

Estudos de liberação de fenilpropanóides incorporados em esferas de acetato de celulose

Release studies of phenylpropanoids incorporated in chitosan spheres

RESUMO

Isaac Felipe Machado
isaacfelipe99@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.

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

Sistema de liberação controlada tem sido uma alternativa promissora para a substituição da liberação imediata de substâncias bioativas visto que tem-se a necessidade do aprimoramento desse recurso farmacológico. A produção de micro/nanopartículas ao redor disso é promissor onde o fármaco adsorvido ou reservado no polímero apropriado é capaz de chegar ao sítio desejado e liberar controladamente melhorando o efeito terapêutico no consumidor. O acetato de celulose, polímero que é abundante no planeta, é candidato para a incorporação de fármacos utilizando a capacidade da macromolécula para formação de nano/micropartículas bastando verificar a compatibilidade com a substância desejada. A classe dos fenilpropanóides dentre eles podemos citar o ácido cinâmico e seus derivados, de acordo com a literatura e pesquisas ao redor mostram que possuem atividade antirretroviral. Portanto necessita-se a verificação da formação de micropartículas de acetato de celulose, incorporação de ácido cinâmico e alguns derivados, além da possível liberação dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: Substâncias Bioativas. Liberação Controlada. Micropartículas Poliméricas.

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



Controlled release system has been a promising alternative to replace the immediate release of bioactive substances since there is a need to improve this pharmacological resource. The production of micro/nanoparticles around this is promising where the drug adsorbed or reserved in the appropriate polymer is able to reach the desired site and release in a controlled way, improving the therapeutic effect on the consumer. Cellulose acetate, a polymer that is abundant on the planet, is a candidate for the incorporation of drugs using the ability of the macromolecule to form nano/microparticles by simply checking the compatibility with the desired substance. The class of phenylpropanoids, among them, we can mention cinnamic acid and its derivatives, according to the literature and researches around show that they have antiretroviral activity. Therefore, it is necessary to verify the formation of cellulose acetate microparticles, incorporation of cinnamic acid and some derivatives, in addition to their possible release.

KEYWORDS: Bioactive Substances. Controlled Release. Polymeric Microparticles.



INTRODUÇÃO

O Brasil galga a sétima colocação no ranking mundial de mercados farmacêuticos e tem a projeção para subir para a quinta colocação em 2023 de acordo com a INTER-FARMA. Gastos mundiais com medicamentos chegaram a US\$ 1,2 trilhão em 2018 e estima-se que ele ultrapasse US\$ 1,5 trilhão em 2023, fato que evidencia o alto crescimento da indústria farmacêutica. A pesquisa e desenvolvimento no setor farmacêutico, em nível mundial, cresceu cerca de 25,7% entre 2008 e 2018, caracterizando-se como dos setores que mais investe na área, cujos elevados investimentos demonstram a necessidade de novas formas de tratamento já que o surgimento de doenças crônicas e complexas estão se tornando mais frequentes.

Variadas formas de administração de medicamento têm sido utilizadas, diferenciando-se pela forma em que os fármacos são absorvidos pelo organismo, tais como via oral, nasal, retal, sublingual, intravenosa e cutânea (PEREIRA, 2007). O sistema convencional de administração de medicamentos consiste na liberação imediata do fármaco sendo necessário ingeri-las recorrentemente. Embora efetiva são necessárias melhorias, pois além de dosagens recorrentes, podem não atingir o sítio desejado, não manter o nível terapêutico esperado e atingir um nível tóxico ou ineficiente para o paciente.

Sistemas de liberação controlada é uma alternativa promissora para a substituição de sistemas convencionais de administração de fármacos, e têm sido desenvolvidos sob diversos aspectos multidisciplinares da ciência, fato que tem contribuído para o avanço dessa área. Tais sistemas são estudados desde 1960 e têm sido utilizados além da indústria farmacêutica, na indústria química na produção de derivados do petróleo, agroindústria e produção de tintas. Os sistemas de liberação controlada mais comuns envolvem membranas de liberação transdérmica, revestimentos de comprimidos, géis, dispersões e micro/nanopartículas.

