

INFLUÊNCIA DO NÚCLEO OLEOSO NA PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE POLIURETANO BIODEGRADÁVEL E α -TOCOPHEROL

F. Gonçalves dos Santos*, C. Gonsalves**, S. Einloft***, R. Ligabue***

* Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

** Faculdade de Engenharia Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*** Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

e-mail: fabiana.santos@acad.pucrs.br

Resumo: A nanotecnologia aliada aos biopolímeros possibilitou avanços no desenvolvimento de diversos sistemas para aplicação na área médica/farmacêutica. Um dos sistemas que vem sendo amplamente explorados são as micro/nanopartículas (MP/NP) na forma de cápsulas ou esferas. As micro/nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis são promissores sistemas de liberação controlada de fármacos, capazes de proteger e liberar a substância ativa gradativamente. Dentro deste contexto, nosso grupo desenvolveu MP de poliuretano biodegradável (PU) para o encapsulamento de α -tocoferol (α -TOC), com e sem óleo de açaí, via técnica de emulsão múltipla. A avaliação da eficiência de encapsulamento (EE) e liberação controlada em meio fisiológico também foram realizados. Foi possível detectar a presença de α -TOC e óleo de açaí em todas as MP, assim como a degradação do PU e liberação do α -TOC. As amostras sem óleo apresentaram EE de 15% e liberação crescente de α -TOC a partir do 12º dia, enquanto que as MP- com óleo apresentaram EE de 34% e liberação de forma constante até 30º dia. Os resultados indicam que a presença de óleo de açaí duplicou a EE do α -TOC e influenciou diretamente a formação das MP.

Palavras-chave: micro/nanopartículas, poliuretano, α -tocoferol, óleo açaí.

Abstract: *The nanotechnology allied to biopolymers allowed advances in the development of different systems for application in the medical/pharmaceutical field. One of the systems that has been widely investigated are the micro/nanoparticles (MP/NP) in the form of nanocapsules or nanospheres. The micro/nanoparticles prepared from biodegradable polymers are promising controlled drug release systems, being able to protect and gradually release the active substance. In this context, our group developed MP and NP of biodegradable polyurethane (PU) MP for encapsulating α -tocopherol (α -TOC with and without açai oil - by multiple emulsion technique.. The*

evaluation of encapsulation efficiency (EE) and the controlled release in the physiological environment were also investigated. It was possible to detect the presence of α -TOC and açai oil in all MP, as well as the PU degradation and the release of α -TOC. The samples without oil showed EE of 15% and growing release of α -TOC from the 12th day, while the MP with oil showed EE of 34% and release up to 30 days. The results indicate that the presence of açai oil has doubled the EE of α -TOC and influenced the MP formation.

Keywords: *micro/nanoparticles, polyurethane, α -tocopherol, açai oil.*

Introdução

Pesquisas na área de biomateriais têm mostrado que micro/nanopartículas (MP/NP) poliméricas são sistemas adequados na liberação controlada de fármacos, drogas ou substâncias ativas para inúmeras aplicações na medicina como na terapia do câncer[1], em vacinas[2], em liberação de antibióticos[3] e compostos nutricionais (substâncias nutracêuticas)[4], entre outras. O desafio é sintetizar MP e/ou NP combinando as propriedades físicas e mecânicas dos polímeros com as propriedades hidrofílicas e lipofílicas das substâncias que serão liberadas[5]. Além disso, esta substância deve ser protegida antes e após a administração[5-6]. Esta característica é de grande interesse para o encapsulamento de vitaminas, como a vitamina E na forma de α -tocoferol (α -TOC).

