

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Mariana Domingues Bianchin

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS INOVADORES E
AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE NA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
PEDIÁTRICA PELA VEICULAÇÃO DO FÁRMACO INDINAVIR**

Porto Alegre

2018

Mariana Domingues Bianchin

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS INOVADORES E
AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE NA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
PEDIÁTRICA PELA VEICULAÇÃO DO FÁRMACO INDINAVIR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Coorientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre

2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, em nível de Doutorado Acadêmico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17 de setembro de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Vidor Contri
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Dr. Luiz Alberto Kanis
Universidade do Sul de Santa Catarina

CIP - Catalogação na Publicação

Bianchin, Mariana Domingues
Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados inovadores e avaliação da aplicabilidade na terapia antirretroviral pediátrica pela veiculação do fármaco indinavir / Mariana Domingues Bianchin. -- 2018.
233 f.
Orientadora: Irene Cledes Kulkamp-Guerreiro.

Coorientadora: Bibiana Verlindo de Araújo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Sistemas de distribuição de fármacos. 2. Nanoestruturas. 3. Terapia antirretroviral. 4. Indinavir. 5. Pediatria. I. Kulkamp-Guerreiro, Irene Cledes, orient. II. de Araújo, Bibiana Verlindo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICO

Aos meus pais Nelson e Gislaine,
à minha irmã Eduarda e
ao meu companheiro Lucas.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro, pela excelente orientação, ensinamentos, dedicação, motivação, apoio e amizade.

À professora Dra. Bibiana Verlindo de Araújo, pela coorientação nos experimentos de farmacocinética.

Às professoras Dra. Adriana Raffin Pohlmann e Dra. Silvia Guterres, por concederem equipamentos necessários na realização deste trabalho.

À professora Dra. Fernanda Poletto, pela colaboração, auxílio e importantes contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pelos ensinamentos concedidos.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa.

Ao bolsista Germano Prebianca, pelo convívio, amizade, apoio e auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Cosmética Aplicada, Helissara Diefenthaeler, Simone Berlitz, Samuel Davies, Mosiele Giaretta, Marina Guedes e Morgana Marques, pela amizade, incentivo e momentos de descontração compartilhados.

Ao meu companheiro Lucas, pelo amor, companheirismo, apoio, motivação e paciência.

À minha irmã Eduarda, pela amizade, carinho, incentivo e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus pais Nelson e Gislaine, principais responsáveis por esta conquista, por nunca terem medido esforços para que eu conquistasse meus objetivos, pelo amor incondicional, confiança depositada e dedicação constante.

A Deus, por ter me concedido a benção de ter alcançado mais esta conquista.

RESUMO

A incorporação de compostos biologicamente ativos em sistemas nanoestruturados promovem vantagens relacionadas à liberação controlada, proteção da degradação, potencialização da solubilidade e da estabilidade, podendo resultar em benefícios terapêuticos como redução da toxicidade, da frequência de doses e dos efeitos adversos, melhora da farmacocinética e do índice terapêutico. Alguns sistemas baseados em lipídios e polímeros têm sido propostos com diferentes propriedades. No entanto, desvantagens relacionadas principalmente a integridade estrutural e a capacidade de incorporação de compostos biologicamente ativos são destacadas. Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados inovadores e avaliar a aplicabilidade destes na terapia antirretroviral pediátrica através da veiculação do fármaco indinavir. Deste modo, dois sistemas nanoestruturados inovadores foram desenvolvidos, denominados de niossomas baseados em monooleína e anfissomas. Os niossomas baseados em monooleína compreendem estruturas vesiculares biocompatíveis com tamanho nanométrico, distribuição de tamanho unimodal, potencial zeta negativo e pH neutro. O indinavir foi incorporado nos niossomas baseados em monooleína com alta eficiência, apresentando perfil de liberação sustentada e o sabor amargo mascarado. Os anfissomas são sistemas nanoestruturados com um design estrutural único formado por um núcleo polimérico catiônico envolto por uma camada lipídica anfifílica. Este sistema consiste de estrutura globular biocompatível com tamanho nanométrico, distribuição de tamanho unimodal, potencial zeta negativo, pH neutro, capacidade mucoadesiva e ausência de toxicidade aguda e subcrônica. O principal diferencial dos anfissomas compreende a capacidade inédita de incorporação de compostos ativos hidrofílicos e hidrofóbicos em elevada eficiência e liberação sustentada. Além disso também promoveu o mascaramento do sabor amargo do indinavir. Assim, os sistemas nanoestruturados inovadores representam estratégias terapêuticas com grande potencial para promoção da adesão a terapia antirretroviral pediátrica.

Palavras-chave: Sistemas de distribuição de fármacos. Nanoestruturas. Terapia antirretroviral. Indinavir. Pediatria. Sabor.