As micro/nanopartículas são esferas na grandeza de 1 a 100 nm (nano) e 1 a 100 μm (micro) e possuem propriedades físico-químicas e biológicas otimizadas pelo seu tamanho. São partículas poliméricas que podem estar na forma de reservatório (cápsulas) ou matriz polimérica nas quais o fármaco está encapsulado ou adsorvido no polímero (WILCZEWSKA et al., 2012). Tal sistema oferece vantagens como: a) maior eficiência terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; b) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência da circulação; c) menor número de doses administradas; d) direcionamento de alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas; e) tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

A eficiência das partículas, em um sistema de liberação controlada, depende da escolha do polímero apropriado que seja capaz de realizar a liberação do fármaco, controlar a ação terapêutica e liberar o fármaco no local desejado. Entre os vários polímeros utilizados para essa finalidade destaca-se o acetato de celulose, um polímero obtido pela reação de acetilação da celulose (polímero de cadeia longa de β -D-glicopiranosil) com anidrido acético e ácido acético, tendo ácido sulfúrico como catalizador. O acetato de celulose contém propriedades como baixa toxicidade, boa estabilidade, elevada permeação a água, produção de filmes resistentes, compatibilidade com agentes ativos e a habilidade de formação de micro/nanopartículas (CRUZ et al., 2011), além de ser muito abundante e renovável no planeta.

Para a preparação das microesferas é mais utilizado a técnica da emulsão, na qual o sistema contém dois líquidos imiscíveis, um na forma dispersa e o outro em gotículas. Dois tipos de procedimentos têm sido utilizados, tomando como óleo aquilo que não é aquoso: água em óleo (A/O) quando a fase dispersa é aquosa e a fase contínua é oleosa e de modo inverso o óleo em água (O/A). Pode-se ter também emulsões múltiplas do tipo A/O/A e O/A/O geralmente feita em duas etapas, nas quais forma-se a emulsão primária sendo re-emulsificada em outra fase.

Os fenilpropanóides são uma classe de compostos orgânicos presentes no reino vegetal, sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina e tirosina. Esses compostos tem a função essencial de composição de polímeros, proteção contra a luz ultravioleta e defesa contra herbívoros e patógenos. Vários compostos dessa classe tiveram suas atividades biológicas/farmacológicas determinadas, tais como a atividade antiviral (MURAKAMI et al., 2000). Entre os compostos pertencentes a essa classe destacamos o ácido cinâmico e seus derivados - tais como os ácidos rosmarínico, cafeico e ferúlico - que, de acordo com a literatura, possuem atividade antirretroviral (BAILLY; COTELLY, 2005).

Ao unir todas as informações, o objetivo do trabalho ora relatado foi produzir microesferas de acetato de celulose, utilizando o método de emulsão O/A, passíveis de serem utilizadas para incorporar substâncias bioativas e analisar sua liberação em fluidos simulados.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para obtenção das micropartículas de acetato de celulose foi adaptada de Neves et al. (2014), a partir do método emulsificação O/A e evaporação do solvente.

A fase aquosa foi preparada a partir da dissolução de 1 g de polioxietilenado (Tween 80) ou 0,5 g polialcool vinílico (PVA) em 100 mL de água destilada sob agitação magnética por 24h. A fase orgânica foi preparada com 0,3 g de acetato de celulose em 30 mL de diclorometano sob agitação magnética por 30 minutos. Após o preparo das mesmas, foi vertido vagarosamente a fase orgânica sobre a fase aquosa sob agitação vigorosa e temperatura de 35 °C. O produto obtido foi filtrado, lavado com água e seco a temperatura ambiente.

Posteriormente, as micropartículas de acetato de celulose/substância bioativas foram preparadas utilizando como fase orgânica a mistura do polímero e da substância bioativa em solvente orgânico. A FO foi preparada utilizando duas soluções: (i) polímero (5% em relação ao volume de solvente) dissolvido em 5 mL de diclorometano; (ii) substância bioativa (5% em relação a massa de polímero) dissolvido em diclorometano. Na sequência a FO foi vertida lentamente sob a FA, a mistura permaneceu sob agitação, a temperatura ambiente, por 30 minutos. O produto obtido foi filtrado, lavado com água e seco a temperatura ambiente. Esse experimento foi realizado, separadamente, para cada uma das três substâncias bioativas: ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico e ácido cafeico.

Tabela 1 - Variáveis utilizadas para obtenção das micropartículas de acetato de celulose com polioxietilenado como surfactante e incorporação da substância bioativas.

EXP	FASE AQUOSA (FA)		FASE ORGÂNICA (FO)		FASE BIOATIVA (FB)	
	H ₂ O (mL)	T80 (g)	CA (g)	DCM (mL)	DCM (mL)	Substância (mg)
TC6	100	1,0	0,3	25	-	-
TC9	100	1,0	0,3	20	5	5 (Cinâmico)
TC10	100	0,7	0,3	20	5	5 (4-metoxi)
TC11	100	0,7	0,3	20	5	5 (Cafeico)

Fonte: Autoria própria.

