

DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES UTILIZANDO COPOLÍMEROS EO/PO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FUNGICIDA

Samarah Novaes de Souza^{1*}, Luiz Henrique Catalani^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

novaessamarah@gmail.com

Resumo: Copolímeros EO/PO (polióxido de etileno/ polióxido de propileno) têm sido utilizados para preparação de microemulsões óleo em água que atuam como sistemas nanocarreadores ideais para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos. Neste estudo, microemulsões foram preparadas com copolímeros de blocos EO/PO e sorbitol EO/PO para encapsulamento do fungicida Prothioconazol, que é utilizado na agricultura para tratamento de doenças tais como a ferrugem asiática. As microemulsões foram caracterizadas através do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), apresentando raio hidrodinâmico entre $7,84 \pm 0,02$ nm e $24,01 \pm 0,44$ nm. Através dos resultados de DLS e Potencial Zeta, as microemulsões mais promissoras foram selecionadas e foi verificada a liberação sustentada de Prothioconazol, através de testes *in vitro*. Nas primeiras 50 horas, as formulações chamadas neste estudo de SR-10 e SR-14, liberaram cerca de 40% do fungicida e a formulação SR-12 liberou 60% do mesmo, enquanto o prothioconazol “livre” (fungicida solubilizado) foi liberado totalmente, durante o mesmo período. As formulações, portanto, se mostraram promissoras para serem submetidas a testes *in vivo* para verificação da bioeficácia contra doenças fúngicas que acometem culturas de soja.

Palavras-chave: *microemulsões, copolímeros EO/PO, liberação de fungicida, prothioconazol, agricultura*

DEVELOPMENT OF MICROEMULSIONS BASED ON EO/PO COPOLYMERS FOR SUSTAINED RELEASE OF FUNGICIDE

Abstract: EO/PO copolymers have been used to prepare oil-in-water microemulsions that act as nanocarrier systems for hydrophobic drugs. In this study, microemulsions were prepared with EO/PO block copolymer and EO/PO sorbitol copolymer for encapsulation of the fungicide Prothioconazole, which is used in agriculture to treat diseases such as Soybean rust. The microemulsions were characterized by DLS, presenting a hydrodynamic radius between 7.84 and 24.01. DLS and Zeta Potential results led to the most promising prototypes. For those, it was verified the sustained release of Prothioconazole. In the first 50 hours, the SR-10 and SR-14 formulations released about 40% of the fungicide and the SR-12 formulation released 60% of it, while the “free prothioconazole” (solubilized fungicide) was completely released during the same period. Therefore, the formulations showed promising results to be submitted to *in vivo* tests, to verify the bioefficacy against fungal diseases that affect soybean crops.

Keywords: *microemulsions, EO/PO copolymers, fungicide release, prothioconazole, agriculture.*

Introdução

Microemulsões óleo em água são amplamente conhecidas como sistemas nanocarreadores ideais para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos, conferindo proteção contra a degradação e controle da liberação à uma taxa ideal.

Tipicamente, as microemulsões carreadoras são compostas por óleo/solvente, surfactante, co-surfactante, fármaco/ingrediente ativo e água, sendo a incorporação do fármaco/ingrediente ativo dentro da microemulsão afetada pelo óleo escolhido, e pelos tipos de surfactante e co-surfactante utilizados (RAHDAR et al, 2019).

Para aplicações farmacêuticas os copolímeros EO/PO têm sido amplamente estudados, devido a sua disponibilidade comercial em uma ampla gama de composições, boa capacidade de

solubilização, biocompatibilidade e ao fato de serem aprovados por agências regulatórias para utilização em formulações farmacêuticas e dispositivos médicos (HEYDARI et al, 2021).

Os copolímeros podem ser constituídos de blocos de poli-óxido de etileno (PEO) hidrofílicos e blocos de poli-óxido de propileno (PPO) hidrofóbicos, dispostos em uma estrutura tri-bloco (EOx-POy-EOx) ou apresentar estrutura distinta em que um álcool ou sorbitol passa pelo processo de etoxilação e propoxilação, fazendo com que a molécula final apresente uma estrutura sorbitol-EOx-POy-EOx. Os blocos hidrofílicos e hidrofóbicos fazem com que os copolímeros sejam classificados como surfactantes, sendo adequados para estabilização de fases oleosas em soluções aquosas.

Neste projeto, os copolímeros EO/PO foram utilizados no desenvolvimento de uma microemulsão óleo em água para o encapsulamento do fungicida Protioconazol.

O Protioconazol, 2-[(2RS)-2-(1-chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-hydroxypropyl]-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione (FAO, 2021) é um fungicida de amplo espectro eficaz no controle de doenças como ferrugem asiática, manchas foliares, oídio entre outras em culturas como soja e cereais. Protioconazol atua inibindo a enzima C-14-alfa-desmetilase, que está envolvida na biossíntese de esteróis em fungos (JIMENEZ et al, 2021).

Desde a sua primeira aparição no mercado em 2004, o protioconazol tornou-se rapidamente um produto popular entre os fungicidas com ação protetora, curativa e erradicadora sendo comercializado em formulações como Emulsionáveis Concentrados e Suspensões Concentradas, devido à hidrofobicidade da molécula (Xu et al, 2021).