ABSTRACT

The incorporation of biologically active compounds in nanostructured systems provides advantages related to controlled release, protection of degradation, potentiation of solubility and stability, and may result in therapeutic benefits such as reduction of toxicity, frequency of doses and adverse effects, improvement of pharmacokinetics and therapeutic index. Some systems based on lipids and polymers have been proposed with different properties. However, disadvantages related primarily to structural integrity and the incorporation capacity of biologically active compounds are highlighted. The aim of this study was to develop innovative nanostructured systems and to evaluate their applicability in pediatric antiretroviral therapy through the delivery of the drug indinavir. Thus, two novel nanostructured systems have been developed, called monoolein-based niosomes and anfisomes. Monoolein-based niosomes comprise biocompatible vesicular structures with nanometric size, unimodal size distribution, negative zeta potential and neutral pH. Indinavir was incorporated into monoolein-based niosomes with high efficiency, exhibiting sustained release profile and masked bitter taste. Anfisomes are nanostructured systems with a unique structural design formed by a cationic polymeric core surrounded by an amphiphilic lipid layer. This system consists of biocompatible globular structure with nanometric size, unimodal size distribution, negative zeta potential, neutral pH, mucoadhesive capacity and absence of acute and subchronic toxicity. The main differential of anfisomes includes the ability to incorporate hydrophilic and hydrophobic active compounds with high efficiency and promote sustained release profile. In addition, it also promoted the masking of the bitter taste of indinavir. Thus, the innovative nanostructured systems represent therapeutic strategies with great potential for promoting adherence to pediatric antiretroviral therapy.

Keywords: Drug delivery systems. Nanostructures. Antiretroviral therapy. Indinavir. Pediatrics. Taste.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura do HIV.....	23
Figura 2 – Ciclo de vida do HIV.....	24
Figura 3 – Número estimado de pessoas vivendo com HIV no período de 1990-2017 no mundo e no Brasil.....	25
Figura 4 – Mecanismo de ação dos fármacos antirretrovirais no ciclo de vida do HIV.....	28
Figura 5 – Estrutura química do indinavir.....	30
Figura 6 – Lipossoma.....	31
Figura 7 – Niossoma.....	32
Figura 8 – Cubossoma.....	33
Figura 9 – Nanocápsulas e nanoesferas.....	34
Figura 10 – Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas.....	35
Figura 11 – Vantagens da nanotecnologia na veiculação de fármacos antirretrovirais.....	36

CAPÍTULO I

Figure 1 – Experimental SAXS data (black dots) of (a) NI and (b) NI _{IDV} , and data fitted to the broad peak model (red line).....	59
Figure 2 – Particle size (D[4,3]) by volume (a) and by number (d), particle size distribution (Span) by volume (b) and by number (e), zeta potential (c), pH (f), mean diameter (Z-average) (g), polydispersity index (PDI) (h), and IDV content (i) of NI (circle) and NI _{IDV} (square) stored at 4 °C (dotted line) or 25 °C (solid line) for 30 days.....	60
Figure 3 – IDV release profile of NI _{IDV} and SOL _{IDV} in simulated gastric fluid.....	61
Figure 4 – Irritation score for 0.1 M NaOH (o), 0.9% NaCl (●), NI (x), NI _{IDV} (■), and SOL _{IDV} (◆).....	63
Figure 5 – Radar graph of NI _{IDV} (solid line) and SOL _{IDV} (dotted line) sensory test results.....	64

CAPÍTULO II

Figura 1 – Imagem de MET dos anfissomas.....	100
Figura 2 – Imagem de microscopia óptica sob luz polarizada dos anfissomas contendo sulfato de indinavir (a) e solução de sulfato de indinavir.....	100
Figura 3 – SAXS dos anfissomas (amostra 1) e anfissomas contendo sulfato de indinavir (amostra 2).....	100
Figura 4 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do sulfato de indinavir da solução (SOL) e dos anfissomas (ANF _{IND}) em meios simulados gástrico (a) e intestinal (b).....	101

CAPÍTULO III

Figure 1 – Size distribution profile of ANF by laser diffraction in terms of volume (dotted line) and number (continuous line) (a) and by dynamic light scattering (b).....	121
Figure 2 – TEM images of the ANF.....	122
Figure 3 – Thermograms of Eudragit RS 100 (a), monoolein (b), physical mixture of Eudragit RS 100 and monoolein (c) and ANF (d).....	123
Figure 4 – Experimental SAXS data (black dots) of ANF and the fitting to the broad peak model (red line).....	123
Figure 5 – Particle mean size by volume (a) and number (d), Span by volume (b) and number (e), zeta potential (c), pH (f), Z-average size (g) and PDI (h) of ANF stored at refrigerated (dotted line) and room (solid line) temperature for 30 days.....	124
Figure 6 – Size distributions profiles of ANF, ANF _{IDV} and ANF _{SQV} by laser diffraction in terms of volume and number.....	125
Figure 7 – IDV release profiles of ANF _{IDV} in SGF medium at 4 °C and 37 °C.....	126
Figure 8 – Cytotoxicity of ANF in human T lymphocytes	128
Figure 9 – Irritation score of ANF (circle), control negative (full square) and control positive (empty square).....	129
Figure 10 – Body weight of mice of treated group (blue circle) and control group (black square) during subchronic toxicity study.....	130
Figure 11 – Water and food consumption for treated group (blue) and control group (black) during subchronic toxicity study.....	131