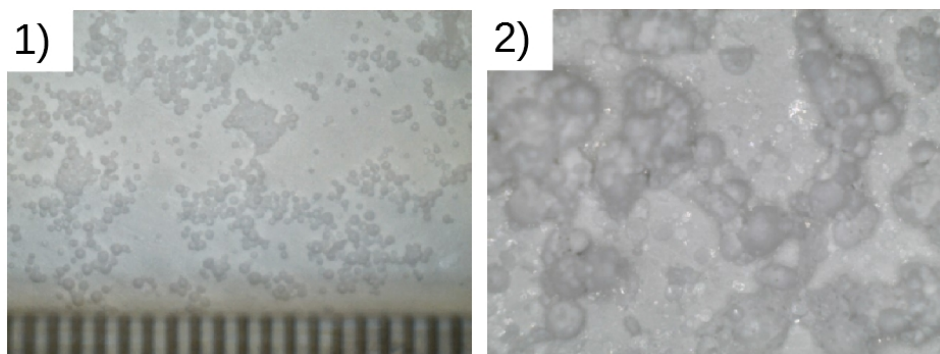
Os fluídos de simulação intestinal e gástrica foram preparados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição de 2010. A solução tampão ácida foi preparada utilizando 2,0 g cloreto de sódio em 100 mL de água. Adicionou-se 7,0 mL de ácido clorídrico concentrado e diluiu-se para 1000 mL. Ajustou-se o pH para 1,2 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 5 mol.L⁻¹. A solução tampão básica foi preparada utilizando 6,8 g de fosfato de potássio monobásico em 900 mL de água destilada, juntamente com 77 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol.L⁻¹. Ajustou-se o pH para 7,4 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,2 mol.L⁻¹.

As micropartículas (30 mg) foram imersas em fluído de simulação intestinal com pH 7,4 (5mL) e fluído de simulação gástrica com pH 1,4 (5 mL) em recipientes vítreos e mantidas em temperatura constante de 37 °C. Para a análise de absorção utilizou-se o Espectrofotômetro UV-Vis T70+, PG Instruments. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas e analisadas em intervalos variando de 5 minutos até 2 dias. Posteriormente, as alíquotas foram devolvidas para dentro do frasco e mantidas nas condições anteriormente citadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas variáveis (tipo e quantidade de surfactante, tipo e quantidade de solvente) foram estudadas com a finalidade de obter esferas de acetato de celulose uniformes e adequadas para estudos de liberação controlada. No entanto, devido a limitação de espaço apenas os testes que apresentaram melhores resultados serão apresentados no presente artigo. De modo geral, observou-se que a incorporação dos fenilpropanóides ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico e ácido cafeico influenciou na diminuição do número de esferas formadas quando comparado a testes nos quais os fenilpropanóides não estão presentes (Figura 1). Apesar disso, as três condições experimentais reladas foram as melhores entre as várias estudadas.

