

Phyllanthus amarus SCHUMN. & THONN. BIONANOENCAPSULADO EM SISTEMA COLOIDAL SNEDDS PARA USO BIOLÓGICO

Joherbson D. S. Pereira¹, Ionne M. S. Dantas², Sthephanye M. Revoredo³, Gineide C. Anjos⁴, Denise P. Emerenciano⁵, Heryka M. M. Ramalh⁴ e Maria Aparecida M. Maciel⁶

1. Doutorando Renorbio Nucleador Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
2. Técnica em Laboratório da Universidade Potiguar (UnP)
3. Titulada em Biotecnologia (mestrado) pela Universidade Potiguar (UnP)
4. Professora da Universidade Potiguar (UnP)
5. Titulada Doutorado (Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
6. Professora Pesquisador da Universidade Potiguar (UnP)/Orientadora

Resumo

Sistemas coloidais como nano e microemulsão são carreadores que favorecem a otimização na veiculação de fármacos lipofílicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é preparar, veicular e avaliar a estabilidade de um sistema SNEDDS utilizado para solubilizar e encapsular o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus amarus* Schumn. & Thonn. (EHA-PA), bem como avaliar sua eficácia antioxidante e antimicrobiana. O sistema SNEDDS-PA foi caracterizado pelas análises de diluição máxima dos agregados micelares em meio aquoso; tensão superficial; viscosidade e diâmetro de gotícula e a análise microbiológica foi realizada com EHA-PA encapsulado (SNEDDS-PA) em diferentes concentrações (25, 30, 35, 40, 45 mg) utilizando a técnica de Kirby Bauer. O estudo fitoquímico do extrato vegetal possibilitou através de análises de RMN, a identificação de lignanas bioativas (nirantina, 5-demetoxi-nirantina, nirantina, filantina e hipofilantina, bem como do terpeno 2Z, 6Z, 10Z, 14E, 18E, 22E-farnesil farnesol).

Autorização legal: Este trabalho foi realizado com autorização expedida pela UnP.

Palavras-chave: Nanotecnologia; carreadores; fármaco.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ.

Trabalho selecionado para a JNIC: UnP

Introdução

A nanotecnologia é o seguimento que mais tem inovado na busca de produtos para a indústria farmacêutica. Desta forma, o surgimento de novas tecnologias para otimizar os sistemas de veiculação de fármacos vem crescendo consideravelmente a cada ano (COLA et al., 2016). Veiculações de fármacos em sistemas carreadores de liberação controlada representam um grande desafio biotecnológico em função de ganhos na relação dose/efeito/redução de toxicidade. Dentre os quais destacam-se os sistemas coloidais do tipo nano e microemulsão que solubilizaram eficazmente substâncias de caráter lipofílico e hidrofílico. Diversas pesquisas demonstraram a importância do uso de sistemas de liberação de fármacos para otimizar o processo de absorção e redução de possíveis efeitos tóxicos (SENGUPTA; CHATTERJEE, 2017; NGUYEN et al., 2017).

A utilização de sistemas coloidais nanoestruturados é uma alternativa viável para aumentar a estabilidade de substâncias ativas, em função do encapsulamento proteger o princípio bioativo de interações indesejáveis. Os sistemas coloidais polares resistentes a diluições em água são denominados SMEDDS ou SNEDDS (respectivamente: Self-Microemulsifying ou Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System) e desde o uso clínico das formulações comerciais Sandimmune Neoral® e Norvir®, são considerados carreadores promissores na veiculação de fármacos lipofílicos. Além de serem sistemas de liberação lenta e controlada, possibilitam diminuições de doses administradas, com consequente redução de efeitos adversos do princípio bioativo no seu sítio de ação terapêutica. Uma das maiores vantagens destes sistemas consiste na formação de emulsões polares (sistema O/A) estáveis, para uso oral, com tamanho inferior a 100 nm (sistemas nano ou microestruturados).

