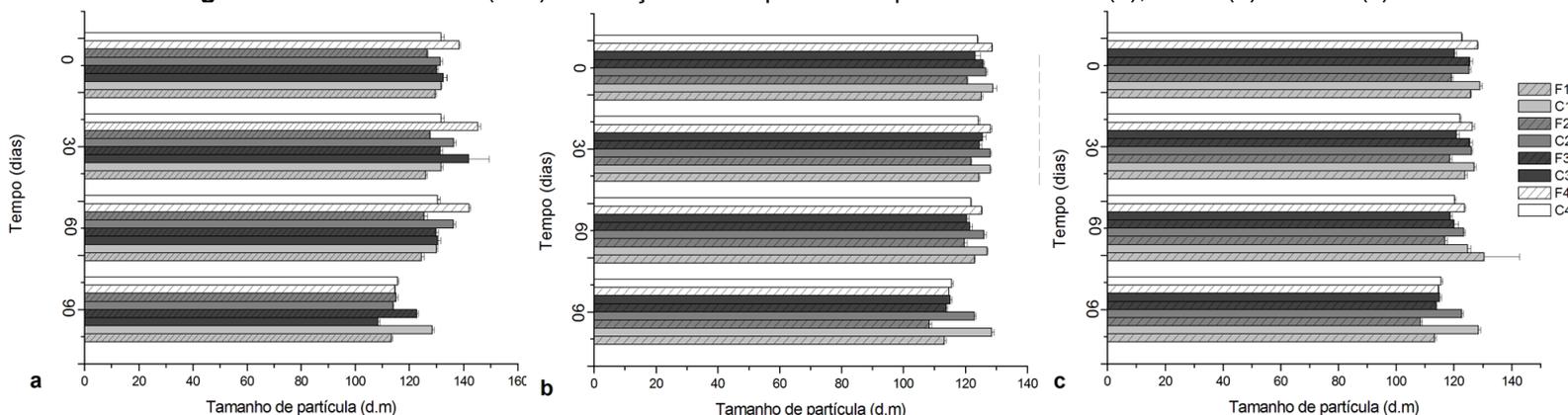
A fase oleosa consistiu de óleos naturais, fosfatidilcolina (PC) de soja e o princípio ativo QS-21. No total foram preparadas 8 emulsões, 4 contendo o princípio ativo (F) e 4 formulações controle – sem PA (C), onde para F1 e C1 foi utilizado óleo de coco, F2 e C2 óleo de oliva, F3 e C3 óleo de semente de uva e F4 e C4 óleo de abacate, todos na concentração de 4%. Para a fase aquosa foi utilizado tampão aquoso NHPO₄/Glicerol. O QS-21 e o óleo foi sonicado durante 5 min a 60°C em banho ultrassônico. Após esse tempo foi adicionado o PC e sonicado por mais 30 min. Em outro béquer foi adicionado 0,072 g do emulsificante poloxamer 188 a 192 mL de tampão, que foi adicionado ao béquer contendo a fase oleosa (após o término da sonicação), formando assim um volume final de 200 mL para cada emulsão. A mistura foi então homogeneizada durante 15 min a uma velocidade de 10.000 rpm. As emulsões foram então submetidas ao processo de microfluidização por um período de 15 minutos e 23 segundos, na pressão de 30.000 psi à uma temperatura de 4-10°C, para redução do tamanho de partícula. As nanoemulsões foram filtradas (filtro 0,22 µm) e armazenadas nas temperaturas de 4°C, 25°C e 40°C por um período de 90 dias, sendo analisadas no tempo 0 e a cada 30 dias quanto ao tamanho de partícula

