

INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO MODIFICADA DE MEDICAMENTO ANTI-FUNGICO EM BLENDAS DE SERICINA E ALGINATO

Palavras-Chave: liberação modificada, indometacina, matriz polimérica

Autores/as:

Gabriela Pereira de Freitas [FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA]

Prof^ª. Dr^ª. Melissa Gurgel A. Vieira (orientadora) [FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA]

MSc. Wedja Timóteo Vieira (coorientadora) [FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA]

INTRODUÇÃO

Os medicamentos de administração oral são, em geral, de liberação convencional, contudo, há um esforço crescente nas últimas décadas para o desenvolvimento de tecnologias atuantes na liberação modificada (DAS; DAS, 2003). A partir da alteração do encapsulamento dos fármacos, visando a modificação da sua liberação, as propriedades físico-químicas deles podem ser aprimoradas e as limitações e malefícios inerentes à liberação imediata são contornados. Sobretudo, os sistemas modificados permitem modular e/ou direcionar a liberação do insumo farmacêutico ativo (IFA). Assim, promovem uma melhor eficácia, mitigação dos efeitos adversos, maior seletividade de atividade e adesão do paciente (BIZERRA; SILVA, 2016; HENRIQUE et al., 2006; QIU; ZHOU, 2011).

Nesta perspectiva, a indometacina é propícia para o desenvolvimento da sua liberação modificada. Este medicamento é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), amplamente aplicado no tratamento de doenças reumáticas e doenças inflamatórias não reumatoides (HELLEBERG, 1981; DALMORO et al., 2018). No entanto, o uso prolongado de AINEs no tratamento de doenças inflamatórias crônicas é propenso ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais e sangramentos, limitando a sua aplicação (BERNARDI et al., 2009; THONG-NGAM et al., 2012). Assim, a liberação modificada a partir de sistemas multiparticulados permite reduzir o pico de concentração e mitigar os efeitos gastrointestinais por meio da maior dispersão das partículas no meio gastrointestinal (GANDHI et al.,

1999; PEZZINI et al., 2007). Além disso, pode contornar a necessidade de múltiplas dosagens diárias associada a liberação convencional desse IFA, favorecendo a adesão do paciente.

Por outro lado, a combinação de polímeros visando a sinergia de características favoráveis à formação de uma matriz para liberação modificada de fármacos já é bastante reconhecida e estabelecida (LI et al., 2014). Tanto a sericina quanto a κ -carragenina já se mostraram promissoras para entrega de anti-inflamatório (VIDART et al., 2018; FREITAS et al., 2018; PETTINELLI et al., 2020.; PRADO et al., 2008), contudo, não há literatura sobre sistemas multiparticulados com esses dois polímeros combinados, tampouco para entrega de indometacina.

Isto posto, essa pesquisa objetivou-se ao estudo da liberação modificada do anti-inflamatório indometacina pela incorporação na blenda desenvolvida de sericina e κ -carragenina com sistema multiparticulado. Especificamente, foi realizada a extração e o fracionamento da sericina, o preparo da blenda seguindo um planejamento experimental fatorial completo e a avaliação da eficiência de incorporação e de carregamento, além da caracterização das partículas produzidas.

METODOLOGIA

Materiais

Os materiais utilizados foram casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, fornecido pela empresa BRATAC do ramo de fiação de seda, localizada na cidade de Londrina – PR, e a κ -carragenina fornecida pela Sigma-Aldrich (Saint Louis-MO, USA). O fármaco indometacina foi

adquirido pela empresa MAGIS PHARMA localizada na cidade de Campinas – SP.

Métodos:

Limpeza e extração da sericina

Os casulos do bicho da seda foram submetidos a um tratamento físico para remover as impurezas grosseiras. Em seguida, foram cortados em pequenas frações para aumentar a superfície de contato e facilitar o processo de extração da sericina. A extração da proteína sericina foi realizada pelo método de autoclave nas condições de 1 kgf.cm⁻² de pressão, temperatura de 120 °C e tempo de 40 minutos. Após a extração, para obter a sericina de alta massa molar foi utilizado o método de congelamento e descongelamento.

