



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

EMANUELLE DANTAS DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE PARTÍCULAS A PARTIR DA BLEND A SERICINA
E ALGINATO PARA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO MODIFICADA DE
ANTI-INFLAMATÓRIOS CETOPROFENO E NAPROXENO**

CAMPINAS

2020

EMANUELLE DANTAS DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE PARTÍCULAS A PARTIR DA BLENDAS DE SERICINA
E ALGINATO PARA INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO MODIFICADA DE
ANTI-INFLAMATÓRIOS CETOPROFENO E NAPROXENO**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Gurgel Adeodato Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA EMANUELLE DANTAS DE
FREITAS, E ORIENTADA PELA PROF^a DR^a
MELISSA GURGEL ADEODATO VIEIRA.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

F884d Freitas, Emanuelle Dantas de, 1988-
Desenvolvimento de partículas a partir da blenda de sericina e alginato para incorporação e liberação modificada de anti-inflamatórios cetoprofeno e naproxeno / Emanuelle Dantas de Freitas. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Melissa Gurgel Adeodato Vieira.

Coorientador: Paulo Cesar Pires Rosa.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Liberação controlada de fármacos. 2. Alginato de sódio. 3. Naproxeno. I. Vieira, Melissa Gurgel Adeodato, 1979-. II. Rosa, Paulo Cesar Pires, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of particles from the blend of sericin and alginate for incorporation and modified release of anti-inflammatory drugs ketoprofen and naproxen

Palavras-chave em inglês:

Controlled drug release

Sodium alginate

Naproxen

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Melissa Gurgel Adeodato Vieira [Orientador]

Wanderley Pereira de Oliveira

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Laura de Oliveira Nascimento

Liliane Maria Ferrareso Lona

Data de defesa: 20-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3574-008>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5195742634101501>

Tese de Doutorado defendida por Emanuelle Dantas de Freitas e aprovada em 20 de Fevereiro de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof^ª. Dr^ª. Melissa Gurgel Adeodato Vieira – Presidente e Orientadora
FEQ / UNICAMP

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-USP

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin
UNIFESP

Prof^ª. Dr^ª. Laura de Oliveira Nascimento
FCF / UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Liliane Maria Ferrareso Lona
FEQ / UNICAMP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico essa tese aos meus pais, Francisco e Jacinta, à minha irmã Caroline e ao meu companheiro de vida Daniel, minhas grandes inspirações e meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado discernimento e por ter me guiado nesse caminho que, por muitas vezes, não foi fácil, mas que no final valeu a pena.

À minha orientadora, Prof^a Melissa Vieira, e ao meu co-orientador, Prof. Paulo Rosa, pela ajuda prestada e pela oportunidade de desenvolver essa tese pela qual eu tenho tanto carinho.

A toda minha família que me dá suporte e contribui para o meu desenvolvimento como ser humano. Em especial aos meus pais, Francisco e Jacinta, e à minha irmã, Caroline, por todo amor e apoio incondicionais.

Ao meu companheiro Daniel, por todo amor, paciência e incentivo ao longo de toda essa caminhada.

Aos professores que participaram de todas as bancas de avaliação e que contribuíram significativamente com o desenvolvimento dessa tese.

Aos muitos amigos que me acompanharam ao longo desses últimos anos, em especial aos amigos do LEA/LEPA, Thiago, Jacyara, Júlia, Elissandro, Letícia, Gabi, Maria Fernanda, Ieda, Geovani, Raíssa, Giani e Wedja, pela amizade e companheirismo, e por tornarem meus dias muito melhores.

Aos alunos de iniciação científica que tive o prazer de acompanhar ao longo desses anos e que sempre me ajudaram.

À empresa de fiação de seda BRATAC pela doação dos casulos utilizados nesse estudo.

À farmácia de manipulação MagisPharma e à Geolab Indústria Farmacêutica pela doação de fármacos e agentes reticulantes utilizados nessa tese.

Ao Grupo Investiga, em especial ao Carlos Eduardo Daniel, por ter cedido o espaço para realização do ensaio de estabilidade de longa duração.

À Valéria Barbosa de Souza, do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, pela realização dos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, e ao Prof. Dr. Marcelo

Bispo de Jesus e sua aluna Raquel, do Instituto de Biologia – UNICAMP, pelo auxílio na obtenção das micrografias desse ensaio.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP que, com sua atenção e disponibilidade, possibilitaram que esse trabalho fosse realizado. Em especial, à Prof. Meuris da Silva.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos (Proc. 140717/2016-1), e ao CNPq (Proc. 301401/2016-0) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/13505-9 e 2016/05007-1), pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na concretização dessa tese.

RESUMO

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo que pode demandar elevados investimentos e um longo tempo até que seja finalizado. Sendo assim, o principal objetivo da indústria farmacêutica, hoje, é desenvolver novas formas farmacêuticas a partir de fármacos já existentes, visando modificar sua liberação e melhorar sua eficácia terapêutica e a adesão de pacientes ao tratamento. O cetoprofeno e o naproxeno são antiinflamatórios não esteroides, amplamente empregados para o alívio de dores, mas também conhecidos por seus efeitos colaterais como irritação gástrica, náuseas e possíveis úlceras. Sendo assim, propôs-se o uso de uma blenda polimérica natural para incorporação desses fármacos, visando obter formas de liberação retardada e prolongada. A blenda foi composta basicamente por sericina, proteína extraída de casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, e pelo polissacarídeo alginato, obtido comercialmente. A produção de partículas se baseou no processo de gelificação iônica e, em alguns casos, foram testados também diferentes agentes reticulantes covalentes, visando aprimorar a liberação dos fármacos. A melhor formulação de cetoprofeno foi obtida utilizando como matriz polimérica a blenda de sericina e alginato reticulada covalentemente pela proantocianidina (PA). Nesse caso, foi obtida eficiência de incorporação de $91,11 \pm 0,53\%$ e capacidade de carregamento de $40,49 \pm 0,24\%$. A matriz empregada apresentou gastrorresistência e permitiu a liberação prolongada do fármaco em meio entérico, atingindo o equilíbrio em cerca de 300 min. No caso do naproxeno, apenas a blenda de sericina e alginato foi suficiente para atingir o melhor resultado, com eficiência de incorporação de $77,67 \pm 1,53\%$ e carregamento de $33,41 \pm 0,66\%$. Nesse caso, a liberação em meio entérico foi prolongada, atingindo o equilíbrio também em cerca de 300 min. Avaliou-se a ação do processo de reticulação térmica sobre a dissolução *in vitro*, para ambos os fármacos. No caso do cetoprofeno foi obtido resultado inferior e no caso do naproxeno, o resultado ficou semelhante ao já obtido, evidenciando que a reticulação térmica não é indicada para o processo em estudo. As técnicas analíticas de DRX, FT-IR, MEV, MO e TG/DTG e DTA confirmaram a incorporação dos fármacos no interior das partículas, na forma de cristais, com uma fração dissolvida na matriz polimérica. Além disso, demonstrou tamanhos de partículas adequados para sistemas multiparticulados e com boa estabilidade térmica. Análises complementares de DSC e Microscopia *Hot-Stage* permitiram visualizar os fenômenos térmicos que ocorreram no fármaco puro e nas partículas, evidenciando o aprisionamento adequado do fármaco em seu interior. Além disso, ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade

demonstraram a biocompatibilidade das formas farmacêuticas desenvolvidas. Para o cetoprofeno, foi realizado ensaio de estabilidade acelerado e de longa duração, que comprovou que as formulações desenvolvidas são estáveis em relação à incorporação e a liberação da melhor formulação (KPA-1) também foi preservada, mesmo após armazenamento nas condições forçadas e nas condições normais de temperatura e umidade relativa.

Palavras-chave: sericina, alginato, liberação modificada de fármaco, cetoprofeno, naproxeno.

ABSTRACT

Developing new drugs is a process that can require high investment and a long time to complete. Thus, the main objective of the pharmaceutical industry today is to develop new pharmaceutical forms from existing drugs, aiming to modify their release and improve their therapeutic efficacy and treatment adherence. Ketoprofen and naproxen are non-steroidal anti-inflammatory drugs, widely used for pain relief, but also known for their side effects such as gastric irritation, nausea and ulcers. Thus, it was proposed to use a natural polymeric blend for incorporation of these drugs, aiming to obtain delayed and prolonged release forms. The blend was basically composed of sericin, protein extracted from *Bombyx mori* silkworm cocoons, and the commercially obtained polysaccharide alginate. Particle production was based on the ionic gelation process and in some cases different covalent crosslinking agents were also tested to improve drug release. The best ketoprofen formulation was obtained using the proanthocyanidin-crosslinked sericin and alginate blend as the polymer matrix. In this case, incorporation efficiency of $91.11 \pm 0.53\%$ and loading capacity of $40.49 \pm 0.24\%$ were obtained. The matrix used presented gastro resistance and allowed the prolonged release of the drug in enteric medium, reaching the equilibrium in about 300 min. In the case of naproxen, only the sericin and alginate blend was enough to achieve the best result, with incorporation efficiency of $77.67 \pm 1.53\%$ and loading capacity of $33.41 \pm 0.66\%$. In this case, enteric release was prolonged, also reaching equilibrium in about 300 min. The action of the thermal crosslinking process on *in vitro* dissolution was evaluated for both drugs particles. In the case of ketoprofen a lower result was obtained and in the case of naproxen, the result was similar to that already obtained, showing that thermal crosslinking is not indicated for the process under study. The analytical techniques of XRD, FT-IR, SEM, MO and TG/DTG and DTA confirmed the incorporation of the drugs inside the particles, as crystals, with a fraction dissolved in the polymeric matrix. In addition, it has demonstrated particle sizes suitable for multiparticulate systems with good thermal stability. Complementary analyzes of DSC and Hot-Stage Microscopy allowed visualizing the thermal phenomena that occurred in the pure drug and in the particles, evidencing the proper entrapment of the drug inside. In addition, cell viability and cytotoxicity assays demonstrated the biocompatibility of the developed dosage forms. For ketoprofen, accelerated and long-term stability assays was performed, which proved that the formulations developed are stable in relation to incorporation, and the release of the

best formulation (KPA-1) was also preserved even after storage under forced conditions and under normal conditions of temperature and relative humidity.

Keywords: sericin, alginate, modified drug release, ketoprofen, naproxen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfis de concentração plasmática de diversos tipos de liberação, convencional e modificada. Os segundos picos presentes nas curvas de liberação convencional e retardada se referem a uma segunda dose do medicamento.....	36
Figura 2 – Sistema reservatório para liberação controlada de fármacos.....	38
Figura 3 – Sistema de bomba osmótica para liberação controlada de fármacos.....	39
Figura 4 – Esquema de liberação de fármaco de sistema de liberação controlada matricial, utilizando (a) matriz polimérica erodível e (b) matriz polimérica hidrofílica.....	41
Figura 5 – Esquema representativo da Classificação Biofarmacêutica (CBS) obtida da FDA.....	42
Figura 6 – Diagrama representativo das etapas ADME no organismo.....	48
Figura 7 – Fórmula estrutural do cetoprofeno.....	54
Figura 8 – Metabolismo do cetoprofeno.....	55
Figura 9 – Fórmula estrutural do naproxeno.....	57
Figura 10 – Metabolismo do naproxeno.....	58
Figura 11 – Estrutura de um lipossoma.....	60
Figura 12 – Representação da polimerização direta entre o fármaco (•) e o polímero....	61
Figura 13 – Estrutura individual polimérica e estrutura da micela.....	61
Figura 14 – Representação de um dendrímero com representação de fármaco encapsulado (•).....	62
Figura 15 – Representação de micropartículas.....	63
Figura 16 – Aparato para obtenção de partículas por meio de gelificação (a) interna e (b) externa.....	66
Figura 17 – Aparato para obtenção de partículas pelo método de gelificação por gotejamento.....	67
Figura 18 – Aparato empregado para produção de partícula em <i>spray-dryer</i>	68
Figura 19 – Composição do fio de seda.....	74
Figura 20 – Representação dos blocos (a) (G) _n , (b) (M) _n , (c) (GM) _n	82
Figura 21 – Modelo de “caixa de ovo” representando a coordenação de cálcio entre um par de cadeias de guluronato.....	83

Figura 22 – Fluxograma geral da metodologia empregada.....	86
Figura 23 – Gráficos de Pareto obtidos a partir da análise dos efeitos das variáveis alginato e cetoprofeno sobre a eficiência de incorporação, carregamento e tempo para liberação de 85% do fármaco.....	102
Figura 24 – Curvas de dissolução das formulações K1 – K4 do planejamento experimental e do Profenid [®] Entérico, obtidas em tampão pH 6,8.....	104
Figura 25 – Difrátogramas obtidos por DRX para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e para a mistura física de sericina e alginato (SerAlg M.F.).....	106
Figura 26 – (A) Difrátogramas obtidos por DRX para as formulações do planejamento experimental (K1 – K7), para o fármaco puro (Ceto) e para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e (B) difratogramas obtidos para as formulações K1 – K4 e para o fármaco puro (Ceto), evidenciando suas intensidades.....	108
Figura 27 – Espectros de FT-IR obtidos para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e para a mistura física de sericina e alginato (SerAlg M.F.).....	109
Figura 28 – Espectros obtidos por FT-IR para as formulações K1 – K7, para o fármaco puro (Ceto) e para a blenda de sericina e alginato (SerAlg).....	111
Figura 29 – Micrografias obtidas por MEV da blenda de sericina e alginato (SerAlg), do cetoprofeno puro (Ceto) e das formulações K1 – K4, nas ampliações de (A) 150x, (B) e (C) 3000x. As micrografias (A) e (B) foram obtidas da superfície externa das partículas e as micrografias (C) a partir do corte da seção transversal das partículas.....	112
Figura 30 – Distribuição de tamanhos obtida para as formulações K1 – K7.....	115
Figura 31 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações K1 – K4.....	116
Figura 32 – Perfis de TG/DTG e DTA obtidos para a sericina e alginato puros.....	118
Figura 33 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (SerAlg), para o cetoprofeno puro (Ceto) e para as formulações K1 – K4.....	119
Figura 34 – Curvas de DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (SerAlg), para o fármaco puro (Ceto) e para a formulação K3.....	121
Figura 35 – Resultados de eficiência de incorporação e carregamento obtidos para as formulações utilizando agentes reticulantes, K-PVA, K-DSP, K-HPMC e K-PA.....	123
Figura 36 – Fórmulas estruturais do PVA, DSP, HPMC e PA.....	124
Figura 37 – Curvas de dissolução das formulações K-PVA, K-DSP, K-HMPC e K-PA obtidas em meio tampão (pH 6,8).....	125
Figura 38 – Eficiência de Incorporação e Carregamento obtidos para formulações com PA.....	127