(d.m), índice de polidispersão (Pdl) e pH. O diâmetro médio e Pdl foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico-DLS, no equipamento Zetasizer NanoZS. As medições foram realizadas a 25°C, utilizando 10 µL da amostra diluída em 1 mL de água deionizada, disposta na cubeta DTS 1070 do Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Zen 3600, Reino Unido). A análise de pH foi realizada utilizando o pHmetro da Mettler Toledo, FiveEasy Plus, calibrado com os padrões 4,01 e 7,00. A análise visual foi realizada por meio de inspeção manual seguindo parâmetros de análise de separação de fases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, as partículas podem sofrer diversas alterações que podem ser físicas, químicas e/ou biológicas. Fisicamente, elas podem sofrer agregação, fusão ou ruptura e essas ações dependem da constituição lipídica, bem como do meio envolvente.⁷ Quanto ao tamanho de partícula, na **Figura 1** estão demonstrados os resultados obtidos em relação ao diâmetro médio (d.m) onde na temperatura de 4°C, a nanoemulsão F2 apresentou estabilidade após o período de 30 dias com média de 128,8 nm de diâmetro ao longo do período avaliado; já F1 e F3 se tornaram estáveis apenas após 60 dias, com médias 123,36 e 129,44 nm, respectivamente. Na temperatura de 25°C, F3 e F4 apresentaram estabilidade apenas após 60 dias; e na temperatura de 40 °C, apenas F1 se mostrou estável ao longo do tempo, mantendo um diâmetro médio de 123,35 nm; já F3 se tornou estável apenas após 60 dias. Em estudo utilizando um extrato de saponinas e óleos minerais, foi observado que os diâmetros médios e Pdl se mantiveram dentro faixa aceitável para o uso das nanoemulsões como soluções adjuvantes⁸, assim como os resultados desse estudo.

Figura 1. Diâmetro médio (d.m) em função do tempo nas temperaturas de 4 °C (a), 25 °C (b) e 40 °C (c).



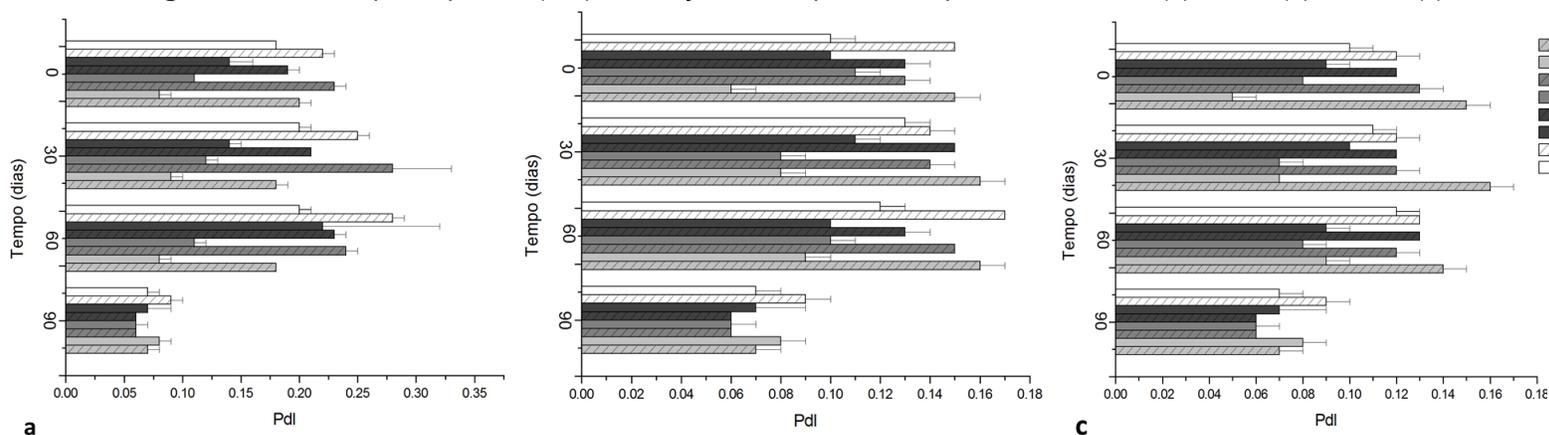
Quanto ao Pdl, as nanoemulsões apresentaram variações de 0,06 a 0,28, na temperatura de 4 °C, 0,06 a 0,16, a 25 °C, e 0,05 a 0,16, a 40 °C. Os resultados obtidos, dispostos na **Figura 2**, mostraram boas respostas quanto ao Pdl das amostras, estando próximos ao valor numérico de 0,0 que caracteriza uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de partículas.⁹ Índices menores que 0,2 são ideais por representarem que a distribuição do diâmetro de partículas se encontra em uma faixa estreita, o que indica homogeneidade das partículas em suspensão, o que leva a uma boa distribuição e liberação adequada dessas partículas na formulação.¹⁰ Dentre as nanoemulsões produzidas, F1, F2 e F3 foram as que mantiveram o índice estável do 30º ao 90º dia, em todas as temperaturas avaliadas.

