

Estudos *in silico* e de liberação controlada de complexos de zinco-fenilpropanoides em filmes de acetato de celulose

In silico and controlled release studies of zinc-phenylpropanoid complexes in cellulose acetate films

RESUMO

Mirele Costa Neves
mirele_neve92@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Maria Vitoria De Oliveira Rodrigues
mvitoriadeoliveira1@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Adriano Lopes Romero
adrianoromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Rafaelle Bonzanini Romero
rbromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Fenilpropanoides tem sido reportado na literatura por apresentarem várias atividades biológicas e farmacológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Estudos envolvendo a complexação de produtos naturais com íons metálicos, tal como o Zn^{2+} , fornece, em muitos casos, produtos mais eficientes quando comparado aos materiais de origem. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar estudos computacionais para determinação de propriedades moleculares, farmacocinéticas e terapêuticas do ácido cinâmico, ácido 4-metóxi cinâmico e de seus complexos respectivos complexos de zinco, e a incorporação destes em filmes de acetato de celulose. Estudos computacionais indicam que os fenilpropanoides e seus complexos possuem propriedades moleculares adequadas para fármacos de administração oral, apresentam baixa tendência a metabolização e toxicidade oral aguda, apresentam boa permeação a pele. No estudo de possíveis alvos farmacológicos observou-se um potencial inibitório de enzimas associadas ao desenvolvimento de células cancerígenas. O estudo permitiu concluir que os fenilpropanoides e seus complexos possuem potencialidade para serem utilizados em sistemas de administração oral e transdérmica.

PALAVRAS-CHAVE: Estudo *in silico*. Ácido Cinâmico. Liberação transdérmica.

ABSTRACT

Phenylpropanoids have been reported in the literature for presenting various biological and pharmacological activities, such as antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor. Studies involving complexation of natural products with metal ions, such as Zn^{2+} , provides, in many cases, more efficient products when compared to source materials. In this context, this work aimed to perform computational studies to determine the molecular, pharmacokinetic and therapeutic properties of cinnamic acid, 4-methoxy cinnamic acid and their respective zinc complexes, and their incorporation in cellulose acetate films. Computational studies indicate that phenylpropanoids and their complexes have appropriate molecular properties for oral administration drugs, have a low tendency to metabolism and acute oral toxicity, have good skin permeation. In the study of possible pharmacological targets, an inhibitory potential of enzymes associated with the development of cancer cells was observed. The study concluded that phenylpropanoids and their complexes have potential to be used in oral and transdermal administration systems.

KEYWORDS: In silico study. Cinnamic acid. Transdermal release.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias com efeito terapêutico, têm sido alvo de estudo de profissionais da academia e de indústrias farmacêuticas. Esse estudo existe com o intuito de diminuir a ação de efeitos indesejáveis de fármacos comerciais. Nesse contexto, o uso de estudos computacionais é de extrema importância para determinação de propriedades moleculares, farmacocinéticas e terapêuticas de novos candidatos a fármacos.

O estudo *in silico* é estudo computacional com a proposta de fazer uma leitura das substâncias químicas, escolhidas para o estudo, onde é possível por meio de ferramentas computacionais direcionar essas substâncias para possíveis aplicações farmacológicas. O Grupo de Pesquisa em Substâncias Bioativas e Química de Materiais vem desenvolvendo diferentes sistemas carreadores de fármacos, como filmes constituídos por polímeros para liberação transdérmica e encapsulamento de fármaco por meio de micro/nanoesferas poliméricas. Pensando nisso, o estudo *in silico* consegue contribuir para o processo de avaliação de substâncias com potencial para aplicação terapêutica em sistemas de administração oral e transdérmica.

Com o intuito de melhorar algumas características como efeitos tóxicos e colaterais de fármacos comerciais desenvolveu-se a área de liberação controlada de fármacos. Tal área busca maior estabilidade nos fluidos biológicos e de armazenamento dos fármacos, manter os níveis de liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado e em locais pré-determinados, mantendo os níveis sanguíneos terapêuticos ideais.

Dentre as possibilidades de sistemas para confecção de sistemas de liberação controlada destacam-se as que se utilizam de matrizes poliméricas, que permitem o desenvolvimento de sistemas de administração oral e transdérmico devido a biodisponibilidade e biocompatibilidade que os polímeros possuem.