Figura 39 – Curvas de dissolução <i>in vitro</i> das formulações KPA-1, KPA-2, KPA-3 e K3, obtidos em meio tampão pH 6,8.....	129
Figura 40 – Difrátogramas obtidos por DRX da PA, da blenda de sericina e alginato (SerAlg), da blenda reticulada com PA (BPA) e da mistura física dos componentes da blenda (BPA M.F.).....	130
Figura 41 – Difrátogramas obtidos por DRX do fármaco puro (Ceto), das formulações com PA (KPA-1, KPA-2 e KPA-3) e da formulação K3.....	131
Figura 42 – Espectros obtidos por FT-IR para a PA, a mistura física de sericina/alginato/PA (BPA M.F.), a blenda de sericina e alginato reticulada com PA (BPA) e a blenda de sericina e alginato (SerAlg).....	133
Figura 43 – Espectros obtidos por FT-IR para a blenda reticulada com PA (BPA), para o fármaco puro (Ceto) e para as formulações com PA (KPA-1, KPA-2 e KPA-3).....	134
Figura 44 – Micrografias obtidas da proantocianidina (PA), do cetoprofeno puro (Ceto), da blenda de sericina e alginato (SerAlg), da blenda reticulada com PA (BPA) e das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3, nas ampliações de (A) 150x, (B) e (C) 3000x. As micrografias (A) e (B) foram obtidas da superfície externa das partículas e as micrografias (C) a partir do corte da seção transversal das partículas.....	135
Figura 45 – Distribuição de tamanhos para as formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.....	137
Figura 46 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.....	138
Figura 47 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a PA, blenda de sericina e alginato reticulada com PA (BPA) e formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.....	139
Figura 48 – Perfis de concentração no plasma para formas de liberação sustentada, comparadas às formas de liberação de ordem zero e de liberação imediata.....	144
Figura 49 - Curvas de dissolução <i>in vitro</i> em tampão pH 6,8 das formulações (A) K3 e TK3, (B) KPA-1 e TKPA.....	147
Figura 50 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para as formulações TK3 e TKPA e comparação com as curvas de K3 e KPA-1.....	149
Figura 51 – (A) Demonstração dos blísteres e (B) disposição destes na câmara climática para ensaio de estabilidade acelerado.....	150
Figura 52 – Eficiências de incorporação obtidas no início, após 3 e após 6 meses para as formulações K3 e KPA-1, a partir do ensaio de estabilidade acelerado.....	151
Figura 53 – Carregamento de fármaco das formulações K3 e KPA-1 no início, após 3 meses e após 6 meses de ensaio de estabilidade acelerado.....	152
Figura 54– Curvas de dissolução obtidas para o ensaio de estabilidade acelerado para as formulações K3, KPA-1, TK3 e TKPA, nos períodos inicial, 3 e 6 meses.....	152

Figura 55 – Eficiências de incorporação das formulações K3 e KPA-1 obtidas no estudo de estabilidade de longa duração de amostras analisadas em intervalos de 3 meses....	154
Figura 56 – Carregamentos das formulações K3 e KPA-1 obtidos no estudo de estabilidade de longa duração de amostras analisadas em intervalos de 3 meses.....	154
Figura 57 – Curvas de dissolução <i>in vitro</i> obtidas em tampão pH 6,8 para as formulações K3, KPA-1, TK3 e TKPA ao longo do ensaio de estabilidade de longa duração, em intervalos de 3 meses.....	155
Figura 58 – Imagens de partículas da formulação TK3 obtidas das amostras analisadas em 3, 6, 9 e 12 meses durante o ensaio de estabilidade de longa duração.....	156
Figura 59 – Eficiências de incorporação e carregamentos obtidos para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	158
Figura 60 – Curvas de dissolução obtidas para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	160
Figura 61 – Difratomogramas obtidos por DRX para cetoprofeno puro (NPX), partículas com fármaco (NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG) e partículas sem fármaco (BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG).....	162
Figura 62 – Difratomogramas com ênfase na intensidade dos picos para NPX e as formulações com fármaco (NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG).....	164
Figura 63 – Espectros de FT-IR obtidos para as formulações BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG.....	165
Figura 64 – Espectros obtidos por FT-IR para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	166
Figura 65 – Micrografias obtidas para as formulações BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG da superfície externa em ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal em ampliação de 3000x.....	167
Figura 66 – Micrografias obtidas para o fármaco puro (NPX) a 3000x, e para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG da superfície externa com ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal com ampliação de 3000x.....	169
Figura 67 – Distribuição de tamanhos obtida para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	171
Figura 68 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	172
Figura 69 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações NALG, NSER, NPVA, NDSP e NPEG.....	173
Figura 70 – Gráficos de Pareto obtidos a partir da análise dos efeitos das variáveis alginato e naproxeno sobre a eficiência de incorporação, carregamento e t_{85}	179

Figura 71 – Curvas de dissolução obtidas para as formulações K1 – K4 do planejamento experimental, para a formulação N4* e para o medicamento referência Flanax®, todas em meio tampão pH 7,4.....	181
Figura 72 – (A) Difrátogramas obtidos por DRX para as formulações N1 – N4, para o fármaco puro (NPX) e para a blenda de sericina e alginato (N0) e (B) difratogramas com ênfase à intensidade dos picos das formulações N1 – N4 e do fármaco (NPX)....	182
Figura 73 – Espectros obtidos por FT-IR para as formulações N1 – N4, para o naproxeno puro (NPX) e para a blenda de sericina e alginato (N0).....	184
Figura 74 – Micrografias obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), o naproxeno (NPX) e as formulações N1 – N4, da superfície externa em ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal em ampliação de 3000x.....	186
Figura 75 – Distribuições de tamanhos obtidas para as formulações N1 – N7.....	188
Figura 76 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações N1 – N4.....	190
Figura 77 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações N1 – N4.....	191
Figura 78 – Curvas de DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), para o fármaco puro (NPX) e para a formulação N4.....	192
Figura 79 – Curvas de dissolução <i>in vitro</i> em tampão pH 7,4 das formulações (A) N2 e TN2, (B) N4 e TN4.....	198
Figura 80 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para as formulações TN2 e TN4 e comparação com as curvas de N2 e N4.....	199
Figura 81 – Curvas de DSC obtidas para (A) cetoprofeno puro (Ceto) e formulação KPA-1 e (B) naproxeno puro (NPX) e formulação N4.....	200
Figura 82: Micrografias obtidas por HSM para (a – d) cetoprofeno puro em ampliação de 20x, para (e – h) o corte da seção transversal de KPA-1 e para (i – m) KPA-1 em ampliação de 10x, nas temperaturas de (a, e, i) 30 °C, (b) 92 °C, (c, f, j) 97 °C, (d) 100 °C, (g, l) 220 °C e (h,m) 250 °C.....	202
Figura 83: Micrografias obtidas por HSM para (a – d) naproxeno puro em ampliação de 20x, para (e – h) o corte da seção transversal de N4 e para (i – m) N4 em ampliação de 10x, nas temperaturas de (a, e, i) 30 °C, (b) 155 °C, (c, f, j) 158 °C, (d) 160 °C, (g, l) 220 °C e (h,m) 250 °C.....	203
Figura 84 – Imagens das placas para cultura de células empregadas no ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade após 72 horas de incubação, sendo (A) placas fechadas, (B) placas abertas para demonstração e (C) placas após a adição do MTT..	204
Figura 85 – Viabilidade celular, obtida a partir do ensaio MTT, de células em contato com o controle positivo cloridrato de doxorrubicina, os fármacos puros cetoprofeno	

(CETO) e naproxeno (NPX), as formulações KPA-1 e N4 e as respectivas formulações sem fármaco, BPA e N0.....205

Figura 86 - Micrografias obtidas em ampliação de 50x após a incubação de linhagens de HACAT em contato com cetoprofeno (CETO), naproxeno (NPX), formulações KPA-1 e N4, formulações sem fármaco (BPA e N0), para o controle positivo cloridrato de doxorrubicina (DOX) e para o controle negativo (C0), nas concentrações (A) 0,0001 µg/mL e (B) 100 µg/mL.....207

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interpretação do mecanismo de liberação difusional do modelo de Korsmeyer-Peppas.....	46
Tabela 2 – Trabalhos de aplicação de matrizes poliméricas para incorporação de fármacos.....	69
Tabela 3 – Trabalhos de aplicação de reticulação covalente para aprimorar propriedades de partículas farmacêuticas.....	71
Tabela 4 – Fatores e seus níveis utilizados no planejamento experimental completo.....	90
Tabela 5 – Formulações de cetoprofeno incorporado em blenda de sericina e alginato, obtidas a partir do planejamento experimental, e resultados das variáveis dependentes eficiência de incorporação, carregamento e tempo para liberação de 85%.....	99
Tabela 6 – Fator de similaridade (f_2) <i>in vitro</i> para comparação dos perfis de dissolução obtidos para as formulações e o Profenid® Entérico.....	105
Tabela 7 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações K1 – K7.....	114
Tabela 8 – Liberação em meio ácido para as formulações K-PVA, K-DSP, K-HMPC e K-PA, após 2 horas de ensaio.....	125
Tabela 9 – Formulações de cetoprofeno desenvolvidas utilizando PA como agente reticulante.....	126
Tabela 10 – Liberação de fármaco em meio ácido das formulações KPA-1, KPA-2, KPA-3.....	128
Tabela 11 - Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3 e para a formulação K3.....	137
Tabela 12 – Parâmetros obtidos a partir da modelagem cinética, R^2_{aj} e AIC para as formulações K1 – K7.....	142
Tabela 13 – Parâmetros obtidos da modelagem cinética para as formulações com PA.....	143
Tabela 14 – Liberação de fármaco em meio ácido das formulações KPA-1 e TKPA.....	147
Tabela 15 – Formulações de naproxeno obtidas a partir do estudo da composição da matriz polimérica.....	157
Tabela 16 – Resultados de liberação em meio ácido para formulações com naproxeno.....	159
Tabela 17 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	171

Tabela 18 – Formulações de naproxeno obtidas do planejamento experimental e resultados das variáveis dependentes.....	177
Tabela 19 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações N1 – N7.....	189
Tabela 20 – Parâmetros dos modelos, R^2_{aj} e AIC obtidos a partir da modelagem cinética, para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.....	194
Tabela 21 – Parâmetros obtidos da modelagem cinética para as formulações do planejamento experimental do naproxeno e valores de R^2_{aj} e de AIC para cada modelo ajustado.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
Ala	Alanina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BX	Formulações compostas pela blenda de sericina e alginato, sendo X = PVA, DSP, PEG, SER, ALG
BPA	Formulação composta pela blenda de sericina e alginato reticulada com PA
CBS	Classificação Biofarmacêutica
Ceto/CETO	Cetoprofeno
COXs	Enzimas ciclo-oxigenases
Di	Diâmetro que limita o tamanho de i% do total de amostra, sendo i = 10, 50 ou 90%
DQO	Demanda química de oxigênio
DRX	Difração de Raio-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DSP	Fosfato de sódio dibásico
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Diferencial da análise termogravimétrica
FEQ	Faculdade de Engenharia Química
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
G	α -L-ácido gulurônico
GI	Gastrointestinal
Gly	Glinina
HaCaT	Células do queratinócito humano transformado
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSM	Microscopia <i>Hot-Stage</i>
Ki	Formulações de sericina, alginato e cetoprofeno do planejamento experimental, i = 1 – 7.
Ki*	Formulações de alginato e cetoprofeno

KPA-i	Formulações de sericina, alginato e cetoprofeno reticuladas com PA, $i = 1 - 3$.
K-X	Formulações de sericina, alginato e cetoprofeno reticuladas com X, sendo X = PVA, DSP, HPMC ou PA
LCiMM	Laboratório de Ciências Morfológicas e Moleculares em Farmacologia
LD	Limite de Detecção
LEA	Laboratório de Engenharia Ambiental
LEPA	Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais
LRAC	Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração
M	β -D-ácido manurômico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M.F.	Mistura física
MO	Microscopia ótica
MTT	Sal Tetrazolium (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
N0	Formulação composta pela blenda de sericina e alginato
NaCMC	Carboximetilcelulose sódica
Ni	Formulações de sericina, alginato e naproxeno do planejamento experimental, $i = 1 - 7$.
Ni*	Formulações de alginato e naproxeno
NPX	Naproxeno
NX	Formulações de sericina, alginato e naproxeno obtidas pela variação da matriz polimérica, X = PVA, DSP, PEG, SER ou ALG
PA	Proantocianidina
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Poli(óxido de etileno)
pKa	Constante de ionização
PLGA	Poli(ácido lactico-co-glicólico)

PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
Ser	Serina
SerAlg	Formulação composta pela blenda de sericina e alginato
TG	Análise termogravimétrica
TY	Formulações submetidas à reticulação térmica, Y = KPA, K3, N4 ou N2
USP	Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia)
UV-Vis	Espectroscopia UV/Vísivel