O α -TOC é amplamente utilizado em diversas aplicações partindo de alimentos até a área de cosméticos e para fins terapêuticos[7], enquadra-se como uma substância nutracêutica, possui um forte caráter antioxidante e apresenta sensibilidade à luz e ao calor. Outra característica interessante a destacar é o caráter lipofílico o que possibilita ser solubilizado em núcleo oleoso para liberação controlada[6-7]. Por sua vez, os tipos de óleos utilizados como núcleo oleoso, que no caso de nanocápsulas, servem como veículo onde o fármaco se encontra disperso ou dissolvido

também influenciam na liberação do fármaco ou substância ativa em função da solubilidade do princípio ativo[6-7]. Assim, destaca-se a importância da escolha do meio oleoso compatível com o composto ativo, de forma que possa ser inerte ou então, atribuir melhores propriedades ao fármaco, como por exemplo, o óleo de açaí. Dentro deste contexto este trabalho tem como objetivo preparar micropartículas (MP) de poliuretano e α -TOC avaliando a influência do núcleo oleoso, óleo de açaí, nas propriedades e eficiência das MP.

Materiais e métodos

Preparação das Micro/nanopartículas de PU

As MP foram preparadas via emulsão múltipla e evaporação de solvente a partir de um PU biodegradável sintetizado conforme a literatura[8]. A emulsão foi formada pela mistura de duas fases: A e O. Fase A – consiste em uma solução aquosa com Tween 80 (Sigma Aldrich, 0,1% m/m), antiespumante KFO™205 (Braschemical, 0,03% m/m) e água destilada. Fase O – consiste em uma solução oleosa contendo PU dissolvido em THF (Sigma Aldrich, 0,6% m/m), α -TOC (Sigma Aldrich 96% de pureza, 50% m/m em relação ao PU) e óleo açaí (Beraca, 20% m/m em relação ao PU) ou ausência de óleo.

Fase A foi adicionada à fase O sob agitação usando o homogeneizador ultra-turrax (24000 rpm durante 5 min) para obter emulsão (A/O). Em seguida, o solvente orgânico foi removido pelo método de evaporação lenta. Para a remoção de resíduos, a emulsão foi centrifugada e lavada por três vezes com água destilada. Após as MP foram congeladas com nitrogênio líquido e submetidas ao processo de liofilização durante 24 horas. As MP preparadas com a presença de óleo de açaí foram nomeadas MP-COL e preparadas sem óleo de açaí foram identificadas como MP-SOL.

Técnicas de Caracterização

A caracterização da estrutura química das MP foi realizada por técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando-se um espectrômetro da marca Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR, modo ATR, no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} . A morfologia das MP foi investigada usando um microscópio eletrônico de varredura ZEISS/EVO-LS15 (ES) com tensão de aceleração de 20kV e ouro para metalização. A faixa de aumentos utilizada foi de 1000-8000x e o tamanho de partícula médio foi obtido com o auxílio do software Imaje J.

O comportamento térmico (TG/DTG) das MP foi avaliado utilizando o equipamento TA Instruments-Q600, variando da temperatura ambiente até 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio e porta-amostra de platina.

Recuperação e Eficiência de Encapsulamento

A recuperação e eficiência de encapsulamento (EE) consistem na quantificação de α -TOC recuperado das MP e do teor livre presente na emulsão respectivamente, conforme descrito na literatura[9]. Esta quantificação foi feita utilizando a técnica de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). O equipamento utilizado foi da marca Agilent series®12000 com detector UV-Vis ($\lambda=294\text{nm}$) equipado com coluna Lichospher® C18RP-18-5 μm / 125x4,0mm e pré-coluna 5 μm /4x4mm (Merck). A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol: água (99:1 v/v) e o fluxo de eluente foi de 1,0 mL/min e volume de injeção de 40 μL .

Liberação do α -TOC in vitro

A avaliação de liberação de α -TOC foi realizada usando-se o método de degradação hidrolítica [10]. As amostras MP foram colocadas em tubos de ensaios com solução tampão fosfato salino (PBS, pH=7,4) à 37°C. Após períodos determinados (4, 6, 10, 12, 20, 25 e 30 dias), as amostras foram retiradas do meio e, secas a vácuo o durante 24 horas. A solução no qual as amostras estavam imersas foi analisada utilizando o equipamento de UV-Vis Agilent Technologies® 8453 ($\lambda=294\text{nm}$) para verificar a quantidade de α -TOC liberado no meio, as leituras foram realizadas em cubeta quartzo. As MP secas foram levadas à análise de MEV.