Estudos mostram que desde o final do século passado, algumas descobertas importantes sobre as funções do zinco para o organismo humano têm sido relatadas em todo mundo. O zinco participa como constituinte integral de proteínas ou cofator enzimático em mais de 300 reações químicas que envolvem síntese e degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (COZZOLINO, 2009). Sendo assim, utiliza-se o zinco para formar complexos que melhorem o desempenho da substância a qual foi complexada, a fim de se obter um novo candidato a fármaco com efeitos terapêuticos otimizados.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar estudos *in silico* e de liberação controlada das substâncias ácido cinâmico, ácido-4-metóxi cinâmico e seus respectivos complexos de zinco.

METODOLOGIA

Estudo *in silico*. No presente trabalho realizou-se a avaliação *in silico* das substâncias: ácido cinâmico (ACN), ácido-4-metóxi cinâmico (AMN) e dos complexos zinco-ácido cinâmico (ZnACN) e zinco-ácido-4-metóxi cinâmico (ZnAMC). As ferramentas computacionais utilizadas, todas de acesso gratuito na Internet, foram: *ChemSketch*, *Swiss Target Prediction*, *Molinspiration*, *Swiss ADME*.

Síntese dos complexos. Foi dissolvido 400 mg de hidróxido de sódio em 30 mL de água destilada, com aquecimento (~ 60°C). Para esta solução, 0,01 mol de ácido cinâmico foi adicionado com agitação constante. Após a dissolução completa do ácido cinâmico, adicionou-se a solução de 2,0 g de sulfato de zinco dissolvido em 10 mL de água destilada com agitação constante. O precipitado complexo de zinco/ácido cinâmico foi filtrado e lavado com solução de bicarbonato de sódio e depois com água destilada para remover o ácido que não reagiu. A mesma metodologia foi feita para o ácido 4-metóxi cinâmico utilizando, em substituição ao ácido cinâmico.

Preparação dos filmes de acetato de celulose. Os filmes foram preparados pelo método *casting*. Inicialmente preparou-se uma solução das substâncias bioativas em acetona. Em seguida esta solução foi adicionada à dispersão de acetato de celulose preparada previamente com o mesmo solvente. Esta mistura foi homogeneizada em um agitador magnético por 4 horas em temperatura ambiente. Após a homogeneização a solução foi espalhada em placa de vidro e o solvente evaporado em temperatura controlada por 24 horas. Em todos os casos foi mantida a proporção do acetato de celulose na solução em 11% em massa e 20% em massa das substâncias bioativas.

Liberção Controlada. A liberação das substâncias bioativas foram feitas pela imersão de 0,5 g da massa dos filmes obtidos em um fluido de simulação da pele em pH 6,8. Para verificar se houve a incorporação dessas substâncias ao filme e o tempo e a forma (rápida/lenta) de liberação das substâncias bioativas dos materiais obtidos, estas soluções foram mantidas em banho maria, sob agitação constante e com temperatura controlada de 37 °C. Aliquotas de 3 mL foram recolhidas, em intervalos de tempo variando de 5 min até 7 dias, e em seguida, leituras de absorção foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*. Posteriormente as alíquotas foram devolvidas para dentro do frasco. O perfil das substâncias bioativas liberadas foram determinados a partir de um gráfico, correlacionando absorbância em função do tempo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A ferramenta computacional *ChemSketch* foi utilizada para o desenho molecular, otimização de geometria e obtenção dos códigos smiles. O desenho molecular permite que esse código smiles seja gerado. O código smiles é um código que funciona como uma identidade para a molécula, portanto ele é único, sendo assim esse código smiles foi utilizado em todas as outras ferramentas computacionais, diminuindo a probabilidade de existir possíveis erros em relação à estrutura molecular.

Feito a geração do código smiles foi utilizado uma segunda ferramenta, chamada *Swiss Targert Prediction*, que teve como objetivo a determinação de alvos farmacológicos para cada uma das quatro substâncias avaliadas. Na maioria dos resultados apareceram enzimas relacionadas ao câncer, sendo assim determinamos como alvo de estudo uma dessas enzimas: a aldo-ceto redutase (PDB 4GQ0). A estrutura cristalina da enzima de estudo (4GQ0) foi obtida do banco de dados *Protein Data Bank*, um banco de dados internacional que compila todas as enzimas cujas estruturas cristalinas foram determinadas.