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Unidade
a	Parâmetro de escala	
A	Área	cm ²
$Ab_{controle}$	Absorbância da amostra controle	
Ab_{exp}	Absorbância experimental	
AIC	Critério de Informação de Akaike	
b	Parâmetro correspondente ao formato da curva de dissolução	
C_0	Concentração inicial de fármaco	mg/L
C_o	Concentração de equilíbrio do fármaco em fase orgânica	
C_s	Solubilidade do fármaco na matriz	
C_S	Concentração da solução de sericina	g/L
C_w	Concentração de equilíbrio do fármaco em fase aquosa	
D	Coeficiente de difusão	
f_2	Fator de similaridade	
IC	Inclinação da curva analítica	
k	Constante da taxa de erosão	%/min
K_0	Constante de liberação de ordem zero	%/min
K_1	Constante de liberação de ordem	min ⁻¹
K_H	Constante de dissolução de Hig	%/min ^{1/2}
K_{KP}	Constante da taxa de liberação	min ⁻ⁿ
l	Metade da espessura do sistema	cm
m	Expoente que varia com a geometria	
m_f	Massa final do conjunto placa + sericina	g
m_i	Massa da placa inicial	g
n	Expoente de liberação	
P	Coeficiente de partição	
Q	Quantidade de fármaco liberada no tempo t	mg/L
Q_0	Quantidade inicial de fármaco em solução	mg/L
$\frac{Q_t}{Q_\infty}$	Fração de fármaco liberada no tempo t	
R^2	Coeficiente de determinação	
R^2_{aj}	Coeficiente de determinação ajustado	
R_t	Valor de dissolução referência no tempo t	%

t	Tempo	min
T	Tempo de latência	min
T_d	Tempo para liberação de 63,2% de fármaco	min
T_g	Temperatura de transição vítrea	°C
T_m	Temperatura de fusão	°C
T_{onset}	Temperatura de início de transição	°C
T_t	Valor de dissolução da formulação no tempo t	%
V	Volume	mL
x	Número de pontos da dissolução	
σ	Desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas analíticas	
λ	Comprimento de onda	nm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Motivação para desenvolvimento do trabalho	31
1.2 Objetivos.....	33
1.2.1 Objetivos específicos	34
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 Sistemas de liberação de fármacos	35
2.1.1 Estratégias de formulação para obtenção de liberação controlada de fármacos	37
2.2 Propriedades físico-químicas de fármacos para sistemas de liberação controlada por via oral.....	41
2.2.1 Solubilidade e coeficiente de partição	41
2.2.2 pKa – Constante de ionização	43
2.2.3 Estabilidade	43
2.2.3 Tamanho da molécula e difusividade	43
2.3 Farmacocinética	44
2.3.1 Etapas farmacocinéticas do fármaco no organismo.....	47
2.3.1.1 Absorção	48
2.3.1.2 Distribuição	49
2.3.1.3 Metabolismo (biotransformação).....	49
2.3.1.4 Excreção	50
2.4 Fármacos.....	50
2.4.1 Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais.....	51
2.4.2 Cetoprofeno	52
2.4.2.1 Propriedades físico-químicas do cetoprofeno	53
2.4.2.2 Farmacocinética e biodisponibilidade do cetoprofeno	54

2.4.3 Naproxeno	55
2.4.2.1 Propriedades físico-químicas do naproxeno	56
2.4.2.2 Farmacocinética e biodisponibilidade do naproxeno.....	57
2.5 Sistemas carregadores de fármacos.....	58
2.5.1 Sistemas monolíticos e multiparticulados	63
2.5.2 Métodos para obtenção de partículas carregadas com fármacos.....	64
2.5.3 Aplicação de matrizes poliméricas para encapsulação de fármacos para liberação controlada.....	68
2.6 Sericina	72
2.6.1 Seda e sericultura.....	72
2.6.2 Composição da seda.....	73
2.6.2.1 Fibroína	74
2.6.2.2 Sericina.....	75
2.6.3 Extração de sericina	76
2.6.3.1 Fracionamento e separação da sericina	79
2.7 Alginato	80
2.8 Considerações sobre a revisão bibliográfica.....	84
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
3.1 Material e equipamentos.....	85
3.1.1 Material	85
3.1.2 Equipamentos	85
3.2 Metodologia	86
3.2.1 Preparação dos casulos para extração	87
3.2.2 Extração de sericina	87
3.2.3 Separação e fracionamento de sericina	87
3.2.4 Determinação da concentração de sericina	88
3.2.5 Incorporação de fármaco à blenda de sericina e alginato	88

3.2.6	Preparação das partículas	88
3.2.7	Desenvolvimento de formulações com cetoprofeno.....	89
3.2.7.1	Planejamento experimental	89
3.2.7.2	Avaliação de diferentes matrizes poliméricas	90
3.2.8	Desenvolvimento de formulações com naproxeno.....	91
3.2.9	Caracterização das partículas carregadas com fármacos	91
3.2.9.1	Curvas analíticas do cetoprofeno e do naproxeno	91
3.2.9.2	Eficiência de incorporação de fármaco	92
3.2.9.3	Capacidade de carregamento de fármaco.....	92
3.2.9.4	Cristalinidade.....	93
3.2.9.5	Determinação de grupos funcionais.....	93
3.2.9.6	Análises morfológica	93
3.2.9.7	Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho.....	94
3.2.9.8	Análises térmicas	94
3.2.10	Ensaio de dissolução <i>in vitro</i>	95
3.2.11	Estudo cinético da liberação	96
3.2.12	Estudo de estabilidade.....	96
3.2.13	Estudo da citotoxicidade e viabilidade celular <i>in vitro</i>	97
3.3	Considerações sobre o material e a metodologia	98
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
4.1	Desenvolvimento de formulações com cetoprofeno	99
4.1.1	Planejamento experimental: eficiência de incorporação, carregamento e dissolução <i>in vitro</i>	99
4.1.2	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	103
4.1.3	Caracterização das partículas de cetoprofeno obtidas pelo planejamento experimental	106
4.1.3.1	Cristalinidade.....	106
4.1.3.2	Grupos funcionais	108

4.1.3.3 Análises morfológica	111
4.1.3.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho.....	113
4.1.3.5 Análises térmicas	117
4.1.4 Análise geral da produção de partículas de cetoprofeno incorporado à blenda de sericina e alginato	121
4.1.5 Avaliação de agentes reticulantes covalentes adicionados às partículas de cetoprofeno.....	122
4.1.5.1 Determinação do agente reticulante.....	122
4.1.5.2 Avaliação da concentração de proantocianidina em partículas de cetoprofeno reticuladas covalentemente	126
4.1.6 Ensaios de liberação <i>in vitro</i> das partículas de cetoprofeno reticuladas com proantocianidina.....	128
4.1.7 Caracterização das partículas de cetoprofeno reticuladas com proantocianidina	130
4.1.7.1 Cristalinidade.....	130
4.1.7.2 Grupos funcionais	132
4.1.7.3 Análises morfológica	135
4.1.7.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho.....	137
4.1.7.5 Análises térmicas	139
4.1.8 Análise geral da produção de partículas de cetoprofeno incorporado à blenda de sericina e alginato e reticuladas com proantocianidina.....	140
4.1.9 Avaliação dos mecanismos de liberação do cetoprofeno: modelagem cinética	141
4.1.9.1 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de cetoprofeno	141
4.1.9.2 Análise dos resultados de ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de cetoprofeno	143
4.1.10 Avaliação do processo de reticulação térmica: ensaios de liberação <i>in vitro</i>	146
4.1.11 Caracterização das partículas de cetoprofeno obtidas por reticulação térmica.....	148
4.1.11.1 Análises térmicas	148

4.1.12 Ensaios de estabilidade das formulações de cetoprofeno	150
4.1.12.1 Estudo de estabilidade acelerado	150
4.1.12.2 Estudo de estabilidade de longa duração	153
4.2 Desenvolvimento de formulações com naproxeno	157
4.2.1 Avaliação de diferentes composições da matriz polimérica para incorporação do naproxeno	157
4.2.1.1 Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco	157
4.2.2 Ensaios de liberação <i>in vitro</i>	159
4.2.3 Caracterização das partículas de naproxeno utilizando diferentes matrizes poliméricas	162
4.2.3.1 Cristalinidade.....	162
4.2.3.2 Grupos funcionais	164
4.2.3.3 Análises morfológica	167
4.2.3.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho.....	170
4.2.3.5 Análises térmicas	173
4.2.4 Análise geral da produção de partículas de naproxeno incorporado em diferentes matrizes poliméricas	175
4.2.5 Planejamento experimental: eficiência de incorporação, carregamento e dissolução <i>in vitro</i>	176
4.2.6 Ensaios de liberação <i>in vitro</i>	180
4.2.7 Caracterização das partículas de naproxeno obtidas pelo planejamento experimental	182
4.2.7.1 Cristalinidade.....	182
4.2.7.2 Grupos funcionais	183
4.2.7.3 Análises morfológica	185
4.2.7.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho.....	187
4.2.7.5 Análises térmicas	190
4.2.8 Análise geral da produção de partículas de naproxeno incorporado à blenda de sericina e alginato	193

4.2.9 Avaliação dos mecanismos de liberação do naproxeno: modelagem cinética	193
4.2.9.1 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de naproxeno	193
4.2.9.2 Análise dos resultados de ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de naproxeno	195
4.2.10 Avaliação do processo de reticulação térmica: ensaios de liberação <i>in vitro</i>	198
4.2.11 Caracterização das partículas de naproxeno obtidas por reticulação térmica	199
4.2.11.1 Análises térmicas	199
4.3 Análises complementares das melhores formulações de cetoprofeno e naproxeno	200
4.3.1 Análises térmicas: calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia <i>hot-stage</i> (HSM)	200
4.3.2 Estudo de citotoxicidade e viabilidade celular	204
4.4 Resumo geral dos resultados obtidos	207
5 CONCLUSÕES	212
6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	213
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA	214
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	218

1 INTRODUÇÃO

No presente capítulo serão apresentadas as motivações para o desenvolvimento desse trabalho, bem como os objetivos gerais e específicos necessários para sua realização.

1.1 Motivação para desenvolvimento do trabalho

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo altamente complexo e de alto risco, que demanda um elevado investimento e pode levar anos até que seja finalizado. Sendo assim, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica nos dias de hoje é desenvolver novas formas farmacêuticas a partir de fármacos já existentes, visando modificar as formas de liberação e, assim, melhorar a adesão de pacientes ao tratamento, aumentar sua segurança e eficácia terapêutica. Dentre as modificações nas formas convencionais de medicamentos, pode-se buscar obter uma máxima eficiência terapêutica com o mínimo de dosagens, reduzir ou eliminar efeitos colaterais, atingir ações localizadas ou obter formulações biodegradáveis e fáceis de administrar (DICKSON; GAGNON, 2004; DUTTA, 2007). Nesse contexto, enquadram-se os chamados sistemas de liberação modificada, através dos quais se obtém tempos de liberação do fármaco ou local de liberação variados, evitando problemas como grandes variações de concentração, intoxicação ou ineficiência (BHAGWAT; VAIDHYA, 2013).

Em meio às diversas formas farmacêuticas empregadas em sistemas de liberação modificada por via oral, destaca-se a tecnologia de partículas farmacêuticas, cujo um dos objetivos é aprimorar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em meios aquosos. Isso pode ocorrer através da dispersão do fármaco em uma matriz sólida, por exemplo, a qual vai permitir sua liberação por difusão, erosão, intumescimento, ou uma combinação de mais de um desses mecanismos. Essas partículas, que podem se apresentar na forma de diversas unidades de *pellets*, grânulos ou pequenas esferas, compõem os sistemas multiparticulados e, juntas, as pequenas unidades fornecem a dose total necessária de fármaco. Os sistemas multiparticulados são adequados por sua flexibilidade em atingir diferentes padrões de liberação ou tempo de residência gástrico curto e reprodutível, além do baixo risco de super dosagem (DEY; MAJUMDAR; RAO, 2008; KHADKA *et al.*, 2014).

A tecnologia de partículas farmacêuticas tem sido amplamente baseada no uso de matrizes poliméricas, visando ao controle da liberação de fármacos. No entanto, deve-se

atentar ao polímero utilizado, para que não ocorra a ruptura acidental de partículas ou para que não sejam obtidos tempos tão extensos de liberação que impeçam que ela ocorra ao longo do trato gastrointestinal (JYOTHI; DONIPARTHI, 2014). Visando eliminar essas limitações, pode-se fazer uso de blendas poliméricas, sendo que a blenda de sericina e alginato tem apresentado resultados promissores no que se refere à modificação de liberação de fármacos de uso já consolidado no mercado (KHANDAI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

A sericina, proteína globular macromolecular hidrofílica, é um dos componentes dos casulos do bicho-da-seda, juntamente com a fibroína, atuando como uma espécie de cola que mantém os fios unidos na forma de casulos. Tradicionalmente, costumava ser descartada como resíduo no processo da indústria têxtil, gerando problemas ambientais, principalmente pelo aumento da carga orgânica dos efluentes. No entanto, nas últimas décadas tem aumentado o interesse sobre essa proteína, especialmente por suas propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade, que geram uma ampla gama de aplicações. Dentre as diversas possibilidades, estudos demonstraram a aplicabilidade da sericina como bioadsorvente de corantes (CHEN *et al.*, 2012), metais tóxicos (DA SILVA *et al.*, 2016) e metais preciosos (SANTOS; DA SILVA; VIEIRA, 2018), produção de curativos por sua capacidade de cicatrização (ARAMWIT *et al.*, 2013), como agente para melhorar a digestão ou tratar o sistema digestivo (SASAKI; YAMADA; KATO, 2000), como revestimento para melhorar as propriedades funcionais de fibras sintéticas (GUPTA; CHAUDHARY; GUPTA, 2015) e tecidos de lã (KHALIFA; LADHARI; TOUAY, 2012), como agente de acabamento em filtros de ar domésticos (SAROVART *et al.*, 2003), como agente hidratante em cremes e xampus (VELAZQUEZ PEREDA *et al.*, 2009) e como agente bactericida no revestimento de tecidos de algodão (RAJENDRAN *et al.*, 2012). Além disso, a sericina possui estrutura adequada para reticulação, polimerização e formação de blendas com outros polímeros, o que permite produzir materiais biodegradáveis e ampliar ainda mais sua aplicação (BARAJAS-GAMBOA *et al.*, 2016).