Preparo das partículas de sericina, κ-carragenina e IFA

Para o preparo da blenda, a sericina foi ressolubilizada em autoclave e ajustou-se sua concentração para 3,0 % (m/V) pelo método das massas, conforme descrição de Silva et al. (2016). A κ-carragenina foi dissolvida em água destilada e aquecida a 60 °C em banho termostático com agitação a 200 rpm, durante 1h. Após esse período, os volumes de sericina e κ-carragenina foram adicionados, segundo os valores estabelecidos no planejamento experimental. Os polímeros foram homogeneizados em Ultraturrax® a 4000 rpm, durante 10 minutos. A massa de IFA correspondente ao planejamento foi adicionada à emulsão e o sistema foi submetido a agitação de 8000 rpm por 30 minutos.

Análise da eficiência de incorporação e carregamento do IFA

Para a determinação da eficiência foram pesadas 0,01 g das partículas contendo o IFA e adicionadas em um erlenmeyer 50 mL de solução tampão pH 6,8 (KH₂PO₄ + NaOH) e Tween 80 (0,5%). Os Erlenmeyers foram colocados numa incubadora Shaker a 37,0 °C, 150 rpm durante 24 h. Após esse período, a suspensão foi colocada no sonicador por 10 minutos e, em seguida, filtrada

(0,22 μm). A concentração da solução foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1,5 mL/min coluna analítica: C18 (150 mm × 4,6 mm, 5,0 μm), temperatura da coluna de 25 °C, volume de injeção de 20 μL, detecção no comprimento de onda de 240 nm, utilizando como fase móvel acetonitrila/ácido fosfórico 0,2 % na proporção 50:50 (v/v) (NOVÁKOVÁ et al., 2005) A eficiência da incorporação (E_i , %) será avaliada pela Equação 1.

$$E_i = \frac{C_E}{C_T} \cdot 100 \quad (1)$$

Em que C_E é a concentração experimental obtida por HPLC e C_T é a concentração teórica dada pela fração mássica do fármaco na partícula. A eficiência do carregamento do fármaco (E_c , % m/m) será determinada por uma relação de massas conforme a Equação 2.

$$E_c = \frac{m_f}{m_p} \cdot 100 \quad (2)$$

Em que m_f é a massa de fármaco na partícula e m_p é a massa das partículas.

Testes de dissolução in vitro

A metodologia de dissolução foi realizada conforme as descrições da Farmacopeia Americana (USP) para a indometacina. O ensaio foi realizado em dissolutor de comprimidos e cápsulas, constituído de recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico do tipo cesto com rotação de 75 rpm e temperatura de 37,0 ± 1 °C. Foram realizados ensaios em meio gástrico simulado (MGS) com HCl 0,1 M (1000 mL), pH 1,2, durante 2h e em meio entérico simulado (MES) com solução tampão fosfato pH = 6,8. Foram retiradas alíquotas de 5 mL durante 24 h.

Caracterização das partículas

A caracterização das amostras foi realizada por adsorção e dessorção de nitrogênio, termogravimetria (TGA), análise diferencial térmica (DTG), densidade real, conforme descrito na Tabela 1.

Caracterização das partículas de sericina/κ-carragenina e sericina/κ-carragenina/IFA			
Análise	Equipamento	Parâmetros	Objetivo
TGA/DTG	Marca Shimadzu, modelo DTG-60,	Atmosfera inerte de N ₂ fluxo de 50 mLmin ⁻¹ e taxa de aquecimento de 20 °C.min ⁻¹ em uma faixa de temperatura de 30 a 1000 °C	Comportamento térmico das partículas pela avaliação da perda de massa com o tempo
Picnometria	Picnômetro Accupyc II 1330 (Gas Pycnometer, marca Micrometrics, USA)	Temperatura média de 25 °C com 10 ciclos de purga, 10 ciclos de análise uma taxa de equilíbrio de 0,050 psig.min ⁻¹	Determinação da densidade real das partículas

Tabela 1 – Descrição das análises de caracterização das partículas de sericina/κ-carragenina e sericina/κ-carragenina/IFA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preparo das partículas e planejamento experimental

A partir do método de gelificação ionotrópica foram feitas com sucesso as partículas (Figura 1a) constituídas pela blenda de sericina 1,6% e κ -carragenina 0,95% (m/V). Similarmente, foram desenvolvidas partículas com a incorporação de 3,0 de IFA, apresentadas nas Figuras 1b e 1c. Em geral, as partículas apresentaram forma esférica, embora quando secas, tornaram-se menos arredondadas e mais rígidas.