Algumas propriedades moleculares, relacionadas à biodisponibilidade oral de substâncias químicas, foram determinadas utilizando a ferramenta *Molinspiration*

(Tabela 1). Tal estudo leva em consideração a regra do cinco de Lipinski (2001), que é baseada nas seguintes propriedades: $miLogP$: coeficiente de partição octanol-água; $TPSA$: área superfície polar; MM : massa molar do composto; $nALH$: número de aceptores de ligação de hidrogênio; $nDLH$: número de doadores de ligação de hidrogênio. Para substâncias com boa biodisponibilidade oral espera-se que: $miLogP \leq 5,00$; $TPSA \leq 140$; $MM \leq 500$; $nALH \leq 10$; $nDLH \leq 5$ e que o n Violações (número de violações à “regra de 5” de Lipinski) ≤ 1 .

Tabela 1 – Propriedades moleculares calculadas, na ferramenta *Molinspiration*, para os compostos estudados.

Composto	$miLogP$	MM	$nALH$	$nDLH$	$TPSA$	n Violações
ACN	1,91	148,16	2	1	37,30	0
ZnACN	4,15	359,70	4	0	52,61	0
AMC	1,97	178,19	3	1	46,53	0
ZnAMC	4,26	419,75	6	0	71,08	0

Fonte: Autoria própria (2019).

Observa-se que todos os compostos avaliados apresentaram propriedades moleculares que não violam nenhuma dos critérios da regra dos cinco de Lipinski, indicando que todos terão boa disponibilidade oral. Desta forma, sistemas de encapsulamento são uma boa opção para serem utilizados com os compostos estudados para regular a taxa de liberação dos mesmos durante o processo de administração oral.

As possíveis bioatividades dos compostos avaliados foram determinadas na ferramenta *Molinspiration* (Tabela 2).

Tabela 2 – Bioatividades calculadas na ferramenta *Molinspiration* para os compostos estudados.

Composto	Ligante GPCR	Modulador Canal Iônico	Inibidor Quinase	Ligante Receptor Nuclear	Inibidor Protease	Inibidor de Enzima
ACN	- 0,74	- 0,40	- 1,14	- 0,47	- 0,98	- 0,30
ZnACN	0	- 0,07	- 0,10	0,11	- 0,07	0,08
AMC	- 0,60	- 0,40	- 0,92	- 0,28	- 0,85	- 0,25
ZnAMC	- 0,04	- 0,13	- 0,12	0,09	- 0,09	0,02

Fonte: Autoria própria (2019).

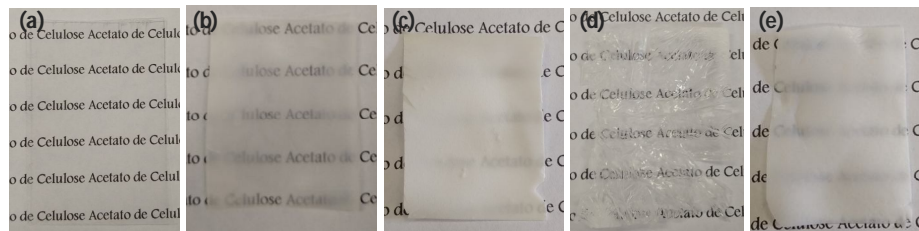
Nesse estudo realizado por meio da ferramenta *Molinspiration*, a probabilidade de uma molécula apresentar bioatividade a um determinado receptor alvo é maior para valores de escore próximos de 0,0. Quando o valor é menor que -5,0 (escore < -5,0), a molécula é inativa, e se ele é maior que 0,0, a molécula é ativa e para valores intermediários a molécula possui atividade moderada (MOHAN et al., 2017). Desta forma, observa-se que as quatro substâncias avaliadas são ativas ou moderadamente ativas para todos os modelos de bioatividade, com destaque para o complexo Zn-ácido cinâmico (ZnACN).

Outra ferramenta utilizada foi o *Swiss ADME*, cujo objetivo foi determinar a permeabilidade na pele. Os valores de permeação na pele ($\log K_p$) para os compostos avaliados foram: ACN (- 5,69 cm/s), ZnACN (- 6,29cm/s), AMC (- 5,48 cm/s), e ZnAMC (- 5,80 cm/s).

Para esse modelo, quanto mais negativo o $\log K_p$, menos permeante à pele é a molécula avaliada. De modo geral, observa-se que todos os compostos avaliados apresentaram boa permeação à pele, o que indica a viabilidade do uso de sistemas de liberação transdérmica como forma de administração dessas substâncias. Conhecer a velocidade de permeação na pele é um parâmetro importante, cuja informação pode justificar a escolha do polímero a ser utilizado para produção do sistema de liberação controlada: (i) polímeros que liberam o fármaco mais rapidamente pode ser utilizado com substância de baixa taxa de permeação à pele; (ii) polímero que liberam o fármaco mais lentamente podem ser utilizadas com substância de alta taxa de permeação à pele.