Até o momento, ao melhor de nosso conhecimento, microemulsões de Protioconazol não estão disponíveis comercialmente e se mostram sistemas promissores para formulação deste fungicida.

As microemulsões (ME) são formulações à base de água contendo gotículas emulsionadas cujo tamanho varia entre 0,01 e 0,05 μm , o que as tornam termodinamicamente estáveis em uma vasta gama de temperatura, apresentando maior vida útil. Além disso, a menor utilização de solvente nas microemulsões é outra vantagem apresentada por esta formulação, que possui menor impacto no meio ambiente quando comparada a Concentrados Emulsionáveis.

Dessa forma, este projeto objetiva a preparação de uma microemulsão utilizando copolímero EO/PO para encapsulamento do Protioconazol, como uma nova abordagem que garantiria não somente a solubilização do ingrediente ativo nas microgotas, mas também o aumento da sua biodisponibilidade através da liberação controlada, que será estudada em testes *in vitro*. A melhora na biodisponibilidade do ingrediente ativo, poderá resultar em maior bioeficácia contra doenças fúngicas e viabilizar uma menor utilização do fungicida em campo.

Experimental

Preparação das Microemulsões

As microemulsões foram preparadas com variação no solvente e no copolímero EO/PO utilizado, conforme Tabela 1.

Para tal, ULTRARIC PE 127 (copolímero de bloco EO/PO, Oxiteno) e SURFOM 9127 (sorbitol EO/PO, Oxiteno) foram solubilizados separadamente em água destilada a 10,5% m/m, constituindo a fase aquosa da microemulsão.

Protioconazol (HangZouh Co.) foi solubilizado a 20,0% m/m em Citrato de isopentila (SURFOM 8115, Oxiteno) e em Dihydrolevoglucosenone (Oxiteno), constituindo a fase oleosa da microemulsão.

Para as formulações SR-9 e SR-10, a fase oleosa foi diretamente adicionada à fase aquosa, sob agitação magnética a temperatura ambiente, e mantida sob agitação (800 rpm) durante uma hora para preparação de 100g de formulação final.

Para as formulações SR-11, SR-12 e SR-14, um surfactante aniônico SURFOM SC 8155 (éster fosfatado, Oxiteno) foi adicionado à fase aquosa sob agitação, e após homogeneização, a fase oleosa foi adicionada à mistura.

Outras proporções de cada fase foram testadas, porém, as concentrações reportadas abaixo levaram a microemulsões estáveis em uma ampla faixa de temperatura (5°C a 45°C).

Componentes	SR-9	SR-10	SR-11	SR-12	SR-14
ULTRARIC PE 127/ Agua 10,5% m/m	97,50		95,00		
SURFOM 9127/ Agua 10,5% m/m		97,50		95,00	92,50
Protioconazole/ Citrato de isopentila 20,0% m/m					2,50
Protioconazole/ Dihydrolevoglucosenone 20,0% m/m	2,50	2,50	2,50	2,50	
SURFOM 8155			2,50	2,50	5,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabela 1 - Composição das microemulsões



Figura 1 – Fotografias das microemulsões.

Resultados e Discussão

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

Uma vez obtidas as microemulsões, essas foram submetidas a caracterização através de Espalhamento Dinâmico de Luz (*DLS- Dynamic Light Scattering*), no equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Panalytical, no qual o raio hidrodinâmico das gotículas foi determinado, conforme tabela abaixo. As medidas foram realizadas em triplicata.

Gráficos de Intensidade e Índice de correlação estão disponíveis no Material Suplementar.

Amostra	Tamanho de partículas (nm)	Índice de Polidispersidade médio
SR-9	24,01	0,479
SR-10	12,20	0,225
SR-11	10,23	0,404
SR-12	7,30	0,189
SR-14	7,84	0,291

Tabela 2 – Resultados Tamanho de partícula DLS.

Potencial zeta

As microemulsões foram submetidas a medida de Potencial zeta para verificação da magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre partículas, visto que essa análise oferece uma importante visão sobre a estabilidade das formulações. As medidas foram realizadas em triplicata.

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Desvio padrão médio (mV)
SR-9	-4,9	65,9
SR-10	-26,8	6,1
SR-11	-9,1	46,6
SR-12	-28,9	5,4
SR-14	-17,1	10,7

Tabela 3 – Resultados Potencial zeta.

As microemulsões SR-9 e SR-10 não possuem surfactante aniônico em sua composição, e portanto a estabilização ocorre somente por impedimento estérico devido a presença do copolímero EO/PO. Os resultados de Potencial Zeta não foram considerados para estas formulações.

Já as microemulsões SR-11, SR-12 e SR-14 apresentam surfactante aniônico e são estabilizadas por efeito estero-eletrostático. Através dos valores de Potencial zeta, é possível verificar que a Formulação SR- 11 é a menos estável, apresentando o valor mais próximo de zero, dentre as três.