Resultados

A Figura 1 mostra as micrografias das micropartículas com poliuretano e α -TOC com e sem óleo de açaí respectivamente.

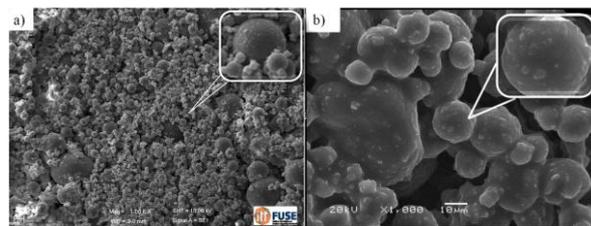


Figura 1: Micrografias das micropartículas de PU/ α -tocoferol: a) MP-COL (1000x), b)MP-SOL (1000x).

A Figura 1b mostra as MP-SOL (sem óleo de açaí), onde as mesmas apresentaram um grau acentuado de aglomeração e má formação das partículas esféricas com tamanhos médios de 4-15 μm . Já a presença de óleo (Figura 1a) propiciou a formação de MP com morfologia esférica bem definida, com certa rugosidade na superfície e com tamanhos médios entre 2-6 μm

A EE do α -TOC nas MP sem óleo de açaí foi de 15%, enquanto que as MP com o óleo de açaí tiveram uma EE de 34%, o que permite destacar que a presença de óleo de açaí propiciou um aumento significativo na EE da micropartícula de poliuretano. Obteve-se em torno de 93% de α -TOC recuperado, em ambas as micropartículas

MP-COL e MP-SOL, este alto valor de recuperação indica uma boa afinidade do α -TOC encapsulado com o polímero poliuretano que compõe a parede da MP.

Os espectros de infravermelho (Figura 2) possibilitaram a identificação e determinação dos grupos funcionais relacionados às substâncias utilizadas na formação das MP, observa-se bandas características do poliuretano em torno de 3448 e 3418 cm^{-1} , referente ao grupo NH (uretano), e em torno de 1244 cm^{-1} banda atribuída ao grupo CO (éster). É possível observar também no espectro da MP-COL que a banda em torno de 1730 cm^{-1} atribuído a deformação axial do grupo C=O (grupo uretano e éster) apresenta um pequeno alargamento, como uma indicação dos sinais sobrepostos de C=O do PU, óleo de açaí.

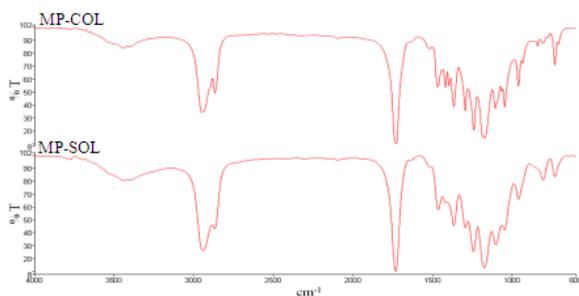


Figura 2: Espectros de infravermelho das MPs: MP-SOL e MP-COL.

A liberação de α -TOC mostrou dois comportamentos distintos: a liberação de quantidades crescentes nas MP-SOL e liberação relativamente constante nas MP-COL conforme observado na Figura 3.

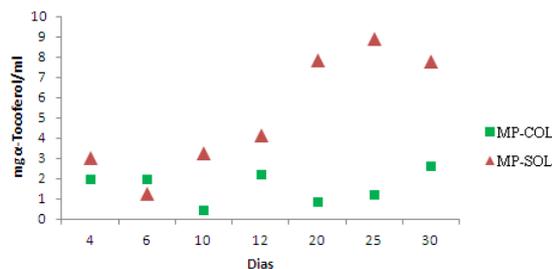


Figura 3: Liberação α -TOC mg/ml via degradação hidrolítica 4, 6, 10, 12, 20, 25 e 30 dias.