Os resultados quanto ao pH demonstraram que nas temperaturas de 4 °C e 25 °C houve manutenção do pH, sem alterações significativas, ao longo do período analisado, porém na temperatura de 40 °C houve redução do pH das nanoemulsões, indicando a ocorrência de reações químicas que levaram a degradação de ácidos graxos dos óleos vegetais¹¹, o que também foi observado em outros estudos^{11,12}. O monitoramento do valor de pH é importante para determinar a estabilidade das nanoemulsões, já que as alterações de pH indicam a ocorrência de reações químicas que possam comprometer a qualidade do produto final.

De maneira geral, nenhuma nanoemulsão produzida sofreu separação de fases, porém apresentaram alteração na coloração, especialmente na temperatura de 40 °C. Nessa temperatura também foi observada a liberação de um forte odor. Dentre as formulações, F1 (óleo de coco) mostrou maior alteração, enquanto F4 (óleo de abacate) mostrou menor alteração.

Para propiciar melhores resultados, o processo de microfluidização pode ser melhor adaptado quanto ao número de passagens das nanoemulsões no equipamento, para que assim sejam obtidos menores tamanhos de partícula formados e conseqüentemente melhor estabilidade do diâmetro e Pdl das amostras ao longo do período avaliado, principalmente para não influenciar na biodisponibilidade do princípio ativo QS21.

Figura 2. Índice de polidispersão (Pdl) em função do tempo nas temperaturas de 4 °C (a), 25 °C (b) e 40 °C (c).



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É válido concluir que especialmente os óleos de oliva (F2), semente de uva (F3) e abacate (F4), foram eficazes na estabilização do QS-21, indicando a eficiência da técnica de microfluidização. As temperaturas de 4 °C e 25 °C permitiram melhor desempenho quanto aos parâmetros avaliados, diferente da temperatura de 40 °C que levou a degradação dos compostos e alteração no pH. As propriedades avaliadas são importantes na produção de carreadores lipídicos, pois afetam diretamente na meia-vida ou vida de prateleira da formulação, dessa forma, os resultados obtidos permitem a escolha de formulações para ensaios futuros, como liberação e absorção, além de indicar a possibilidade de mais pesquisas sobre a utilização desses óleos na produção de formulações adjuvantes, frente aos óleos sintéticos utilizados.

Agradecimentos

À Fapesb e minha orientadora pela oportunidade e a toda equipe do Laboratório de Formulações Farmacêuticas.

5. REFERÊNCIAS

- ¹VAN DER LANN, Jan Willem; GOULD, Sarah; TANIR, Jennifer; ILSI HESI Vaccines and Adjuvants Safety Project Committee. Safety of vaccine adjuvants: Focus on autoimmunity. **Vaccine**, n. 7, v. 3, p. 1507-1514, mar. 2015.
- ²KENSIL, Cr; KAMMER, Robert. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 2, p. 431-437, jan. 1991.
- LACAILLE-DUBOIS, Marie-Aleth. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. **Phytomedicine**, v. 60: 152905, jul. 2019.
- ⁵MOZAFARI, Marcel. Liposomes: An overview of manufacturing techniques. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 4, p. 711-719, 2005.
- ⁶GURPREET, Kaur; SINGH, Sudheer. Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 781-789, jul. 2018.
- ⁷SHIN, Kyounghee. *et al.* Nanoemulsion Vehicles as Carriers for Follicular Delivery of Luteolin. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 5, p. 1723-1729, apr. 2018.
- ⁸HARWANSH, Ranjit; DESHMUKH, Rohitas; RAHMAN, Md. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 224-233, mar. 2019.
- ⁹BURAKOVA, Yulia; MADERA, Rachel; WANG, Lihua; BUIST, Sterling. Food-Grade Saponin Extract as an Emulsifier and Immunostimulant in Emulsion-Based Subunit Vaccine for Pigs. **Journal of Immunology Research**, v. 1, n. 2, p. 1-8, nov. 2018.
- ¹⁰DANAEI, Marzieh. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, pii: E57, may 2018.
- ¹¹MORAES, Carolina Morales. Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais. 2009. 118p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2009.
- ¹²BERNARDI, Daniela; PEREIRA, Tatiana; MACIEL, Naira; BORTOLOTO, Josiane. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 44, p. 44, sep. 2011.