O alginato é um polissacarídeo natural encontrado na parede celular de algas marrons, e que apresenta capacidade de gelificação, principalmente na presença de cátions divalentes, como Ca^{2+} e Ba^{2+} . Apresenta propriedades como biocompatibilidade e não-toxicidade, o que o torna atraente para aplicação nas áreas biomédica e farmacêutica, sendo utilizado na produção de partículas para encapsulação de diferentes bioativos, como fármacos e proteínas, que necessitam de proteção contra a ação ácida e enzimática do

ambiente gastrointestinal (LEE; MOONEY, 2012). É muito comum o estudo de incorporação de fármacos em matriz de alginato, como é o caso do antitumoral doxorrubicina (KIM *et al.*, 2019), os anti-inflamatórios ibuprofeno (SANCHEZ-BALLESTER *et al.*, 2019) e diclofenaco de sódio (GHOSAL *et al.*, 2019) e o diurético clortalidona (FRANÇA *et al.*, 2019).

Trabalhos envolvendo a incorporação de fármacos na blenda de sericina e alginato costumam ser mais escassos. Zhang *et al.* (2015), por exemplo, verificaram o potencial dessa blenda para incorporação de fármacos, enquanto Khampieng *et al.* (2015) avaliaram a eficácia anti-inflamatória da blenda na forma de gel composto por nanopartículas para uso tópico, através de testes *in vivo* e comparação com a ação do gel de diclofenaco. No que se refere a estudos de incorporação, Khandai *et al.* (2010) realizaram a incorporação de aceclofenaco na blenda, enquanto o grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Ambiental e do Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais (LEA/LEPA-FEQ/UNICAMP) tem ampliado esses estudos, com trabalhos envolvendo diclofenaco de sódio e ibuprofeno (VIDART, 2019) e furosemida (BEZERRA, 2018).

Sendo assim, a presente tese demonstra seu ineditismo ao utilizar uma blenda de baixo custo e ambientalmente favorável para incorporação dos fármacos cetoprofeno e naproxeno, visando obter liberação retardada e prolongada. Ambos os fármacos pertencem à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais e podem causar extensos efeitos colaterais, como irritações na mucosa gastrointestinal ou até úlceras gástricas, o que os tornam excelentes candidatos para sistemas de liberação modificada. Tanto o cetoprofeno (AL-TAHAMI, 2014; BONILLA *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2018), quanto o naproxeno (JOSHI *et al.*, 2012; ŞANLI; SOLAK, 2009) já foram reportados em trabalhos de incorporação em partículas de alginato. Porém, não há dados sobre a incorporação de nenhum desses fármacos em blenda de sericina e alginato, corroborando com o desenvolvimento dessa tese.

1.2 Objetivos

O objetivo geral dessa tese é o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada de cetoprofeno e naproxeno por incorporação em blenda de sericina e alginato, visando obter formulações com alta taxa de carregamento, estabilidade físico-química e baixa/nenhuma toxicidade. Para isso, os objetivos específicos expostos a seguir foram delineados.

1.2.1 Objetivos específicos

- Preparação dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*): limpeza e corte;
- Extração da sericina dos casulos do *Bombyx mori* em autoclave pelo método de alta temperatura e alta pressão;
- Crio-concentração da sericina extraída em autoclave por congelamento e descongelamento em temperatura ambiente, e posterior separação da sericina de alta massa molar;
- Formação da blenda de sericina e alginato e posterior incorporação de fármacos, por agitação em Ultraturrax®;
- Produção de partículas de sericina/alginato/fármaco, pelo método de gelificação por gotejamento em solução de CaCl_2 , por meio da técnica de planejamento experimental;
- Avaliação de diferentes agentes reticulantes covalentes;
- Avaliação do processo de reticulação térmica;
- Avaliação da eficiência de incorporação e da capacidade de carregamento do fármaco, visando maximizar ambos os parâmetros;
- Caracterização das partículas com fármaco pelos métodos de Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), Análises Térmicas de Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG/DTG e DTA), para posterior comparação com as caracterizações das partículas sem fármaco;
- Avaliação da liberação do fármaco *in vitro* através de ensaios de dissolução em meio simulado do ambiente gastrointestinal, a fim de obter liberações acima de 300 min para ambos os fármacos;
- Avaliação dos mecanismos de liberação do fármaco por meio do ajuste de modelos farmacocinéticos;
- Estudo de estabilidade das formulações obtidas;
- Análises Térmicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Microscopia *Hot-Stage* (HSM) e;
- Estudo da citotoxicidade e viabilidade celular das melhores formulações obtidas para cada fármaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo, os principais temas referentes ao presente estudo são abordados de forma mais aprofundada, bem como é realizada uma revisão bibliográfica de diversos trabalhos encontrados na literatura sobre o assunto dessa tese.

2.1 Sistemas de liberação de fármacos

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1973), medicamento é todo produto farmacêutico com finalidade profilática, curativa, paliativa ou que é utilizado para fins de diagnóstico, enquanto o fármaco é a substância química usada como ingrediente ativo de um medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Desenvolver novos fármacos é uma tarefa complexa e que carrega muitas incertezas de que o desenvolvimento da substância realmente será bem-sucedido (NORRIS *et al.*, 2014). Como alternativa, é possível buscar melhorar a biodisponibilidade de fármacos já existentes, individualizando a terapia medicamentosa e a titulação da dose, e monitorando sua ação terapêutica. Realizar uma liberação com cinética modificada ou direcionada ao ponto de ação no organismo são outros métodos atrativos no que se refere a melhorar a ação de um fármaco (TIWARI *et al.*, 2012).

O sistema de liberação de fármacos convencional se apresenta na forma de comprimido para administração oral ou solução para administração intravenosa. Em suma, sistemas de liberação convencional são aqueles em que não se adiciona nenhum elemento para modificar qualquer aspecto da liberação do fármaco (RHODES, 2002). No entanto, esses sistemas podem apresentar diversas limitações como maior número de doses, menor eficácia, toxicidade e efeitos colaterais adversos. Nesse contexto, tem-se buscado desenvolver novos sistemas para administração de fármacos já existentes, visando eliminar as limitações supracitadas (BHAGWAT; VAIDHYA, 2013).

Os primeiros testes visando modificar a liberação de um fármaco datam das décadas de 1940 e 1950, quando se buscaram desenvolver revestimentos que pudessem mascarar sabores desagradáveis dos medicamentos. Utilizando materiais metálicos, o fármaco passou a ser liberado de forma retardada, possibilitando o desenvolvimento das primeiras formas farmacêuticas de liberação modificada. Em 1952, foi lançada a primeira formulação de liberação sustentada, conhecida como tecnologia Spansule®, que possibilitava controlar a

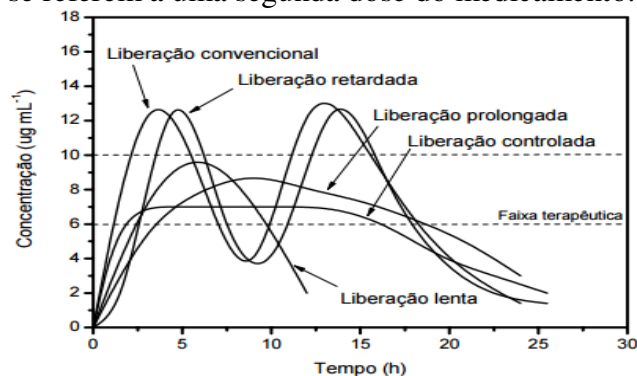
cinética da liberação e atingir uma eficácia terapêutica de até 12 horas. Porém, até então, somente compostos de baixa massa molar eram empregados nos sistemas desenvolvidos. Foi a partir do final da década de 1970 que se passou a desenvolver sistemas de liberação controlada que permitissem a liberação de moléculas maiores, como proteínas e peptídeos (BRUSCHI, 2015; FOLKMAN, 1990).

Os sistemas de liberação controlada fazem parte dos chamados sistemas de liberação modificada, nos quais se alteram a absorção do fármaco ou o local de liberação para atingir determinados objetivos clínicos (QIU; ZHOU, 2011). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010), os sistemas de liberação modificada podem ser classificados como se segue.

- Liberação retardada: nesse tipo de liberação, o fármaco não é liberado imediatamente após sua administração, mas algum tempo depois dessa etapa, como é o caso de comprimidos com revestimento entérico. Preparações gastrorresistentes são consideradas formas de liberação retardada.
- Liberação prolongada: nesse caso, a formulação é elaborada de forma a estender o tempo de liberação do fármaco após sua ingestão, permitindo uma redução na frequência de dosagem. Para aplicações orais, o termo “liberação prolongada” pode ainda ser substituído por “liberação sustentada”, “liberação estendida” ou “liberação controlada”.

Na Figura 1 são apresentados os perfis de variação da concentração de fármaco no plasma, obtidos a partir das formas de liberação convencional, retardada, prolongada e controlada, em função do tempo de liberação.

Figura 1 – Perfis de concentração plasmática de diversos tipos de liberação, convencional e modificada. Os segundos picos presentes nas curvas de liberação convencional e retardada se referem a uma segunda dose do medicamento.



Fonte: Rodrigues (2005).

Pode-se observar que há uma região denominada “Faixa terapêutica”, delimitada pelas linhas de concentração mínima efetiva e de concentração máxima segura, a qual indica a faixa de concentração efetiva para a ação do fármaco no organismo. No sistema de liberação convencional ocorrem grandes variações da concentração, podendo gerar intoxicação ou baixa eficiência do fármaco; já no sistema de liberação controlada, o fármaco é liberado de forma contínua e numa concentração efetiva, ao longo de um período de tempo, melhorando sua eficácia e reduzindo a possibilidade de efeitos colaterais.

Assim, pode-se definir a liberação controlada como aquela em que há o controle espacial e temporal da liberação do fármaco, o que não é possível nas formas de liberação convencionais. Com isso, é possível maximizar o efeito terapêutico, aumentar a ação de fármacos com baixo tempo de meia-vida, reduzir a frequência de dosagens e melhorar a adesão ao tratamento (LEE; LI, 2010). As principais vantagens desses sistemas podem envolver a redução das flutuações de concentração de fármaco no plasma ao longo do tempo, redução de efeitos colaterais, melhora na tolerância por parte dos usuários, maior conforto e mais adesão dos pacientes ao tratamento, redução de custos no cuidado com a saúde (ao reduzir os efeitos colaterais, não é necessário o uso associado de outros medicamentos) e dispensa de dosagens noturnas (UMMADI *et al.*, 2013).

Apesar disso, há ainda algumas limitações associadas aos sistemas de liberação controlada. Neles, há o risco de *dumping* de dose, que é a liberação inesperada de elevada quantidade de fármaco, causada, por exemplo, pela desintegração acidental da forma farmacêutica; não há a possibilidade de interrupção imediata do efeito terapêutico, em casos de intolerância ou intoxicação; e há o risco de ocorrer o acúmulo de fármaco no organismo em função de sua velocidade lenta de liberação. Ainda assim, para casos específicos, trata-se da alternativa mais viável e eficaz (KAUR *et al.*, 2018; LYRA *et al.*, 2007).

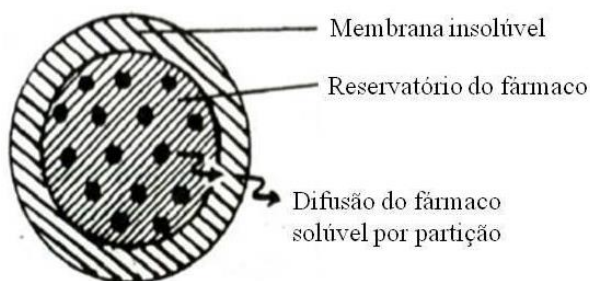
2.1.1 Estratégias de formulação para obtenção de liberação controlada de fármacos

Em geral, obter a liberação controlada de um fármaco é possível graças à utilização de métodos mecânicos, químicos ou físico-químicos aplicados às formas farmacêuticas convencionais para regular tanto o acesso quanto a disponibilidade de um ativo em seu local de ação. Os fármacos de liberação controlada se utilizam de “barreiras” químicas ou físicas que podem atuar proporcionando uma liberação mais lenta. Esses sistemas de

liberação podem apresentar diferentes objetivos, como liberação constante, decrescente (liberação sustentada) ou bimodal (liberação inicialmente lenta, seguida pelo aumento da liberação) (LYRA *et al.*, 2007). Dentre as técnicas de retenção disponíveis mais comuns podem-se citar as bombas osmóticas, os sistemas reservatórios e os matriciais (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Os sistemas reservatórios são amplamente empregados para o controle de bioativos solúveis em água. Neles, o fármaco compõe um núcleo sólido bem definido revestido poliméricamente por um filme ou membrana insolúvel, e esse revestimento deve ser capaz de suportar qualquer força de compactação, podendo sofrer deformação, mas não a ruptura. Isso ajuda a evitar que uma alta dosagem inesperada de fármaco seja liberada. Para manter as propriedades de liberação do fármaco, deve-se atentar ao tipo e à quantidade de revestimento, ao tamanho das subunidades (quando o sistema reservatório consistir em diversas unidades encapsuladas), à seleção de aditivos externos e à taxa e magnitude da pressão aplicada (DING, 2012; QIU; ZHOU, 2011). A Figura 2 apresenta um esquema do sistema reservatório. A liberação do fármaco, nesse caso, ocorre através de partição da membrana e posterior difusão pelo fluido externo (CHOUDHARI; SINGH, 2014).