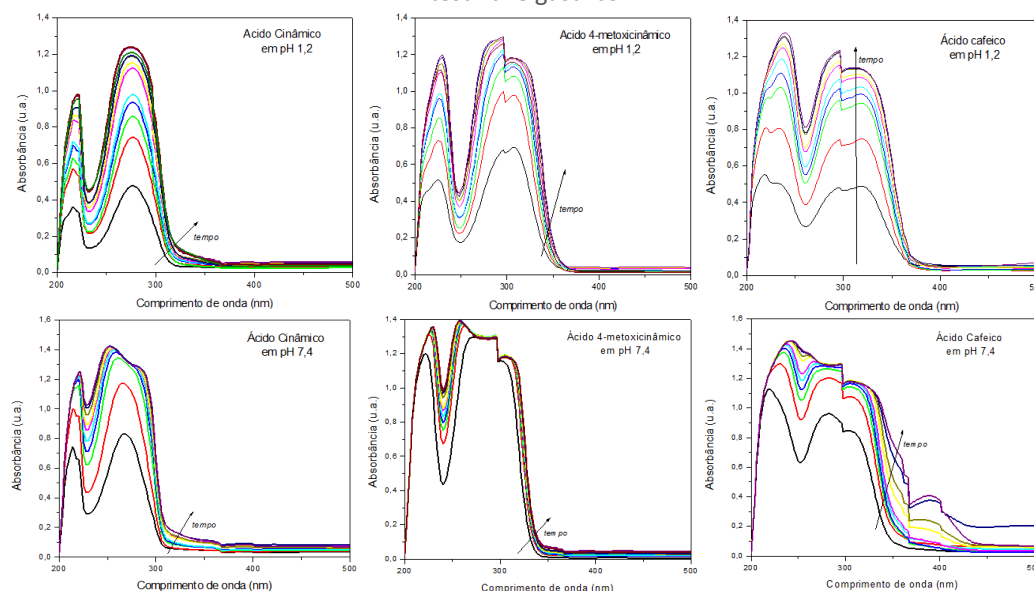
Figura 1 – Aspectos visuais das micropartículas de acetato de celulose incorporadas com fenilpropanóides. 1) CA puro. 2) Fármaco incorporado.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, as esferas produzidas nesses testes foram escolhidas para a realização de ensaios de liberação, dos fenilpropanóides incorporados em esferas de acetato de celulose, em fluídos de simulação intestinal e gástrica. O estudo de liberação foi realizado em dois pHs diferentes, um simulando o fluido gástrico com pH 1,2 e o outro simulando o fluido intestinal com pH 7,4. Os espectros de absorbância obtidos nos testes de liberação, de fenilpropanóides incorporados em esferas de acetato de celulose em fluídos simulados são apresentados na Figura 2.

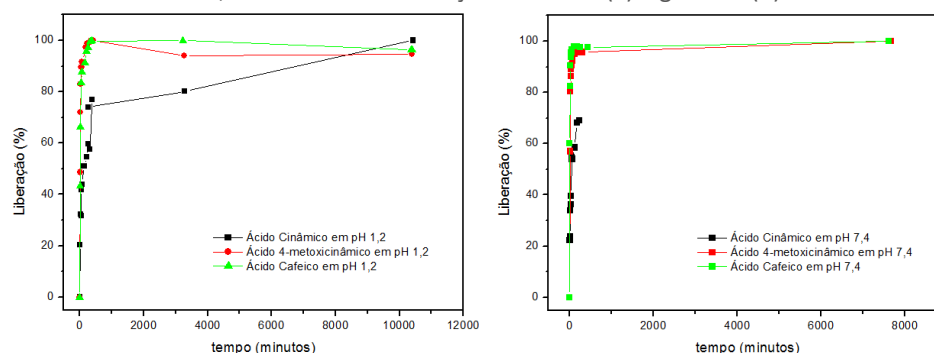
Figura 2 - Espectros de absorbância das micropartículas de acetato de celulose com ácido cinâmico, ácido 4-metoxicinâmico e ácido cafeico, em função do tempo, em fluídos de simulação intestinal e gástrico.



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar o conjunto de espectros de absorbância, para cada estudo de liberação, é possível observar, em função do tempo, o aumento da intensidade das curvas referente aos fenilpropanóides. A partir dos dados de absorbância em comprimento de onda de 320 nm, região característica de absorção dos fenilpropanóides utilizados, foi construído as curvas de liberação das substâncias bioativas (Figura 3).

Figura 3 - Curvas de liberação de fenilpropanóides, incorporados em esferas de acetato de celulose, em fluidos de simulação intestinal (a) e gástrico (b).



Fonte: Autoria própria.

Para os estudos de liberação em fluido de simulação, gástrica e intestinal, observou-se, de modo geral, que o perfil de liberação dos ácidos cafeico e 4-metoxicinâmico são similares. A velocidade com que esses fenilpropanóides são liberados das esferas é maior do que para o ácido cinâmico. Esse fato pode estar relacionado aos valores de solubilidade em água e coeficiente de partição octanol-água (geralmente calculado e tabela na forma logarítmica logP) dos fenilpropanóides utilizados:

Ácido cinâmico: solubilidade em água = 526 mg/L; logP = 1,79;

Ácido 4-metoxicinâmico: solubilidade em água = 586 mg/L; logP = 1,87;

Ácido cafeico: solubilidade em água = 1.537,5 mg/L; logP = 0,93.

Como pode ser observado pelos valores de solubilidade, os dois fenilpropanóides mais solúveis em água (ácido cafeico e 4-metoxicinâmico) são mais facilmente liberados das esferas de acetato de celulose. No entanto, esse parâmetro claramente não pode ser o único a influenciar o mecanismo de liberação, caso contrário a taxa de liberação dos ácido cinâmico e 4-metoxicinâmico deveria ser próxima e menor do que a do ácido cafeico, que possui maior solubilidade em água.