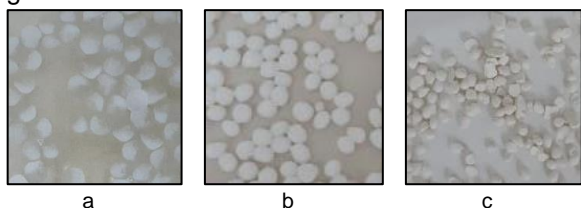


Figura 1 – Partículas de a) sericina 1,6% e κ -carragenina 0,95%; b) sericina 1,6%, κ -carragenina 0,95% e 3,0 g de indometacina e c) secas.

Durante o preparo, observou-se que o uso de concentrações de κ -carragenina inferior a 0,9%, resultou em partículas não esféricas e quebradiças e concentrações superiores a 0,95% implicaram em viscosidade muito alta, impedindo a etapa de gotejamento na solução de KCl para produção das partículas, devido à característica de

espessamento da κ -carragenina. Além disso, concentrações de sericina inferiores a 1,2% geraram partículas disformes e concentrações superiores a 1,6% combinadas com κ -carragenina a 0,95% dificultaram o gotejamento. Assim, elaborou-se o planejamento experimental fatorial completo considerando dois níveis e três variáveis (2^3), com três repetições no ponto central para estimar o erro experimental apresentado na Tabela 2.

Eficiência de incorporação e carregamento do IFA

A eficiência de incorporação relaciona a quantidade de indometacina nas partículas produzidas e a quantidade adicionada para o preparo destas, enquanto o carregamento do IFA expressa a quantidade de indometacina presente nas partículas em relação a massa total delas. Esses dois parâmetros são importantes para avaliar formulações farmacêuticas.

Estatisticamente, os resultados desses parâmetros (Tabela 2) indicaram que a quantidade de IFA foi o único fator principal significativo com nível de confiança de 95%. O aumento da massa de IFA de 2g para 3g nas formulações reduz a eficiência de incorporação e o carregamento. Por outro lado, tendo em vista que a faixa de variação das concentrações dos polímeros é estreita, sugere-se que a concentração de polímero influencia na capacidade da matriz de aprisionar o IFA.

Eficiência de incorporação e carregamento do IFA

Formulação	κ -carragenina (g/100mL)	Sericina (g/100mL)	IFA (g)	Eficiência (%)	Desvio EF	Carregamento (%)	Desvio CR
F1	0,90	1,2	2	99,91	1,8446	51,37	0,2820
F2	0,95	1,2	2	101,02	1,1647	50,35	0,2430
F3	0,90	1,6	2	100,54	1,4840	51,69	0,4286
F4	0,95	1,6	2	103,25	3,3542	53,64	2,4381
F5	0,90	1,2	3	98,07	1,5746	56,46	1,6668
F6	0,95	1,2	3	97,10	4,3865	58,15	2,2337
F7	0,90	1,6	3	97,40	2,2279	58,78	2,9898
F8	0,95	1,6	3	96,66	3,7943	57,93	0,6989
F9 (1)	0,925	1,4	2,5	99,74		53,99	
F9 (2)	0,925	1,4	2,5	99,70	0,0314	54,51	0,3707
F9 (3)	0,925	1,4	2,5	101,52		55,99	

Tabela 2 – Planejamento experimental fatorial completo 2^3 , eficiência de incorporação e carregamento da indometacina em blenda de sericina e κ -carragenina.