Figura 2 – Sistema reservatório para liberação controlada de fármacos.



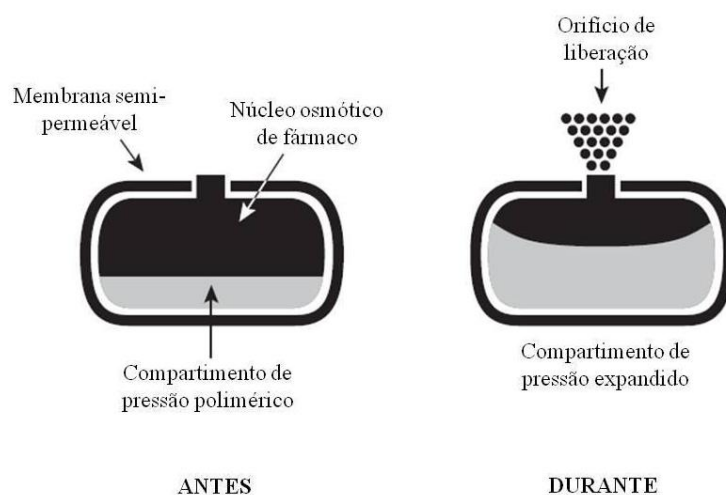
Fonte: Adaptado de Choudhari; Singh (2014).

Os sistemas reservatórios permitem obter liberação de ordem zero (prolongada) e permitem que se controle as taxas de liberação de acordo com o tipo e concentração do polímero escolhido. No entanto, apresenta dificuldade em carregar fármacos de elevada massa molar, apresenta um custo elevado por unidade produzida e pode causar toxicidade no caso de esvaziamento descontrolado (RATNAPARKHI; JYOTI, 2013).

Outro sistema disponível, desenvolvido e comercializado ainda nos anos 1970, são as chamadas bombas osmóticas. Nesse sistema, o fármaco compõe um núcleo osmótico no interior do comprimido, envolto por uma membrana semipermeável, que possui um orifício

de liberação feito a laser. Quando o medicamento se encontra em um ambiente aquoso, ocorre a ativação do sistema pela absorção de água pela membrana. A água dissolve o fármaco e acumula uma pressão hidrostática dentro do núcleo, fazendo com que o fármaco seja bombeado para fora do núcleo através do orifício de liberação, durante um tempo determinado (DING, 2012; LEE; LI, 2010). A Figura 3 apresenta o esquema de um tipo de comprimido produzido com essa tecnologia, no qual se associa uma camada polimérica para atuar na liberação do fármaco. No esquema da Figura, após a ingestão do medicamento, a água é absorvida tanto no compartimento com o fármaco quanto no compartimento polimérico. O fármaco entra em suspensão no compartimento de cima e excipientes osmoticamente ativos da camada polimérica começam a se expandir em uma taxa controlada. Essa camada empurra o fármaco, até que ele seja expelido através do orifício perfurado a laser (CHUNG *et al.*, 1999).

Figura 3 – Sistema de bomba osmótica para liberação controlada de fármacos.



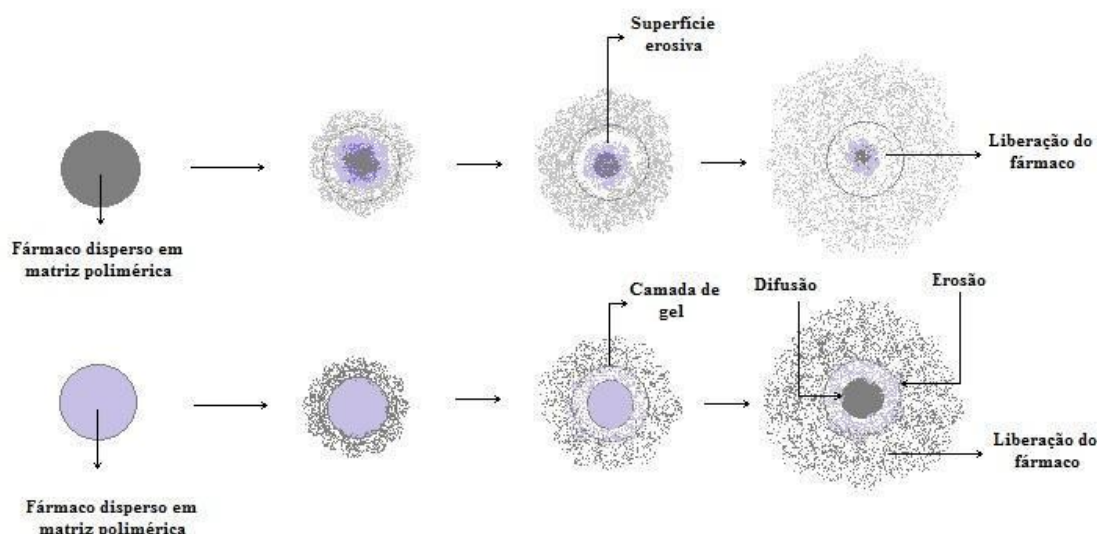
Fonte: Adaptado de Chung *et al.* (1999).

São vantagens desse sistema a possibilidade de realizar a liberação retardada ou de forma pulsada, a liberação independente dos fatores fisiológicos, como o pH do meio, sua ativação dependente da presença de água, que é abundante ao longo do trato gastrointestinal, e possibilidade de taxas de liberação maiores e mais previsíveis. No entanto, é uma tecnologia de custo mais elevado, não permite remediação no caso de efeitos adversos inesperados, pode causar irritação pela liberação de fármaco em solução saturada e se o processo de encapsulamento não for bem controlado pode resultar em super dosagem (MATHUR; MISHRA, 2016).

Os sistemas matriciais são os mais aplicados para controlar a liberação de um fármaco por sua efetividade e versatilidade, podendo ser empregados tanto para formas monolíticas quanto multiparticuladas. Neles, o fármaco forma uma dispersão ou solução homogênea com um ou mais materiais, formando uma matriz que pode, ou não, ser biodegradável, e que permite o controle da liberação por difusão, intumescimento da matriz, por sua erosão, ou por uma combinação desses fenômenos (QIU; ZHOU, 2011). Uma matriz pode ser classificada com base em sua estrutura, na cinética de liberação, nas propriedades da liberação e nas propriedades e natureza química dos materiais empregados. Quanto às características dos materiais empregados, as matrizes se dividem em hidrofílicas (liberação por intumescimento da matriz ou difusão), inertes (liberação por difusão), lipídicas (liberação por difusão e erosão), biodegradáveis (liberação por erosão) e de resinas (liberação complexa dependente da característica iônica do meio) (GANDHI; KAUL; PANCHAGNULA, 1999).

A Figura 4 apresenta um esquema dos tipos de liberação que podem ocorrer em função do tipo de matriz usado. Pode-se observar que, no caso de matrizes poliméricas sujeitas à erosão, esse fenômeno ocorre na superfície da matriz e determina a liberação do fármaco, enquanto no caso de matrizes hidrofílicas, a formação da camada de gel (intumescimento da matriz) e sua dinâmica ao longo do tempo determinam a liberação do fármaco. A espessura dessa camada de gel representa o comprimento do caminho de difusão do fármaco e corresponde à distância entre as frentes de erosão e de difusão (VARMA *et al.*, 2004). Dentre as vantagens dos sistemas matriciais, são mais fáceis de produzir do que os anteriores permitem transportar moléculas grandes de fármacos e melhoram a estabilidade do fármaco ao protegê-lo do trato gastrointestinal. Porém, demanda necessidade de eliminação da matriz vazia, a taxa de liberação pode ser facilmente afetada pelas condições do organismo e não permite a obtenção de liberação de ordem zero pura (RATNAPARKHI; JYOTI, 2013).

Figura 4 – Esquema de liberação de fármaco de sistema de liberação controlada matricial, utilizando (a) matriz polimérica erodível e (b) matriz polimérica hidrofílica.



Fonte: Adaptado de Varma *et al.* (2004).

2.2 Propriedades físico-químicas de fármacos para sistemas de liberação controlada por via oral

A absorção de um fármaco administrado por via oral costuma ocorrer pela sequência de algumas etapas básicas. Após sua ingestão, ele é inicialmente liberado da formulação, se dissolve no fluido gastrointestinal (GI), permeia através da membrana GI e, por fim, atinge a corrente sanguínea (LIN; WONG, 2017). Em sistemas de liberação convencional, a absorção ocorre majoritariamente no trato GI superior, enquanto no caso de formulações orais de liberação controlada, o fármaco é liberado e absorvido de forma contínua no trato GI ou liberado para ser absorvido em uma região específica desse sistema. Como o trato GI apresenta uma elevada complexidade fisiológica, variando desde o estômago até o cólon em termos de composição, estrutura e função, isso afeta diretamente as taxas e extensão da absorção de um fármaco. Sendo assim, ao avaliar a liberação controlada do fármaco, suas propriedades devem ser analisadas em função da posição no trato GI, para os diferentes valores de pH, permeabilidades e estabilidade (ZHANG; SURIAN, 2010). Dentre as propriedades analisadas dos fármacos estão a solubilidade aquosa, pKa, coeficiente de partição, estabilidade, tamanho da molécula e difusividade.

2.2.1 Solubilidade e coeficiente de partição

A solubilidade aquosa de um fármaco depende de sua estrutura química, propriedades físico-químicas de seus grupos funcionais, variações em sua configuração estereoquímica e propriedades de estado sólido, exercendo importante papel sobre a

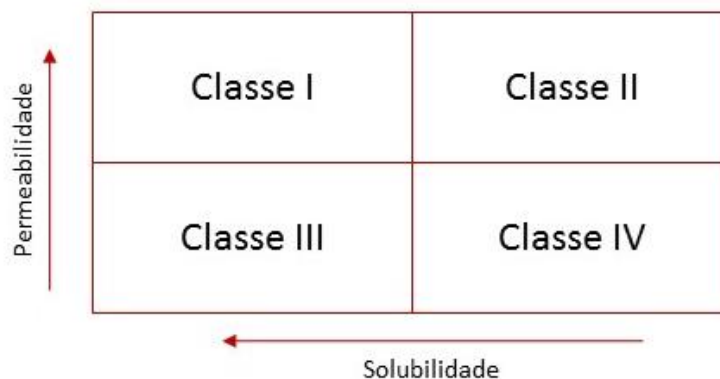
biodisponibilidade do fármaco (ZHANG; SURIAN, 2010). Para ser absorvido, é necessário que o fármaco se dissolva na fase aquosa do local de administração e depois consiga penetrar a membrana absorvente. Assim, a taxa de dissolução é diretamente influenciada pela solubilidade aquosa do fármaco, que estabelece a concentração dele em solução e, assim, a força motriz para difusão através da membrana. Fármacos com baixa solubilidade em água apresentam baixas taxas de dissolução e, portanto, problemas de biodisponibilidade oral. Fármacos com elevada solubilidade e, portanto, altas taxas de dissolução, também não são interessantes devido à dificuldade em retardar a absorção (GUPTA; BRIJESH, 2012).

O coeficiente de partição óleo/água (P), determinado pela Eq. 1, permite avaliar a habilidade do fármaco em penetrar as membranas biológicas do organismo, desde sua administração até sua eliminação. Ele é função da concentração de equilíbrio de todas as formas do fármaco em fase orgânica (C_o) e da concentração no equilíbrio de todas as formas em fase aquosa (C_w).

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad (1)$$

O valor ótimo do coeficiente de partição é aquele em que o fármaco permeia a membrana de forma mais efetiva e, portanto, exerce sua máxima atividade terapêutica. Fármacos com valores acima ou abaixo do valor ótimo não são bons candidatos para formulações de liberação controlada (GUPTA; BRIJESH, 2012). O FDA (do inglês, *Food and Drug Administration* – EUA) utiliza a Classificação Biofarmacêutica para fármacos em quatro classes de acordo com sua solubilidade e permeabilidade, conforme esquema representado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema representativo da Classificação Biofarmacêutica (CBS) obtida da FDA.



Fármacos pertencentes à Classe I apresentam rápida absorção; fármacos da Classe II possuem a absorção controlada pela solubilidade ou velocidade de dissolução; para fármacos da Classe III a absorção é limitada por sua baixa permeabilidade; e os fármacos da Classe IV possuem velocidade e grau de absorção variáveis, devendo ser analisados caso a caso. Em geral, os fármacos pertencentes às Classes I e II costumam ser bons candidatos a sistemas de liberação controlada no trato GI (SACHAN *et al.*, 2009).

2.2.2 pKa – Constante de ionização

O pKa é a medida da força de um ácido ou base e permite determinar a carga (ou estado de ionização) de um fármaco, em diferentes valores de pH. As moléculas do fármaco em sua forma não ionizadas costumam ser lipofílicas e, portanto, atravessam as membranas do organismo de forma mais rápida do que espécies ionizadas, por meio de difusão passiva. A quantidade de fármaco disponível na forma não ionizada depende de sua constante de dissociação e do pH do local de absorção. Fármacos que existem na forma ionizada nos sítios de absorção são interessantes para formas de liberação controlada se estiverem associados a carreadores que possibilitem o transporte ativo através das membranas (MAMIDALA *et al.*, 2009).

2.2.3 Estabilidade

Após sua ingestão, o fármaco passa por diversas hidrólises ácidas e básicas e degradações enzimáticas ao longo do organismo. Um fármaco que não seja estável no pH gástrico pode ser modificado para uma forma liberação retardada que se inicie apenas quando ele atingir o intestino. Fármacos que apresentam instabilidade no intestino não são viáveis para sistemas de liberação controlada (KARNA *et al.*, 2015).