Figure 12 – Relative weight of the organs of the treated group (blue) and control group (black) during subchronic toxicity study.....	132
---	-----

CAPÍTULO IV

Figure 1 – TEM images of the ANF _{IDV}	156
Figure 2 – Thermograms of IDV (a) and ANF _{IDV} (b).....	157
Figure 3 – Experimental SAXS data (black dots) of ANF _{IDV} and the fitting to the broad peak model (red line).....	157
Figure 4 – Particle mean size by volume (a) and number (d), Span by volume (b) and number (e), zeta potential (c), pH (f), Z-average size (g), PDI (h) and IDV content (i) of ANF _{IDV} stored at refrigerated temperature until 30 days.....	159
Figure 5 – IDV release profiles of ANF _{IDV} and SOL _{IDV} in SGF (a) and SIF (b) medium.....	160
Figure 6 – Sensory panel of ANF _{IDV} (pink line) and SOL _{IDV} (red line).....	161

CAPÍTULO V

Figure 1 – Chemical structure of indinavir.....	174
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 – Volume-based (v) and number-based (n) particle size (D[4,3]) and particle size distribution (Span) of monoolein-based niosomes, measured using laser diffraction.....	56
Table 2 – Mean diameter (Z-average) and polydispersity index (PDI) by dynamic light scattering, zeta potential, and pH of monoolein-based niosomes.....	57
Table 3 – Sensory evaluation of NI _{IDV} and SOL _{IDV}	64

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Caracterização físico-química dos anfissomas.....	91
--	----

CAPÍTULO III

Table 1 – Particle size and size distribution values by laser diffraction in terms of volume and number of anfissomes.....	125
Table 2 – Hematological parameters after subchronic toxicity study.....	132

CAPÍTULO IV

Table 1 – Sensory panel evaluation of ANF _{IDV} and SOL _{IDV}	161
---	-----

CAPÍTULO V

Table 1 – Pharmacokinetic parameters obtained after intravenous administration of SOL _{IDV} in rats calculated by two-compartmental analysis.....	178
--	-----

APÊNDICE A

Tabela 1 – Composição das nanocápsulas de núcleo lipídico.....	208
Tabela 2 – Composição das nanocápsulas.....	209
Tabela 3 – Tamanho de partícula (D[4,3]) e distribuição de tamanho de partícula (Span) expressos por volume (v) e número (n) analisados por difração de laser.....	209

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF: Anfissomas

ANF_{IDV}: Anfissomas contendo sulfato de indinavir (1 mg/mL)

ANF_{SQV}: Anfissomas contendo saquinavir (1 mg/mL)

IDV: Sulfato de indinavir

NI: Niossomas

NI_{IDV}: Niossomas contendo sulfato de indinavir (1 mg/mL)

SOL_{IDV}: Solução aquosa de sulfato de indinavir (1 mg/mL)

SQV: Saquinavir

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.....	23
1.1.1	Ciclo de vida.....	23
1.1.2	Dados epidemiológicos.....	25
1.1.3	Transmissão e diagnóstico.....	26
1.2	TERAPIA ANTIRRETROVIRAL.....	26
1.3	CLASSES DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRAIS.....	27
1.3.1	Inibidores da protease.....	28
1.3.1.1	Indinavir.....	29
1.4	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	30
1.4.1	Nanotecnologia na terapia antirretroviral.....	35
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3	CAPÍTULO I: Monoolein-based niosomes containing indinavir: a taste-masked pediatric drug delivery system.....	41
4	CAPÍTULO II: Relatório Descritivo de Patente de Invenção.....	73
5	CAPÍTULO III: Anfisomes: an unprecedented nanostructured amphiphilic delivery system.....	103
6	CAPÍTULO IV: A novel liquid formulation of indinavir-loading anfisomes for pediatric antiretroviral treatment.....	141
7	CAPÍTULO V: Pharmacokinetic studies of indinavir in rat plasma.....	169
8	DISCUSSÃO GERAL.....	181
9	CONCLUSÕES.....	187
	REFERÊNCIAS.....	191
	APÊNDICES.....	205
	APÊNDICE A – Estudo prévio de desenvolvimento de nanopartícula contendo IDV.....	207
	APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	211
	APÊNDICE C – Questionário de análise sensorial.....	215
	ANEXOS.....	217
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa I... 219	
	ANEXO B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa II. 225	

ANEXO C – Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais I	229
ANEXO D – Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais	
II.....	231