Dissolução in vitro

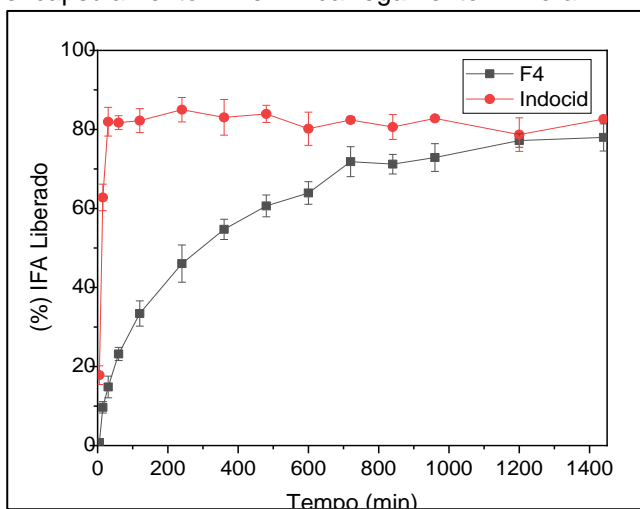
Foi realizado o ensaio de dissolução em meio ácido com a formulação F4 composta por κ -carragenina 0,95 (% m/V), sericina 1,6 (% m/V) e IFA 2,0 g. Após 2h a formulação apresentou uma liberação de $5,67 \pm 1,76\%$ no MGS. Este resultado aponta o caráter gastrorresistente da blenda, que deve ser inferior a 10%, segundo farmacopeia

USP. No MES, a formulação F4 apresentou uma liberação acentuadamente mais lenta que o medicamento comercial Indocid® (Gráfico 1a). Assim, constatou-se que as partículas de κ -carragenina e sericina com formulação F4 proporcionaram a liberação modificada da indometacina, prolongando a liberação do IFA por

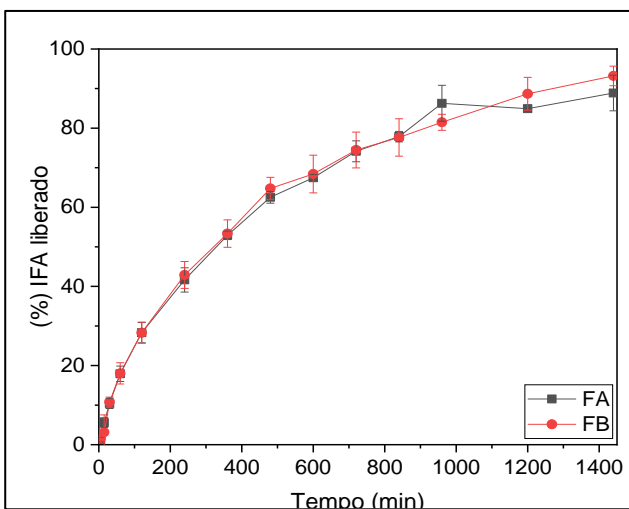
até 20 h em pH 6,8, melhorando sua eficácia terapêutica.

Observou-se ainda que as partículas produzidas com concentrações de sericina no nível mais baixo do planejamento experimental e com massa de indometacina no nível superior, resultaram numa alta liberação de IFA em meio ácido. Este comportamento pode provavelmente estar associado à baixa concentração dos polímeros que resultaram num baixo grau de reticulação entre as cadeias. Isso posto, foram produzidas partículas com concentração de κ -carragenina fixa (0,90 % (m/V)) e com maior concentração de sericina (2,0 e 2,5 % (m/V)). Para estas formulações, a eficiência de encapsulamento e carregamento foram

semelhantes aos resultados obtidos por F4. Contudo, as partículas apresentaram aspecto mais esférico e bem definido. Os perfis de dissolução em MES estão apresentados no Gráfico 1b, em que FA corresponde a formulação com sericina 2,0% (m/V) e FB a sericina 2,5% (m/V). Ambas apresentaram perfis de dissolução de IFA semelhantes, entretanto, comparando com F4, a liberação do IFA é ligeiramente mais rápida. Este comportamento pode estar associado à concentração mais baixa de κ -carragenina em FA e FB. Além disso, as formulações com maiores concentrações de sericina apresentaram maior liberação de IFA em equilíbrio, inclusive, em comparação à formulação comercial.