2.2.4 Tamanho da molécula e difusividade

Os fármacos no sistema de liberação controlada devem difundir através de membranas ou matrizes poliméricas, controladoras da taxa de liberação. A habilidade de passar através dessas membranas é estabelecida pela difusividade, que depende do tamanho da molécula (UMMADI *et al.*, 2013). É esperado que moléculas com elevada massa molar apresentem uma cinética de liberação lenta, utilizando a difusão como mecanismo para liberação a partir das membranas ou matrizes (MAMIDALA *et al.*, 2009).

2.3 Farmacocinética

A premissa básica do sistema de liberação controlada de fármacos é otimizar as propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas de um determinado fármaco, administrado pela via mais adequada, para atingir seu potencial terapêutico máximo, no menor tempo possível e com a menor quantidade de fármaco possível (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012). A administração de um fármaco é um processo dinâmico, composto pelas etapas de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E). A taxa com que essas etapas acontecem determina o tempo total do fármaco no organismo. Nesse contexto, a farmacocinética desempenha um importante papel ao descrever o curso de tempo da concentração do fármaco no organismo em termos de modelos matemáticos. Com isso, é possível avaliar a eficiência do fármaco em função da taxa de liberação e da quantidade liberada e ajustar a dosagem para produzir e manter uma concentração terapêutica efetiva, com pouca ou nenhuma toxicidade (BOURNE, 2002).

A ocorrência das etapas de ADME de um fármaco é complexa, o que demanda o uso de modelos matemáticos e estatísticos para ajudar a prever a dose necessária e o tempo de eficácia dessa dose. Em geral, a capacidade de predição de determinado modelo depende da seleção e desenvolvimento adequados de suas funções matemáticas. Os parâmetros mais importantes costumam ser determinados através do ajuste de modelos a dados experimentais (SHARGEL; YU, 2016).

Um sistema de liberação controlada apresenta cinética de ordem zero, na qual a concentração de fármaco permanece constante ao longo do tempo de liberação, ou seja, é capaz de proporcionar a presença do fármaco no organismo a um nível terapêutico durante um longo período de tempo. Esse tipo ideal é interessante, especialmente, para medicamentos como antibióticos, reguladores de pressão e antidepressivos e pode ser representado pela Eq. 2 (UMMADI *et al.*, 2013).

$$Q = Q_0 + K_0 t \quad (2)$$

No qual Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco em solução e K_0 é a constante de liberação de ordem zero, expressa em termos de concentração/tempo.

Na cinética de primeira ordem, a taxa de liberação depende da quantidade de fármaco ainda disponível para liberação e, portanto, a quantidade liberada por unidade de tempo decai exponencialmente. Esse é o modelo que descreve a cinética de sistemas convencionais de liberação de fármaco, nos quais o fármaco não está na condição saturada e, portanto, está pronto para ser liberado da superfície carregadora (CHOUDHARI; SINGH, 2014). As Eq. 3 e Eq. 4 descrevem o modelo de primeira ordem, sendo K_1 a constante de liberação de ordem um, expressa em termos de tempo⁻¹.

$$\frac{dQ}{dt} = -K_1 Q \quad (3)$$

$$\ln Q = \ln Q_0 - K_1 t \quad (4)$$

A liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais pode ocorrer por três processos principais, sendo eles a difusão do fármaco através da matriz não degradada ou a difusão do fármaco devido ao inchamento da matriz ou a liberação do fármaco pela degradação e erosão da matriz. No que se refere ao inchamento da matriz, considera-se a ocorrência de três etapas subsequentes, a saber, a entrada de água dentro do hidrogel, seguida do relaxamento das cadeias poliméricas e por fim o alongamento de todas as cadeias na água, permitindo a saída do fármaco (ARIFIN; LEE; WANG, 2006; FAN *et al.*, 2008). Para prever os mecanismos envolvidos, diversos modelos matemáticos podem ser empregados.

O modelo teórico de Higuchi é um dos modelos mais empregados para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais. Segundo Higuchi, a quantidade de fármaco liberada é proporcional à raiz quadrada do tempo, um indicador da difusão como mecanismo controlador da taxa de liberação. Esse modelo pode ser representado pela Eq. 5 e simplificado pela Eq. 6 (HIGUCHI, 1961, 1963).

$$Q = A\sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad (5)$$

$$Q = K_H \cdot t^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Em que Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t por unidade de área A , C_0 é a concentração inicial de fármaco, C_s é a solubilidade do fármaco na matriz, D é o coeficiente de difusão das moléculas do fármaco e K_H é a constante de dissolução de Higuchi. Higuchi assume que a liberação dos fármacos obedece à lei de difusão de Fick, porém essa relação pode ser insuficiente para casos de sistemas onde ocorre

intumescimento e possível erosão. Assim, é mais aplicado a sistemas com matrizes unidimensionais pouco solúveis (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas foi desenvolvido como uma relação simples para descrever a liberação de fármaco de um sistema polimérico. Para analisar o mecanismo da liberação do fármaco, os primeiros 60% de fármaco liberado são ajustados pela Eq. 7 (RITGER; PEPPAS, 1987).

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_{KP} t^n \quad (7)$$

Em que $\frac{Q_t}{Q_\infty}$ é a fração de fármaco liberada no tempo t , K_{KP} é a constante da taxa de liberação e n é o expoente de liberação. Para encontrar o valor de n , deve-se utilizar apenas os dados de $\frac{Q_t}{Q_\infty} < 0,6$. Além disso, o valor de n permite caracterizar o mecanismo envolvido na liberação do fármaco, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Interpretação do mecanismo de liberação difusional do modelo de Korsmeyer-Peppas.

Expoente de liberação (n)		Mecanismo de liberação do fármaco
Cilindro	Esfera	
0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anômala
0,89	0,85	Transporte de Caso II
$n > 0,89$	$n > 0,85$	Transporte de Super Caso II

Fonte: Dash *et al.* (2010).

A Eq. 7 costuma ser empregada para descrever liberações em que o mecanismo não é bem conhecido ou que pode envolver mais de um fenômeno para liberação, tais como o transporte de fármaco obedecendo a Lei de Fick (difusão Fickiana) e o inchamento/relaxamento do gel com transição de um estado semirrígido para outro mais flexível (Transporte Caso II). Ou seja, não só a difusão do fármaco é levada em conta, como também o relaxamento do gel para liberação desse fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo de Weibull é um modelo empírico e que, portanto, não apresenta qualquer fundamento cinético. No entanto, costuma ser empregado com sucesso a quase todos os tipos de curvas de dissolução, conforme a Eq. 8 (SHAIKH; KSHIRSAGAR; PATIL, 2015).

$$Q = Q_0 \left[1 - \exp \left(\frac{-(t - T)^b}{a} \right) \right] \quad (8)$$

Em que Q é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t , Q_0 é a quantidade total de fármaco a ser liberada, T é o tempo de latência obtido a partir dos parâmetros de dissolução, a é um parâmetro de escala que descreve a dependência do tempo e b corresponde ao formato da curva de dissolução. De acordo com esse parâmetro, a curva de dissolução pode assumir um formato exponencial ($b = 1$), sigmoidal ($b > 1$) ou parabólico ($b < 1$) (RODRIGUES, 2005). O parâmetro a pode ser substituído pelo parâmetro de localização T_d ($a = (T_d)^b$), que representa o tempo necessário para liberação de 63,2% de fármaco (SONI; CHOTAI, 2010).

O modelo de Hopfenberg pode ser aplicado a sistemas com superfícies erodíveis com diversas geometrias e que apresentam uma cinética de liberação de ordem zero. Nesse caso, as resistências difusionais internas e externas não exercem qualquer influência. Pode ser descrito pela Eq. 9 (SHAIKH; KSHIRSAGAR; PATIL, 2015).

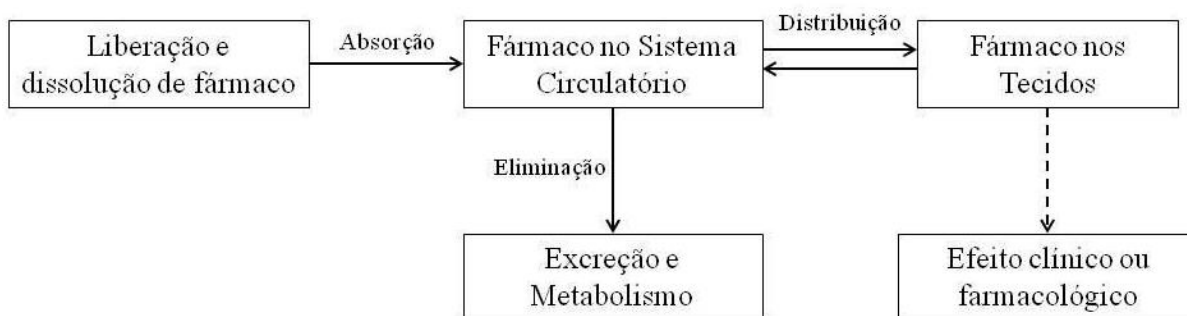
$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k \cdot t}{C_0 \cdot l} \right]^m \quad (9)$$

No qual k é a constante da taxa de erosão, C_0 é a concentração inicial de fármaco, l é a metade da espessura do sistema (equivalente ao raio em esferas ou cilindros), m é um expoente que varia com a geometria ($m = 1, 2, 3$ para geometria plana, cilíndrica e esférica, respectivamente).

2.3.1 Etapas farmacocinéticas do fármaco no organismo

Ao administrar um fármaco, por via oral, subcutânea ou transdermal, sua absorção procede por um intervalo de tempo finito, seguida pela distribuição, metabolismo e excreção, os quais apresentam uma taxa variável de ocorrência. O principal objetivo terapêutico de um fármaco é manter concentrações efetivas no receptor e, considerando que o organismo age constantemente pela eliminação desse fármaco, o grande desafio é balancear as etapas de absorção e eliminação para manter as concentrações desejadas (BOURNE, 2002). O diagrama da Figura 6 demonstra como essas etapas estão interligadas.

Figura 6 – Diagrama representativo das etapas ADME no organismo.



Fonte: Adaptado de Shargel; Yu (2012).

2.3.1.1 Absorção

A absorção de um fármaco envolve o movimento desde sua administração até o compartimento central, que engloba o plasma e o líquido extracelular de tecidos altamente perfundidos (como o pulmão), além da extensão com que isso ocorre. Formas farmacêuticas sólidas, por exemplo, após sua desintegração e liberação do fármaco, necessitam da etapa de dissolução desse fármaco em algum meio aquoso para, então, seguir com a etapa de absorção através das membranas celulares do sistema circulatório (BUXTON; BENET, 2006).

A absorção de um determinado fármaco depende de suas propriedades físico-químicas, como solubilidade e permeabilidade, da natureza do medicamento e da anatomia e fisiologia do sítio de absorção desse fármaco, o que inclui pH, diferenças de permeabilidade, enzimologia da mucosa, dentre outros. O processo de absorção pode ocorrer por via transcelular, quando o fármaco se move através da célula, ou por via paracelular, quando ele se move através de junções entre as células. Além disso, sua difusão através das células pode ocorrer de forma passiva, quando passa de uma região mais concentrada para uma região menos concentrada, sem gasto de energia, ou de forma ativa, quando há a mediação de um carreador levando o fármaco contrário ao gradiente de concentração, com gasto de energia (GERK; YU; SHARGEL, 2012).

A absorção de forma passiva é a mais comum, sendo que pode ocorrer ao longo de todo o canal alimentar, o que inclui absorções sublingual, bucal, gastrointestinal e retal. No entanto, o sítio ótimo para absorção desses fármacos engloba a porção superior do intestino delgado e a região do duodeno, as quais apresentam elevada área superficial que possibilita a difusão do fármaco. Tal absorção pode ser facilmente afetada por diversos fatores como

mudanças no fluxo sanguíneo do meio entérico, no tempo de esvaziamento do estômago, no pH gástrico (afeta a solubilidade), no pH intestinal (afeta a extensão da ionização), na secreção de suco biliar, na secreção de enzimas digestivas ou na alteração da flora do sistema gastrointestinal (GERK; YU; SHARGEL, 2012).

2.3.1.2 Distribuição

Seguida da absorção, ocorre a distribuição do fármaco para os fluidos intersticiais e intracelulares. A taxa de liberação e a quantidade distribuída para dentro dos tecidos dependem da hemodinâmica do tecido, da difusão passiva através das membranas lipídicas no caso de moléculas pequenas e lipofílicas, da difusão ativa mediada por um carreador no caso de moléculas maiores ou mais polares e das ligações com proteínas presentes no sangue, que podem limitar o acesso dos fármacos aos tecidos (CALDWELL; GARDNER; SWALES, 1995). As moléculas de fármaco podem ser distribuídas tanto para o local alvo (receptor) para a ação do fármaco, quanto para outros tecidos (não-receptores), onde podem ocorrer efeitos secundários ou reações adversas (SUN; ZHAO, 2012).

A distribuição ocorre através do sistema circulatório, composto por diversos vasos sanguíneos, que permitem distribuir o fármaco pelo sangue. Ela ocorre de forma rápida e depende das características individuais de cada paciente, tais como frequência cardíaca, fluxo sanguíneo na região, permeabilidade dos capilares e do volume do tecido em que será distribuído (BUXTON; BENET, 2006) e das características físico-químicas do fármaco. Fármacos mais lipofílicos apresentam melhor distribuição em órgãos e tecidos, enquanto fármacos hidrofílicos costumam se concentrar nas células (SUN; ZHAO, 2012).

2.3.1.3 Metabolismo (biotransformação)

Quando um fármaco entra no organismo, ele pode ter quatro destinos diferentes: ser eliminado sem mudança (compostos fortemente polares ou voláteis), ser retido sem mudança (compostos não polares, fortemente lipofílicos), passar por uma transformação química espontânea ou passar por um metabolismo enzimático, sendo esse último, também chamado de biotransformação, o que predomina (CALDWELL; GARDNER; SWALES, 1995).