Liberação *in vitro*

A partir dos resultados de DLS e Potencial Zeta, as formulações SR-10, SR-12 e SR-14 foram selecionadas para verificação da liberação de Protoconazol através do método de diálise.

Resumidamente, cerca de 14 g de cada microemulsão foi colocada na bolsa de diálise (Spectra/Por7 Dialysis Membrane, MWCO 1 kD). A bolsa foi então imersa em 150 mL de água destilada.

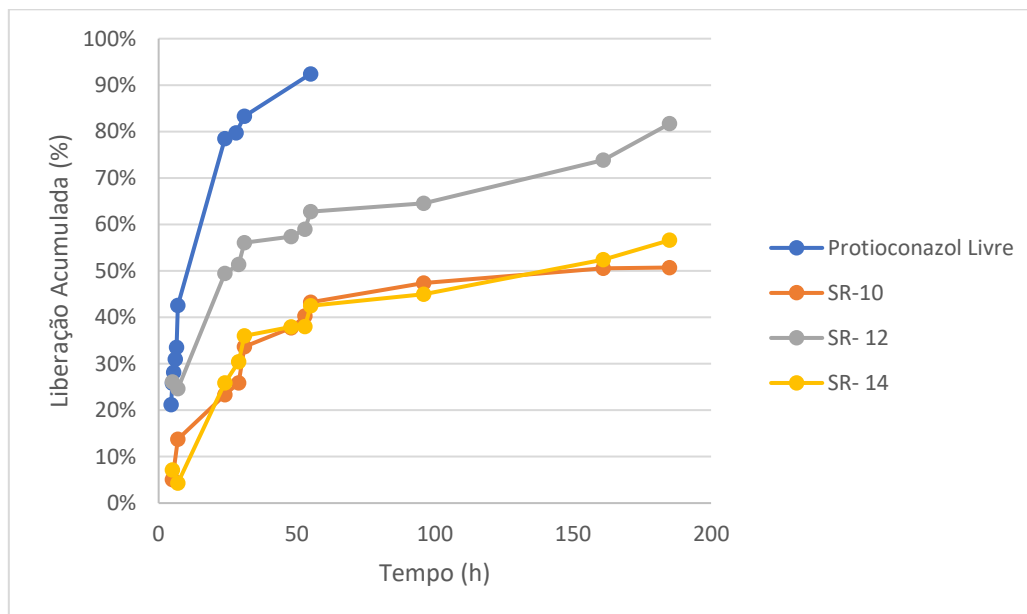
O sistema foi mantido sob agitação magnética contínua (600 rpm) a temperatura ambiente. Em intervalos de tempo específicos, uma alíquota de 1 g do meio de liberação foi retirada e substituída por 1 g de uma nova solução.

Foi adicionado 1 g de etanol a cada alíquota retirada para garantir a análise por UV-VIS, no Espectrofotômetro UV 5 da Mettler Toledo.

Utilizando uma curva de Absorbância versus Concentração previamente obtida a partir da diluição de Protioconazol em diferentes concentrações em etanol, foi possível determinar a quantidade de Protioconazol liberada.

O perfil de liberação das Microemulsões preparadas foi comparado ao perfil de liberação da formulação chamada “Protioconazol Livre”, em que o ativo protioconazol foi solubilizado em etanol, sem a presença de surfactantes. Esta formulação foi inserida na bolsa de diálise e submetida ao processo descrito anteriormente.

A Figura 2 mostra a liberação acumulada das formulações. Foi possível verificar que as microemulsões garantiram a liberação sustentada de Protioconazol. Nas primeiras 50 horas, as formulações SR-10 e SR-14 liberaram cerca de 40% do fungicida e a formulação SR-12 liberou 60% do mesmo, enquanto o protioconazol “livre” (fungicida solubilizado) foi liberado totalmente, durante o mesmo período.



Conclusões

As microemulsões preparadas apresentaram boa estabilidade e perfil de liberação sustentada, confirmando a utilização de copolímeros EO/PO para encapsulamento de ativos hidrofóbicos.

As formulações SR-10, SR12 e SR-14 serão utilizadas em testes *in vivo* para verificação da bioeficácia contra doenças fúngicas, especificamente a ferrugem asiática que acomete culturas de soja.

Agradecimentos

Agradecemos a empresa Oxiteno, pelo fornecimento de amostras e pelas instalações nas quais foram conduzidos os experimentos.

Referências

1. RAHDAR, A. et al.; *J. Mol. Liq.*, **2019**, 277, 624–630
2. HEYDARI et al.; *J. Mol. Liq.*; **2021**, 326, 115263.
3. RAHDAR, A. et al.; *J. Mol. Liq.*, **2020**, 313, 113449.
4. XU, C. et al.; *Carbohydr. Polym.*, **2021**, 262, 117933.
5. FAO, PROTHIOCONAZOLE. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 19 mai. 2021, 19:00:00
6. JIMENEZ, S et al.; *J. Chromatogr.*, **2021**, 1651, 462255.
7. OXITENO, MA-1234: *Varredura UV-VIS*
8. OXITENO, MA-1258: *Tamanho de Partículas, determinação pelo método de Espalhamento Dinâmico da Luz. Varredura*