a



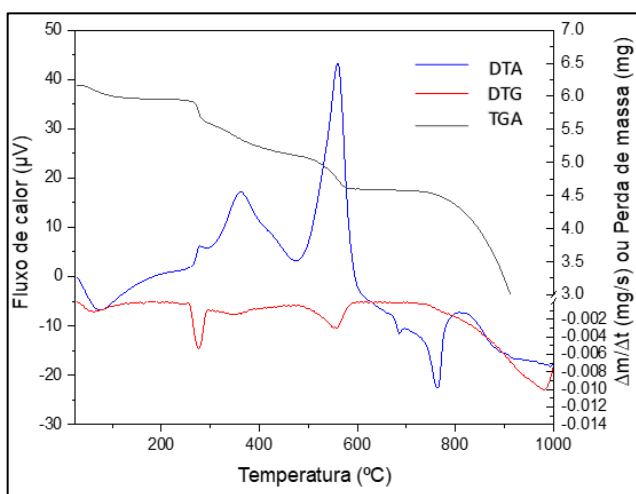
b

Gráfico 1 - Perfil de dissolução da indometacina na formulação comercial (Indocid®) e da matriz polimérica a base de sericina e κ -carragenina em meio entérico simulado (tampão pH = 6,8); F4: κ -carragenina 0,95 % (m/V), sericina 1,6 % (m/V) e IFA 2,0 g; FA: κ -carragenina 0,90 % (m/V), sericina 2,0 % (m/V) e IFA 2,0 g; FB: κ -carragenina 0,90 % (m/V), sericina 2,5 % (m/V) e IFA 2,0 g

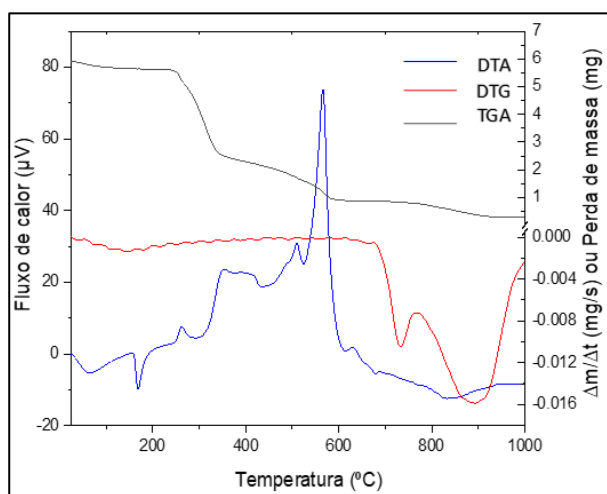
Caracterização das partículas

As partículas de sericina e κ -carragenina apresentaram densidade real de $0,6105 \pm 0,0006$

g/cm³. A análise termogravimétrica, por sua vez, permitiu avaliar a decomposição térmica das partículas de sericina/ κ -carragenina com e sem a indometacina (Gráfico 2).



a



b

Gráfico 2 - Perfis de TG/DTG e DTA obtidos para a (a) sericina/ κ -carragenina sem indometacina e (b) sericina (1,2 % m/V), κ -carragenina (0,95 % m/V) e indometacina (2,0 g)

Observa-se ao analisar as curvas de TGA/DTG e DTA Gráfico 2a e 2b, uma perda de massa atenuada nas proximidades de 100 °C relativa à umidade do material e da água ligada aos hidrogênios dos grupos hidroxila da sericina e dos grupos disponíveis da κ-carragenina (KASSAB et al., 2019). Em seguida, ocorrem perdas de massa mais significativas entre 200 e 600 °C para a blenda de sericina/κ-carragenina sem IFA, com picos mais pronunciados em 257 – 298 °C, 315 – 472 °C, 472 – 424 °C, 728 – 782 °C. As perdas de massa nesses intervalos estão associadas à degradação dos grupos laterais dos aminoácidos da sericina como também à clivagem das ligações peptídicas da proteína (FREITAS et al., 2021; ZHANG et al., 2012). Além disso, estão relacionadas à perda dos grupos sulfatados da κ-carragenina (–OSO₃–). Na curva de TGA/DTG e DTA da formulação F4 observa-se regiões de perda de massa entre 140 – 194 °C, 240 – 300 °C, 320 – 438 °C, 520 – 616 °C. Essas faixas são semelhantes ao perfil obtido para a formulação sem IFA, somado aos eventos de fusão e degradação da indometacina principalmente na região entre 140 – 500 °C, onde picos são mais pronunciados, sobretudo no DTA.