No organismo, vários órgãos são capazes de metabolizar fármacos em diversos graus, através de diferentes reações enzimáticas. Rins, trato gastrointestinal, pulmões e pele

contribuem com o metabolismo de fármacos; no entanto, é o fígado que apresenta a maior quantidade e variedade de enzimas capazes de metabolizar essas substâncias. As enzimas hepáticas modificam quimicamente diversos substituintes dos fármacos, tornando-os inativos ou facilitando sua eliminação, através do processo chamado biotransformação. Essa biotransformação pode ocorrer devido a reações de oxidação/redução ou devido a reações de conjugação/hidrólise (reações de Fase I e de Fase II, respectivamente), que permitem expor grupos funcionais nas moléculas de fármaco, que vão se ligar a ligantes endógenos. É comum que alguns fármacos sejam administrados em sua forma inativa e, por meio de reações de oxidação/redução no fígado, eles se alterem metabolicamente à forma ativa (LAMATTINA; GOLAN, 2009).

A etapa de metabolismo pode ser diretamente afetada por fatores que influenciem principalmente a atividade enzimática, abrangendo aspectos endógenos (idade, sexo, raça, deficiências genéticas), exógenos (dose, rota de administração, hora da administração, nutrição) e físico-químicos do fármaco (polaridade, nucleofilicidade, ou reatividade do nucleófilo, capacidade de ligação proteica) (CALDWELL; GARDNER; SWALES, 1995).

2.3.1.4 Excreção

A queda dos níveis de fármaco no plasma após sua administração é decorrente de sua eliminação ou remoção pelo organismo. A eliminação da maioria dos fármacos está relacionada aos fenômenos de biotransformação e de excreção, sendo a excreção equivalente à remoção da substância intacta e de seus metabólitos. Em geral, fármacos não voláteis e polares passam direto do rim para as bexigas e, por fim, para a urina, para ser excretado. Outros meios de excreção envolvem ainda a bile, suor, saliva, leite (através da lactação) ou outros fluidos corporais. Fármacos voláteis podem ser excretados também através dos pulmões, pelo ar respirado (DUCHARME, 2012).

2.4 Fármacos

Os fármacos empregados em sistemas de liberação modificada pertencem, em sua maioria, a cinco categorias. A primeira delas são os fármacos anti-hipertensivos, que envolvem a hidralazina, nefedipina e enalapril. Outra categoria envolve os fármacos anti-inflamatórios não esteroides, que incluem a aspirina, diclofenaco, cetoprofeno, paracetamol e naproxeno. A categoria dos diuréticos engloba acetozolamida, clortiazida e ureia. Os fármacos para prevenção de úlceras envolvem ranitidina, omeprazol e pantoprazol. Por fim,

a última categoria são os agentes hipoglicêmicos orais, nos quais estão incluídos glipizida, clorpropamida e acetoexamida (UMMADI *et al.*, 2013).

2.4.1 Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo para o tratamento de dores e inflamações, abrangendo cerca de 5 – 10% de todos os medicamentos prescritos a cada ano (WONGRAKPANICH *et al.*, 2018). O primeiro fármaco desenvolvido pertencente a essa classe foi o ácido acetilsalicílico (AAS), introduzido comercialmente em 1899 sob o nome de aspirina. Porém, foi somente na década de 1960 que se passou a estudar profundamente o mecanismo de ação dos AINEs, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos, como indometacina e ibuprofeno (HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2013; VANE; BOTTING, 1998).

A ação terapêutica dos AINEs ocorre pela inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COXs), as quais são determinantes na síntese de prostaglandinas e outros prostanoides, como os tromboxanos. Os prostanoides são importantes mediadores fisiológicos e patológicos, diretamente associados a quadros de inflamações. São conhecidos dois tipos de ciclo-oxigenases, COX-1 e COX-2. A COX-1 atua em células normais, visando controlar a barreira mucosa gastrointestinal, a homeostase renal, a agregação plaquetária, dentre outras funções fisiológicas. Já a COX-2 é induzida em células inflamatórias, produzindo prostaglandinas diretamente associadas à inflamação, dor e febre. Sendo assim, pode-se considerar que a inibição da COX-2 está associada aos efeitos desejáveis dos AINEs (anti-inflamatório e analgésico), enquanto a inibição da COX-1 representa os efeitos indesejados, ou colaterais, decorrentes da ação dos AINEs (WONGRAKPANICH *et al.*, 2018).

Em geral, por se tratar de medicamentos de terapia de curta duração, os usuários dos AINEs acabam tolerando bem o seu uso. Porém, quando o tratamento é mais longo ou estão envolvidos outros fatores de risco, é comum o surgimento de efeitos adversos afetando os sistemas gastrointestinal, renal ou cardiovascular. No que se refere ao trato GI, é muito comum o relato de indigestão, azia e náusea, os quais são facilmente diagnosticados e controlados clinicamente. Em menor frequência, efeitos mais sérios como úlceras ou lesões no trato GI inferior, também podem ser causados pela ingestão dos AINEs. Também se associam ao uso desses medicamentos problemas como insuficiência renal aguda ou

crônica, e complicações cardiovasculares, como hipertensão e risco de infarto do miocárdio (HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2013).

2.4.2 Cetoprofeno

O cetoprofeno pertence ao grupo dos ácidos 2-fenil-propionícos substituídos. Ele foi sintetizado em 1967 e aprovado para uso clínico em 1973. Desde então, diversas formas têm sido empregadas para sua comercialização, como cápsulas, soluções injetáveis, supositórios e géis de uso tópico (KANTOR, 1986). Uma cápsula de liberação controlada para administração de dose única diária foi introduzida inicialmente no Reino Unido e diversos estudos têm explorado esse potencial (JAN *et al.*, 2012; MARCOLONGO *et al.*, 1997; VAITHIYALINGAM *et al.*, 2002). No Brasil, são comercializadas formas farmacêuticas de liberação prolongada do cetoprofeno (150 mg de fármaco em 2 camadas de 75 mg cada), sendo o medicamento referência o Bi-Profenid® (Sanofi-Aventis Farmacêutica) e seus genéricos comercializados pela Momenta Farmacêutica, Eurofarma Laboratórios e Germed Farmacêutica; e também a forma farmacêutica de liberação retardada do cetoprofeno, o Profenid Retard® (200 mg de fármaco em forma de desintegração lenta, comercializado pela Sanofi-Aventis Farmacêutica) e seus genéricos, comercializados pela Sanofi Medley Farmacêutica e Aché Laboratórios Farmacêuticos na dosagem de 100 mg (BRASIL, 2019).

O cetoprofeno apresenta ação inibidora não seletiva de ciclooxigenases, ou seja, atua inibindo a produção tanto de COX-1 quanto de COX-2. Ao inibir essa produção, obtêm-se efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antitérmicos e antitrombóticos (CASTAGNETTI; MARIELLA, 2015). Trata-se de um fármaco que é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal com tempo de meia-vida de 2 a 4 horas, estimando-se que 50% da dose administrada é excretada na urina após 6 horas de sua administração. Por apresentar uma queda brusca de seus níveis no plasma, é comum necessitar de frequentes administrações para manter seus níveis terapêuticos. Além disso, o cetoprofeno, quando exposto ao meio gástrico em elevadas concentrações, pode causar irritações na mucosa gastrointestinal, e até mesmo úlcera gástrica ou hemorrágica. A necessidade de diversas administrações diárias e a ocorrência de efeitos adversos no trato gastrointestinal tornam o cetoprofeno um excelente candidato para sistemas de liberação controlada (MOREIRA *et al.*, 2012).

Morley *et al.* (1984) compararam a eficácia e tolerância ao tratamento com cetoprofeno, submetendo 46 pacientes com osteoartrite no quadril a formulações comerciais convencionais (*Orudis*, 100 mg, Sanofi-Aventis) ou de liberação controlada (*Oruvail*, 100 mg, Sanofi-Aventis) desse fármaco. A eficácia do tratamento foi similar para ambas as formas farmacêuticas, no entanto, a forma de liberação controlada foi melhor tolerada pelos pacientes, tendo sido reportados menos efeitos colaterais pelos pacientes submetidos a essa medicação. Houghton *et al.* (1984) também compararam os dois medicamentos supracitados, obtendo maiores tempos para atingir o pico de concentração máxima (4,9 h) e de meia-vida de eliminação (8,4 h) para a forma de liberação controlada (*Oruvail*). Possivelmente, esse maior tempo de meia-vida ocorreu, pois, a taxa de liberação do fármaco foi mais lenta que sua taxa de eliminação, tornando a liberação a etapa limitante do processo.

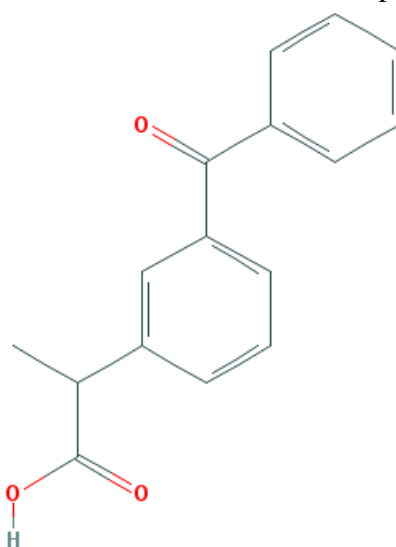
Visando à obtenção de sistemas de liberação controlada, diversos estudos avaliaram a incorporação de cetoprofeno em diferentes matrizes proteicas, como é o caso do alginato, mediante ensaios *in vitro* (AL-TAHAMI, 2014; CHENG *et al.*, 2018) e *in vivo*, por meio de testes utilizando ratos, nos quais se observou ausência de alterações na mucosa gástrica quando o fármaco se encontrava incorporado na matriz de alginato (TOUS *et al.*, 2014). Ainda podem ser encontrados trabalhos utilizando outros polímeros como polivinilpirrolidona – PVP (FRANCO; REVERCHON; DE MARCO, 2018), polietilenoglicol – PEG (CHOI *et al.*, 2007) e hidroxipropilmetilcelulose – HPMC (BORAH; BORUAH; KALYANAPPA, 2016) para incorporação do cetoprofeno.

2.4.2.1 Propriedades físico-químicas do cetoprofeno

O cetoprofeno, com fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$, pode apresentar como nomes químicos ácido m-benzoilhidratrópico, ácido α -(3-benzoilfenil) propiônico e ácido 2-(3-benzoilfenil) propiônico. Sua massa molar é de 254,29 mol/g e apresenta coloração branca, ausência de odor e forma de pó com formação de uma poeira irritante. O ponto de fusão varia entre 92 °C e 97 °C e sua decomposição ocorre em cerca de 223 °C, de acordo com dados da literatura. É solúvel em éter, etanol, acetona, clorofórmio, dimetilformamida, octanol, acetato de etila, benzeno e álcalis fortes, mas praticamente insolúvel em água (0,01 g/L a 37 °C). Apresenta coeficiente de partição (log P) de 3,31, sendo classificado como Classe II pela CBS, o que significa que sua baixa solubilidade em água é a etapa limitante à sua absorção e biodisponibilidade. O cetoprofeno é um ácido fraco, com pKa em

água de 4,6 a 5,02, estável à temperatura ambiente (HERNANDEZ, 2004; TAKAGI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009). O cetoprofeno possui em sua estrutura (Figura 7) um carbono assimétrico, o que pode dar origem a dois enantiômeros, R (-) e S (+), sendo o enantiômero S (+) o responsável pelos efeitos farmacológicos. O enantiômero R (-) é terapeuticamente menos ativo ou até inativo (RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009).

Figura 7 – Fórmula estrutural do cetoprofeno.

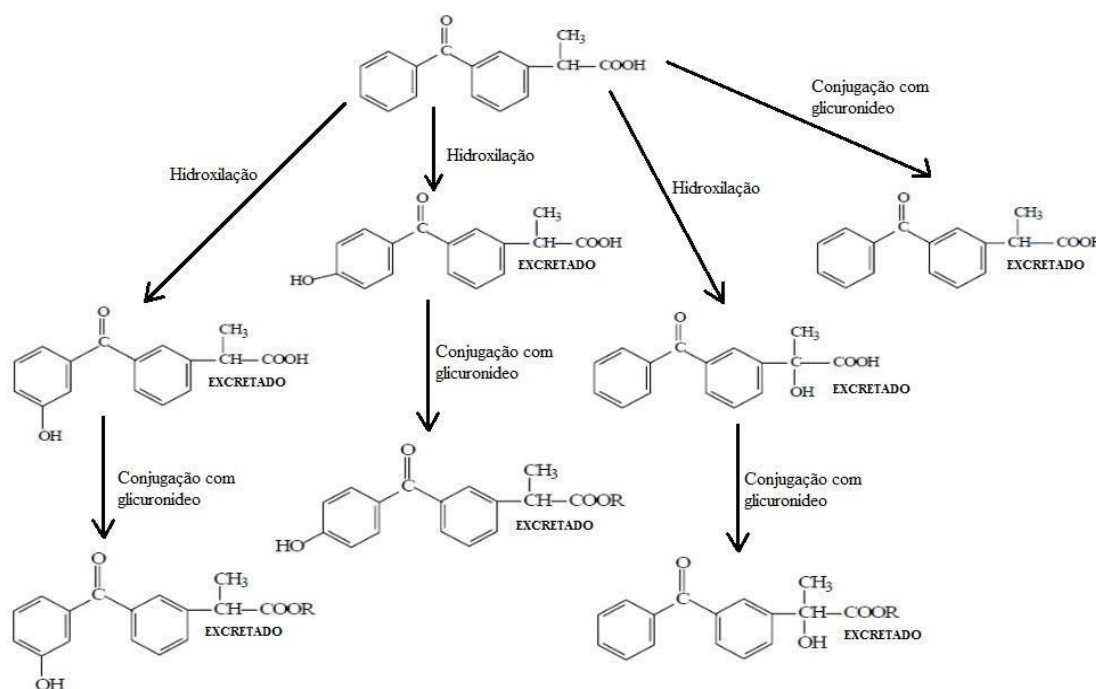


Fonte: Pubchem (2016).