Pode-se observar que o filme de acetato de celulose puro possui muita transparência {Figura 1 (a)} e rigidez. O filme com ACN possui uma coloração levemente esbranquiçada, possuindo certa maleabilidade {Figura 1 (b)}. O filme com ZnACN, apresentou coloração branca opaca e alta rigidez {Figura 1 (c)}. No filme com o AMC pode-se observar a formação de cristais e a obtenção de um filme fino, frágil e transparente {Figura 1 (d)}. Já o filme com o complexo ZnAMC apresentou coloração esbranquiçada {Figura 1 (e)}, com leve maleabilidade.

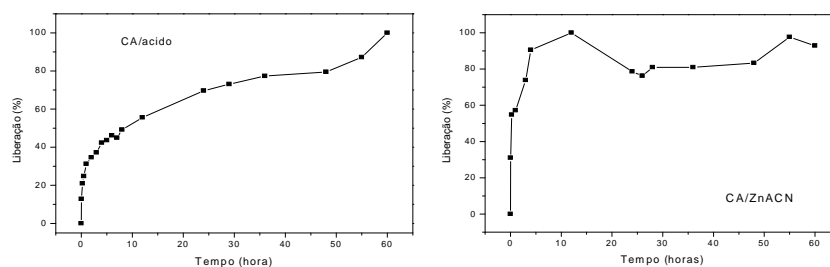
Figura 1 – Fotografia dos filmes de acetato de celulose puro (a) e com as substâncias bioativas: CA/ACN (b), CA/ZnACN (c), CA/AMC (d) e CA/ZnAMC (e).

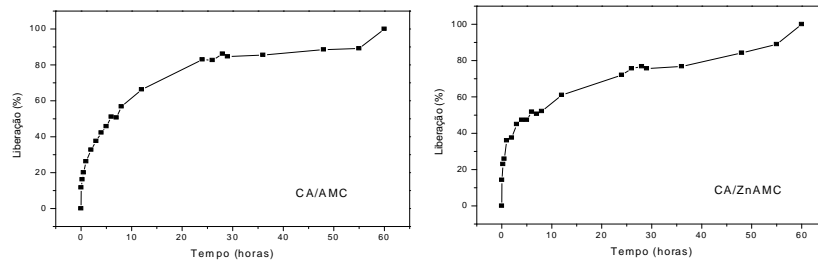


Fonte: Autoria própria (2019).

Os gráficos obtidos nos estudos de liberação são apresentados na Figura 2. Para os filmes de acetato de celulose observou-se liberação de 49% do ACN, 95% de ZnACN, 58% de AMC e 52% de ZnAMC após oito hora em contato com o fluido de simulação da pele. O complexo ZnACN apresentou um perfil de liberação mais rápida, sendo liberado 100% em 12 horas. Já, o AMC e o complexo de ZnAMC apresentaram uma liberação mais lenta, e controlada até 60 horas.

Figura 2 – Curvas de liberação das substâncias bioativas.





Fonte: Autoria própria (2019).

A matriz polimérica utilizada nesse trabalho, acetato de celulose, não intumescceu durante processo de liberação, sugerindo, que o mecanismo que controla a liberação das substâncias bioativas a partir da matriz de acetato de celulose será a difusão. Esse mecanismo é definido como processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância, através de um movimento molecular randômico. Ocorrendo preferencialmente através das região amorfas do polímero, onde as cadeias encontram-se mais desordenadas e o volume livre entre as cadeias é maior.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que as substâncias avaliadas possuem propriedades farmacocinéticas adequadas para candidatos a fármacos de administração oral ou transdérmica. Quanto ao possível alvo farmacológico, observou-se que as substâncias avaliadas possuem potencialidade de inibição de enzimas associadas ao desenvolvimento de cânceres, tal como a aldo-ceto redutase. Para os filmes incorporados com as substâncias bioativas, ácido 4-metóxi-cinâmico e seu complexo, o estudo de liberação sugere que para esses filmes houve a liberação controlada das substâncias incorporadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes. São Paulo: Manole, 3.ed. atual. e ampl., p.617, 2009.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- MOHAN, A. C. et al. Determination of molecular property, bioactivity score and binding energy of the phytochemical compounds present in *Cassia auriculata* by molinspiration and DFT method. *Texila International Journal of Basic Medical Science*, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2017.