De forma semelhante ao discutido para o parâmetro solubilidade em água, o logP dos fenilpropanóides estudados parece não ser o fator decisivo para justificar as diferenças observadas nos estudos de liberação. Aparentemente, as forças intermoleculares competitivas estabelecidas entre o fenilpropanóide-matriz polimérica e fenilpropanóide-fluido parecem influenciar também nesse mecanismo. Tal constatação pode ser exemplificada com o ácido cafeico, apesar deste fenilpropanóide ser o mais solúvel em água e possuir maior tendência de ir para a fase aquosa, este também interage mais fortemente com a matriz polimérica do que os demais compostos estudados.

Além do exposto anteriormente, a localização dos fenilpropanóides na esfera pode ser diferente, de modo que um fenilpropanóide localizado mais próximo a superfície (ou ainda na superfície) da esfera tende a ter uma liberação mais rápida, mas cuja taxa também dependerá de outros fatores, tais como os decorrentes da estrutura molecular discutidos acima.

A taxa de liberação dos fenilpropanóides avaliados foi relativamente alta, em apenas 1 hora de contato com o fluido de simulação intestinal, observou-se liberação de 97% de ácido cafeico, 90% de ácido 4-metoxicinâmico e 54% de ácido cinâmico. Para o fluido de simulação gástrica, a taxa de liberação foi mais lenta do que a observada para o teste com o outro fluido, para 1 hora de avaliação observou-se que a taxa de libera-

ção para os ácidos cafeico e 4-metoxicinâmico foi de aproximadamente 90% e para o ácido cinâmico foi 44%.

A taxas de liberação mais altas, observadas nos testes com fluido de simulação intestinal, pode ser justificada pela presença do grupo carboxílico que se ioniza em meio básico, aumentando, desta forma, a solubilidade do fenilpropanóide. A mesma justifica explica o fato do ácido cafeico, que possui menor pKa entre os três fenilpropanóides, ser liberado em uma taxa maior.

CONCLUSÃO

Diante dos dados recolhidos dos sistemas de liberação das substâncias e a análise de dados obtida firma-se a liberação dos fenilpropanóides a partir das microesferas formadas. Apesar da disparidade entre formação de microesferas de acetato de celulose puro e após a incorporação, obteve-se uma quantidade necessária para a análise de exposição das amostras em simulação intestinal e gástrica.

Mostrou-se que houve a liberação superior a 90% para o ácido cafeico e 4-metoxicinâmico e 54% para o ácido cinâmico em simulação intestinal. Em simulação gástrica, de semelhante modo, aproximadamente 90% para ácido cafeico e 4-metoxicinâmico e 44% para o ácido cinâmico.

Observa-se altas taxas de liberação que de semelhante modo ocorre com liberação imediata. Portanto necessita-se de desenvolvimento de processos para a combinação do acetato de celulose e os fenilpropanóides decorridos, formação nanopartículas ou mudança polimérica para as substâncias além de pesquisas ao redor de variação entre substâncias bioativas para melhor interação com o polímero.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1, 6ª Edição. Brasília: Anvisa, 2019.

BAILLY, F.; COTELLE, P. Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1811-1818, 2005.

CRUZ, A. C.; MEIRELES, C. S.; RIBEIRO, S. D.; RODRIGUES FILHO, G.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; CERQUEIRA, D. A.; ZENI, M.; POLETTO, P. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, v. 34, p 385-389, 2011.

INTERFARMA, Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. **Guia 2018**. Disponível em: https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2018/dados_do_setor/. Acesso em: 16 jul. 2020.

MURAKAMI, A. et al. Structure-activity relationship of (1'S)-1'-Acetoxychavicol acetate, a major constituent of a southeast Asian condiment plant *Laguas galangal*, on the inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1518-1523, 2000.

NEVES, M. C.; PRIMO, J. O.; ROMERO, A. L.; OLIVEIRA, K. A. L.; ROMERO, R. B.; Obtenção de micropartículas de acetato de celulose para sistemas de liberação controlada de fármaco: Estudo da influência da massa do polímero e tipo de solvente e de surfactante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, supl. 1, 2014.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, v. 1, p 171-177, 2007.

SOPPIMATH, K. S.; KULKARNI A. R.; AMINABHAVI T. M.; BHASKAR C. Cellulose acetate microspheres prepared by O/W emulsification and solvent evaporation method. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, p. 811-817, 2008.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020-1037. 2012