Metodologia

A avaliação fitoquímica do material vegetal de *Phyllanthus amarus* foi realizada de acordo com metodologia previamente reportada (MACIEL et al., 2007). O material foi submetido à estufa 40 °C e à extração via maceração em etanol (EtOH) e água (8:2). O filtrado foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotativo do tipo TE 120 Tecnal (o aquecimento foi através de banho térmico com temperatura controlada), obtendo-se o extrato hidroalcoólico (EHA) com 15% rendimento. No procedimento cromatográfico utilizou-se misturas de solventes (hexano e acetato de etila) em gradiente de polaridade. O estudo fitoquímico do extrato EHA-PA possibilitou o isolamento de lignanas, que foram caracterizadas via análises de RMN (300 MHz). Para obter a região de

nanoemulsão do sistema SNEDDS, carreador do extrato EHA-PA, utilizou-se o método que envolve a determinação dos pontos de solubilidade máximas do tensoativo (Tween 80), nas fases aquosa e orgânica (óleo vegetal) por meio de titulações mássicas. O sistema foi caracterizado pelas análises de diluição máxima dos agregados micelares em meio aquoso; tensão superficial; viscosidade e diâmetro de gotícula. A solubilização do extrato EHA-PA no sistema SNEDDS foi quantificada via método espectroscópico na região do visível utilizando um comprimento de onda (λ) na faixa 400 nm a 800 nm, para a determinação do $\lambda_{\text{máx}}$. A curva analítica foi obtida pela relação entre concentração do extrato (1 mg/mL para a solubilidade mínima e 50 mg/mL para a solubilidade máxima) versus absorvância de quatro amostras, em um determinado $\lambda_{\text{máx}}$ (667 nm). Em função da curva analítica, foi possível calcular a solubilidade máxima do extrato EHA-PA, no sistema veiculador (SNEDDS), tendo sido observado 99,17% (42,64 mg mL⁻¹) de encapsulamento. A habilidade antioxidante do bioproduto SNEDDS-PA foi testada na quelação de íons conforme protocolo estabelecido por Decker e Welch (1990), com modificações de Wang et al. (2000). A mistura de reação contendo diferentes concentrações de FeCl₂ (0,05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 mL, 5 mM) foi agitada por 10 minutos à 25 °C. A absorvância da solução foi medida a 562 nm. A habilidade das amostras avaliadas, em quelar o íon ferro, foi calculada usando-se a seguinte Equação 1:

$$\text{Habilidade de quelção (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

Onde, A_0 corresponde a absorvância do controle e A_1 a absorvância da amostra teste; com resultados significativos.

As análises microbiológicas foram realizadas utilizando a técnica de Kirby Bauer por testes de disco-difusão, verificando o diâmetro do alo de inibição bacteriana seguindo as normas do CLS I 2019, em relação as seguintes concentrações utilizadas; SNEDDS-PA25, SNEDDS-PA30, SNEDDS-PA35, SNEDDS-PA40 e SNEDDS-PA45, e utilizando as seguintes bacterias; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Campylobacter sp.* e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706.

Resultados e Discussão

O estudo cromatográfico resultou na identificação de lignanas bioativas nirantina, 5-demetoxi-nirantina, nirantina, filantina e hipofilantina, bem como do terpeno 2Z, 6Z, 10Z, 14E, 18E, 22E-farnesil farnesol, que têm comprovada ação farmacológica, evidenciada pelos efeitos antioxidativo, anti-inflamatório e hepatoprotetor (MACIEL et al., 2007; 2012; 2019). A habilidade antioxidante do bioproduto SNEDDS-PA (10 mg EHA/mL) na quelação dos íons ferro e cobre mostrou melhor atividade para o íon cobre (Tabela 1). Este método baseia-se em estimar a atividade quelante do íon ferro dos compostos presentes no extrato avaliado. Em razão da Ferrozina, reagente utilizado nesse ensaio, forma-se um complexo com íon Fe²⁺ (coloração rosa), na presença de agentes quelantes, este complexo não se forma, resultando na diminuição da coloração. Desta forma, a redução permite estimar a atividade quelante. Comparativamente, dentre as espécies reativas de oxigênio, este radical é o mais reativo. No entanto, na concentração avaliada 10 mg EHA/mL, SNEDDS-PA apresentou resultado inativo contra a produção do radical hidroxila (OH[•]).