Do período de 4-12 dias é possível observar comportamento de liberação de α -TOC semelhante nas duas amostras variando de 1-5mg de α -TOC, porém a partir do 12º dia, as MP-SOL mostraram uma maior liberação de α -TOC (4-10mg de α -TOC). Por outro lado, as amostras de MP-COL mostraram liberação não superior a 5mg de α -TOC durante todo o período de ensaio. Estes comportamentos podem estar associados ao tipo de partícula, pois nas partículas MP-SOL, sem núcleo oleoso, o α -TOC pode estar incorporado em toda a matriz polimérica, inclusive na superfície da mesma. No entanto, nas partículas MP-COL, o α -TOC está predominantemente dentro do núcleo oleoso de óleo de

açaí, sendo que a degradação contínua da parede polimérica permite uma liberação controlada e constante de α -TOC dentro do período avaliado (30 dias).

As micrografias apresentadas nas Figuras 4 e 5 representam as amostras submetidas à degradação de 4 e 30 dias. Em todas as amostras foi possível notar erosão da superfície das MP e, em algumas ocorreu o rompimento das mesmas. As MP-COL mostraram maior número de partículas rompidas.

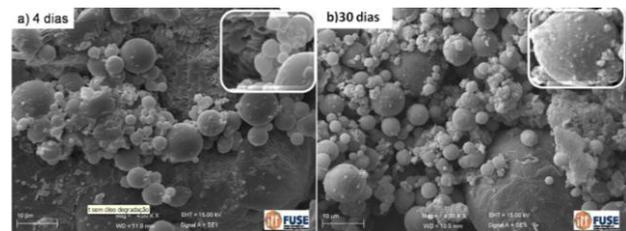


Figura 4: Micrografias das micro/nanocápsulas MP-COL: a) 4 dias e b) 30 dias no ensaio hidrolítico.

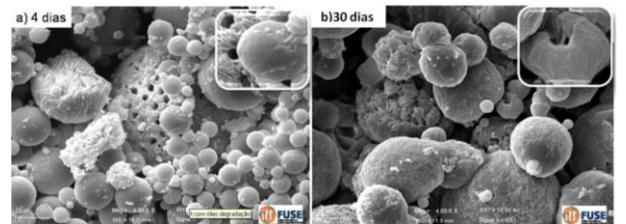


Figura 5: Micrografias das micro/nanocápsulas MP-SOL: a) 4 dias e b) 30 dias no ensaio hidrolítico.

Ainda em relação ao ensaio hidrolítico verificou-se que após 20 dias ocorreu rompimento em boa parte das MPs indicando que houve a liberação do α -TOC. Este resultado confirma o obtido no estudo de liberação, onde a partir de 20 dias para todas as partículas houve um aumento significativo na quantidade de α -TOC liberado para as MP-SOL.

As Figuras 6 e 7 mostram as curvas termogravimétricas das MP-COL e MP-SOL antes e após ensaio de liberação de α -TOC, bem como, o α -TOC e o PU puro para fins de comparação.

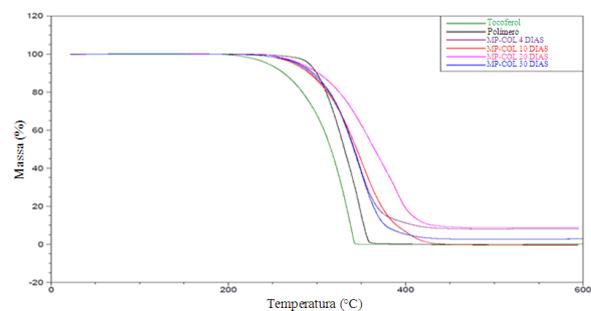


Figura 6: Termogramas de MP-COL e com 6, 12, 20 e 30 dias de degradação hidrolítica.