CONCLUSÕES

A blenda de sericina/κ-carragenina foi aplicada com sucesso à incorporação de indometacina e permitiu a liberação modificada do IFA. Somente a quantidade de IFA afetou estatisticamente a eficiência de incorporação e carregamento de IFA. As partículas se mostraram gastrorresistentes e prolongaram a liberação do IFA por até 20 h em meio entérico simulado. A caracterização das partículas avaliou o seu perfil de decomposição térmica e a densidade real (0,6105 ± 0,0006 g/cm³).

REFERÊNCIAS

- BERNARDI, A. et al. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Pharmacological Society**, v. 158, n. 4, p. 1104-1111, 2009.
- BIZERRA, Alex; SILVA, Viviane. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, Três Lagoas, v.3, n. 2, p. 1–12, 2016.
- DALMORO, Annalisa et al. Polymer-lipid hybrid nanoparticles as enhanced indomethacin delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 16-28, 2018.
- DAS, Nandita G.; DAS, Sudip K. Controlled-release of oral dosage forms. **Formulation, Fill & Finish – a Technology Primer 2003 – a supplement to Pharmaceutical technology**, v. 27, p. 10-16, 2003. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.610.4191&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

FREITAS, Emanuelle D. et al. Development and evaluation of naproxen-loaded sericin/alginate beads for delayed and extended drug release using different covalent crosslinking agents. **Materials Science and Engineering: C**, v. 118, p. 111412, 2021.

FREITAS, Emanuelle D. et al. Development of mucoadhesive sericin/alginate particles loaded with ibuprofen for sustained drug delivery. **Particuology**, v. 41, p. 65–73, 2018.

GANDHI, Rajesh; KAUL, Chaman Lal; PANCHAGNULA, Ramesh. Extrusion and spheronization in the development of oral controlled- release dosage forms. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 2, n. 4, p. 160-170, 1999.

HELLEBERG, Lars. Clinical Pharmacokinetics of Indomethacin. **Clin Pharmacokinetics**, v. 6, p. 245-258, 1981.

HENRIQUE, Juliana Sanchez; FALCARE, Renata Sarnauskas; LOPES, Patrícia Santos. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

Disponível em: <<https://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/11/22.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

KASSAB, Zineb et al. Improved mechanical properties of κ-carrageenan-based nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 1248-1256, 2019.

LI, Liang et al. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate polymers**, v. 103, p. 1-11, 2014.

NOVÁKOVÁ, L. et al. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 37, n. 5, p. 899-905, 2005.

PETTINELLI, Natalia et al. Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microparticles embedded in κ-carrageenan/locust bean gum hydrogel as a dual drug delivery carrier. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 110-118, 2020.

PEZZINI, Bianca Ramos; SILVA, Marcos Antônio Segatto; FERRAZ, Humberto Gomes. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.4, p. 491-502, 2007.

PRADO, H. J. et al. Basic butylated methacrylate copolymer/κ-carrageenan interpolyelectrolyte complex: preparation, characterization and drug release behaviour. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 171-178, 2008.

QIU, Yihong; ZHOU, Deliang. Understanding design and development of modified release solid oral dosage forms. **Journal of validation technology**, New York, v. 17, n. 2, p. 23, 2011.

SILVA, Thiago Lopes da. **Desenvolvimento e avaliação de partículas à base de blendas entre sericina e alginato para aplicação ambiental**. 2016. 193 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

THONG-NGAM, Duangporn et al. Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 18, n. 13, p. 1479–1484, 2012.

VIDART, Jacyara Moreira Martins et al. Development of sericin/alginate particles by ionic gelation technique for the controlled release of diclofenac sodium. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 12, 2018.

ZHANG, Xianhua et al. Fabrication of silk sericin nanofibers from a silk sericin-hope cocoon with electrospinning method. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 337-347, 2012.