Devido a ausência de alos de inibição nas bacterias utilizadas, foi possível comprovar que nas concentrações avaliadas, o formulado SNEDDS-PA não apresenta ação antimicrobiana frente aos microorganismos analisados, visto que não houve nenhuma inibição bacteriológica (Tabela 2).

Tabela 1. Percentuais antioxidantes do Bioproduto SNEDDS-PA

	Quelação de íon ferro (%)	Quelação de íon cobre (%)	Radical hidroxila (%)
SNEDDS-PA	23.43 ± 2.36	55.59 ± 0.02	Nd

nd - não detectado

Tabela 2: Atividade Antimicrobiana do Bioproduto SN-PA

Concentrações Bactérias	SNEDDS- PA25	SNEDDS- PA30	SNEDDS- PA35	SNEDDS- PA40	SNEDDS- PA45
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Salmonella sp.</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Acinetobacter sp</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Proteus sp</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Campylobacter sp</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Fonte: Laboratório UnP

Na área da farmacologia, a produção de fitoterápicos naturais com ação antioxidante e efeito imunomodulador, tem foco na inibição de radicais livres, prevenção e tratamento de doenças infecciosas, com contribuição na melhoria da saúde preventiva. Do ponto de vista industrial, o formulado SNEDDS-PA poderá ser avaliado em larga escala para diversas aplicações terapêuticas.

Conclusões

O sistema nanoemulsionado SNEDDS associado ao extrato EHA-PA que apresenta atividade farmacológica atribuída as lignanas bioativas, proporciona a otimização da ação do fármaco com consequente melhoria de sua biodisponibilidade e diminuição de sua toxicidade, facilitando também, sua administração. Além disso, esse sistema apresentou indicação terapêutica, antioxidante e imunomoduladora. Deste modo, o bioproduto SNEDDS-EHA-PA se mostrou favorável para aplicação na veiculação de fármacos.

Referências bibliográficas

- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496, 1966.
- CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 2019.
- COLA, D.F.; PASQUOTO, T.; GUILGER, M.; LIMA, R.; SILVA, C.M.G.; FRACETO, L.F. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. *Química Nova*. 39(9): 1034-1043, 2016.
- DECKER, E.A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(3): 674-677, 1990.
- MACIEL, M.A.M.; ANJOS, G.C.; REVOREDO, S.M.; PADILHA, D.M.M.; RAMALHO, H.M.M. Botanic, Phytochemistry and pharmacological aspects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. as powerful tools to improve its biotechnological studies, *Annals of Chemical Science Research*. 1(2), 2019. Doi: 10.31031/ACSR.2019.01.000510.
- MACIEL, M.A.M.; CUNHA, A.F.; DANTAS, T.N.C.; KAISER, C.R. NMR characterization of bioactive lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. *Annals of Magnetic Resonance*. 6(3): 76-82, 2007.
- MACIEL, M.A.M.; CUNHA, A.F.; KAISER, C.R.; COSTA, E.A.; ROCHA, F.F.; VANDERLINDE, F.A. Chemical Constituents from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. and its pharmacological effectiveness. In: *Medicinal Plants: Phytochemistry, Pharmacology and Therapeutics*. Daya Publishing House; Edt. VK Gupta. 2(3): 41-52, 2012.

NGUYEN, T.T.C.; NGUYEN C.K.; NGUYEN, T.H.; TRAN, N.Q. Highly lipophilic pluronics-conjugated polyamidoamine dendrimer nanocarriers as potential delivery system for hydrophobic drugs. *Materials Science and Engineering: C*. 70(2): 992-999, 2017.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 526(1): 353-365, 2017.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 140-146, 2000.