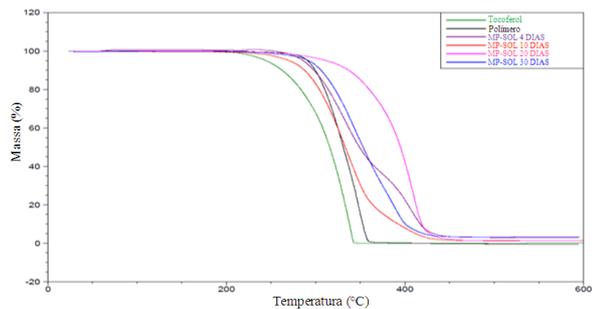


Figura 7: Termogramas de MP-SOL e com 6, 12, 20 e 30 dias de degradação hidrolítica.

Os termogramas de todas as MPs apresentaram um comportamento diferente do PU puro, sobretudo nas regiões iniciais e finais da curva de degradação. Este é um efeito da presença α -TOC e óleo de açaí. Além disso, as amostras com a presença de óleo MP-COL, apresentaram uma segunda etapa de degradação (na forma de um ombro) na parte final da curva indicando nitidamente a presença do óleo de açaí.

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que o método de emulsão múltipla foi eficaz na preparação de MP PU/ α -TOC com e sem a presença de óleo de açaí. A presença de óleo influencia direta e positivamente na formação e no tamanho das partículas, bem como, na eficiência de encapsulamento, o que indica a efetividade do óleo açaí como veículo oleoso compatível e não sintético para acentuar a eficiência da formação de sistemas de liberação controlada. Porém percebe-se a necessidade de aprimorar métodos de obtenção das MP visando o aumento da EE e a diminuição do tamanho de partícula.

Agradecimentos

CNPq e CAPES pela bolsa concedida, a empresa AS Technology pelo apoio financeiro, ao INTOX – PUCRS, ao ITT-FUSE – unisinos e ao laboratório de organometálicos e resinas LOR – PUCRS pela infraestrutura cedida para a realização do trabalho.

Referências

- [1] Liechty WB, Peppas NA. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eu.J.P.Bio.*, 2012, v. 80, p. 241-246.
- [2] Jain AK, Goyal AK, Gupta PN, Khatri K, Mishra N, Mehta A, Mangal S, Vyas, SP. Synthesis, characterization and evaluation of novel triblock copolymer based nanoparticles for vaccine delivery against hepatitis B. *J.Cont.Rel.*, 2009, v. 136, p. 161-169.
- [3] Alphadary HP, Andreumont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticle. *I.J.A.A.*, 2000, v. 13, p. 155-168.
- [4] Braithwaite MC, Tyag C, Tomar LK, Kumar P, Choonara YE, Pillay V. Nutraceutical-based therapeutics and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: review. *J.F.F.*, 2014, v. 6, p. 8 2 -9 9.

- [5] Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *T.J. P.Res.*, 2006, v. 5, p 561-573.
- [6] Zaragoza MLZ, Silva SM, Del Real AL, Cortez EG, Villegas MAC, Guerrero DQ. The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut —Red Delicious apples. *In.F.Sci.E.Tec.* v. and p. no informed, 9p.2013.
- [7] Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int.J.Pha.*, 2012, v. 423, p. 419– 427.
- [8] Ligabue R, Einloft S, Dullius J, Gracioli E, Dias GTG, Jahno V. Uso de Membranas Biopoliméricas em Próteses Cardiovasculares. 2011, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11069929 data de depósito: 29/12/2011, Instituição de registro: INPI – Inst.Nac.Prop. Ind.
- [9] Noronha CM, Granada AF, Carvalho SM, Lino RC, Maciel MVOB, Barreto PLM. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Ind. C.P.* v.50, p.896– 903, 2013.
- [10] American Society For Testing And Materials. Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants, ASTM F1635. 2010.