2.4.2.2 Farmacocinética e biodisponibilidade do cetoprofeno

Estudos farmacocinéticos em humanos têm demonstrado que o cetoprofeno administrado por via oral é rapidamente absorvido, metabolizado e excretado, sendo quase totalmente absorvido ainda no trato gastrointestinal, mais precisamente na porção superior do duodeno. Assim, como a maioria dos AINEs, é metabolizado no fígado em metabólitos inativos, como os conjugados com o ácido glicurônico, que são eliminados pelos rins. Uma quantidade muito pequena de cetoprofeno é eliminada do organismo na forma original (EL-KAMEL *et al.*, 2001; RENÇBER; KARAVANA; ÖZYAZICI, 2009). Na Figura 8, apresenta-se um esquema do metabolismo do cetoprofeno.

Figura 8 – Metabolismo do cetoprofeno.



Fonte: Adaptado de Rençber; Karavana; Özyazici (2009).

2.4.3 Naproxeno

O naproxeno, anti-inflamatório derivado do ácido propiônico, foi descoberto por Harrison *et al.* (1970) e comercializado a partir de 1976 pelo Laboratório Syntex, atingindo a liderança de vendas dentre os fármacos AINEs em 1991 (HARRINGTON; LODEWIJK, 1997). Atualmente, é comercializado sob a forma de comprimidos ou cápsulas de liberação imediata, retardada ou controlada, ou ainda sob a forma de suspensão oral, géis ou supositórios, ao redor de todo o mundo (LEHNE, 2013). Porém, no Brasil, apenas as formas de comprimidos de liberação imediata podem ser encontradas comercialmente na forma de medicamentos referência (Flanax, 275 mg e 550 mg, Bayer AG), similares ou genéricos, comercializados pela Neo Química (550 mg) e Laboratório Teuto (250 mg e 500 mg) (BRASIL, 2019; HUGHES; KAHL, 2019).

O naproxeno também é um inibidor não seletivo das ciclooxigenases, atuando como forte inibidor da COX-1 e inibindo a COX-2 em até 71% (BATLOUNI, 2009). Seu tempo de meia-vida no plasma é variável e relativamente alto, entre 12 – 17 h, o que o torna um analgésico mais efetivo quando comparado a outros AINEs, além de ter demonstrado proteção cardiovascular em alguns pacientes em função dessa característica (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006). Em função dos efeitos colaterais indesejados associados

ao seu uso, é interessante avaliar a modificação de sua liberação, especialmente no que se refere a obter uma forma de liberação retardada, evitando possíveis efeitos colaterais ou prolongar sua liberação, para evitar picos de concentração no plasma. Kelly *et al.* (1989) compararam formas de liberação sustentada e de liberação convencional de naproxeno, obtendo que a forma de liberação sustentada promoveu menor taxa de absorção do fármaco, porém mantendo a extensão de absorção similar, ou seja, a biodisponibilidade do naproxeno foi mantida mesmo sob a forma de liberação sustentada. Wanwimolruk; Lipschitz; Roberts (1991) avaliaram a biodisponibilidade e farmacocinética da forma de liberação controlada do *Naprosyn* (500 mg, Roche) em comparação ao mesmo medicamento na forma de liberação convencional (2 doses diárias de 250 mg), em seres humanos. A forma controlada atingiu a máxima concentração no plasma em um maior tempo do que a forma convencional, demonstrou menor variação de concentrações no plasma e atingiu menor pico de concentração do naproxeno, porém sem alterar a extensão de absorção do fármaco.

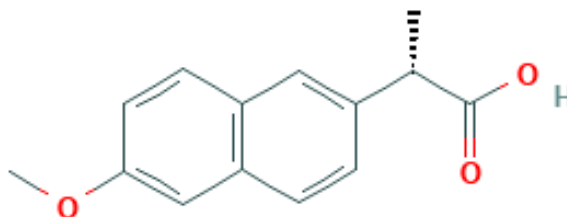
Na literatura, são encontrados trabalhos que avaliaram a incorporação do naproxeno em diferentes matrizes poliméricas, visando modificar sua liberação ou obter um novo sistema de liberação para esse fármaco, como é o caso do poliuretano (AKDUMAN; ÖZGÜNEY; KUMBASAR, 2016), fibroína (DYAKONOV *et al.*, 2012), hidroxipropilmetilcelulose – HPMC (HADI *et al.*, 2014) e goma de gelano (OSMALEK *et al.*, 2018).

2.4.3.1 Propriedades físico-químicas do naproxeno

O naproxeno (Figura 9), disponível como ácido (+)-2-(6-metoxi-2-naftil) propiônico ou (+)-2-(6-metoxi-2-naftil) propionato de sódio, possui fórmula molecular $C_{14}H_{14}O_3$ ou $C_{14}H_{13}NaO_3$, e massa molar 230,2 ou 252,2 mol/g. Se apresenta como um pó cristalino branco, solúvel em metanol, moderadamente solúvel em etanol, pouco solúvel em acetona e insolúvel em clorofórmio, tolueno e água ($1,6 \cdot 10^{-2}$ g/L a 25 °C). Apresenta pKa de 4,15, sendo considerado um ácido fraco, ponto de fusão de 155,3 °C e coeficiente de partição (log P) de 2,97, sendo classificado como Classe II pela CBS, cuja biodisponibilidade é limitada pela dissolução no trato GI (LI; COOPER, 2012; TAKAGI *et al.*, 2006; XU; MADDEN, 2011; YALKOWSKY; HE; JAIN, 2010). Por pertencer à classe dos ácidos propiônicos, possui em sua estrutura um carbono quiral e que, portanto, apresenta duas formas racêmicas, os enantiômeros R (-) e S (+), sendo o enantiômero S (+) o que apresenta

significado farmacológico. No entanto, desde sua descoberta em 1970, o naproxeno é comercializado exclusivamente na forma opticamente pura S (+), o que é uma exceção dentre a maioria dos AINEs, mas ajuda a evitar problemas de interferências enantioméricas, que são capazes de afetar a farmacodinâmica e farmacocinética da espécie de interesse (HARRINGTON; LODEWIJK, 1997; MOUELHI *et al.*, 1987).

Figura 9 – Fórmula estrutural do naproxeno.

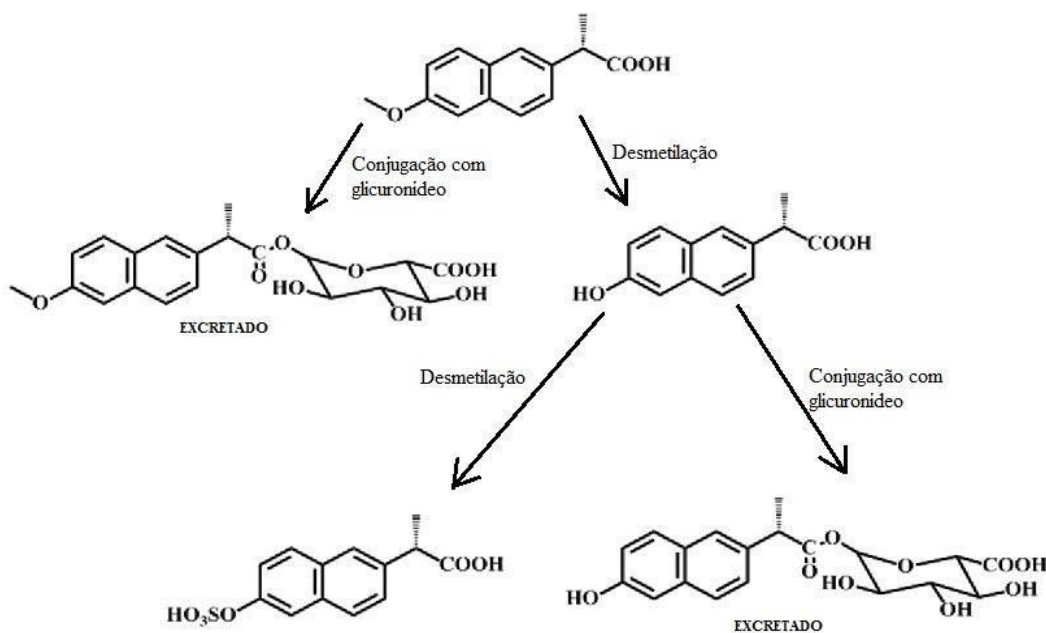


Fonte: Pubchem (2019).

2.4.3.2 Farmacocinética e biodisponibilidade do naproxeno

Quando administrado por via oral ou retal, o naproxeno é rápida e completamente absorvido, gerando picos de concentração em cerca de 2 h. Comprimidos produzidos a partir do naproxeno sódico demonstraram maior taxa de absorção com maiores concentrações no plasma quando comparados a comprimidos produzidos a partir do ácido livre de naproxeno. No entanto, esse fato não demonstrou interferência no efeito terapêutico obtido (DAVIES; ANDERSON, 1997). Sua eliminação se dá predominantemente pelos seus metabólitos, sendo apenas 10% excretado na forma original, através da urina. As principais rotas metabólicas do naproxeno envolvem a conjugação com glicuronídeo (60%) e a desmetilação seguida de conjugação com glicuronídeo (28%) (VERBEECK; BLACKBURN; LOEWEN, 1983). Na Figura 10, apresenta-se um esquema do metabolismo do naproxeno.

Figura 10 – Metabolismo do naproxeno.



Fonte: Adaptado de Sanoh *et al.* (2012).

2.5 Sistemas carregadores de fármacos

Há algumas décadas, os sistemas de liberação modificada de fármacos vêm sendo amplamente estudados com o objetivo de desenvolver formas farmacêuticas para liberação no local adequado do organismo e na dosagem correta, minimizando possíveis efeitos colaterais. Nos últimos anos, diversos sistemas de liberação inteligentes nas escalas micro e nano têm sido investigados, visando maximizar o efeito terapêutico de fármacos por sua capacidade de perceber e responder diretamente às condições fisiopatológicas. São os chamados carregadores ou vetores de fármacos, que podem ser formados por materiais inorgânicos, lipídicos, poliméricos ou ainda nanotubos de carbono (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

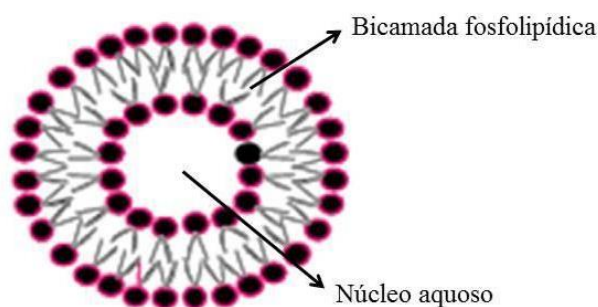
Dentre os materiais inorgânicos comumente empregados como vetor experimental de fármacos, podem se destacar as nano partículas de metais e de óxidos de metais, como de ouro ou de óxido de ferro, ou ainda fosfato de cálcio, que podem ser produzidas via sol-gel, por reações de hidrólise e condensação, por secagem por pulverização (*spray dryer*) ou por microemulsões (RIVERA GIL *et al.*, 2010). O uso de materiais inorgânicos é atraente devido à sua versatilidade, elevada disponibilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade de controlar a liberação quando atuando como carregadores de fármacos (XU *et al.*, 2006). No entanto, dependendo do caso, podem apresentar as desvantagens de não

biodegradabilidade e acúmulo no organismo após uma administração sistêmica (LIU *et al.*, 2016). Além disso, poucos estudos investigaram os efeitos dessas nano partículas sobre o organismo humano a longo prazo, em termos de toxicidade, imunogenicidade e carcinogênese, o que pode ainda limitar seu emprego comercialmente.

Considerando os sistemas experimentais, os nanotubos de carbono se destacaram, desde sua descoberta, como um excelente material estrutural, especialmente por suas propriedades mecânicas, elétricas e de superfície. Além disso, possui elevado volume interno, o que permite carregar pequenas biomoléculas e, ainda, possui superfície externa que pode ser quimicamente modificada, possibilitando que sejam usados para carregar proteínas e genes e, assim, melhorar a eficácia da liberação do fármaco. Dentre os diversos sistemas em escala nano, os nanotubos de carbono se destacam por sua elevada capacidade de carregamento de fármaco e possibilidade de incorporar elementos adicionais terapêuticos ou para fins de diagnóstico, seja na superfície ou em suas cavidades internas. Como desvantagens, podem-se citar sua baixa solubilidade em meios aquosos e toxicidade causada por sua superfície hidrofóbica, as quais podem ser modificadas pela funcionalização de sua superfície (RASTOGI *et al.*, 2014; SAFARI; ZARNEGAR, 2014; XU *et al.*, 2006).

No mercado farmacêutico existem diversos sistemas de liberação modificada disponíveis, baseados principalmente em lipídeos, como os lipossomas, e em polímeros, como os dispositivos de silicone. Os lipossomas são vesículas constituídas por um núcleo aquoso envolto por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, que se auto estruturam quando as moléculas de fosfolipídios entram em contato com soluções aquosas. No que se refere à encapsulação de fármacos, os lipossomas oferecem diversas possibilidades devido à sua habilidade em acomodar tanto fármacos hidrofóbicos, intercalados dentro da bicamada lipídica, quanto hidrofílicos, intercalados dentro do núcleo aquoso (DUTTA, 2007). Lipossomas apresentam como vantagens a melhora da eficácia terapêutica do fármaco, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, redução da exposição de tecidos sensíveis a fármacos tóxicos e flexibilidade para acoplar ligantes específicos para atingir o destino certo do fármaco. No entanto, pode apresentar elevado custo, baixo tempo de vida e baixa solubilidade. Dentre os fosfolipídios mais usados, encontra-se a fosfatidilcolina (ANWEKAR; PATEL; SINGHAI, 2011). A Figura 11 apresenta a estrutura do lipossoma.

Figura 11 – Estrutura de um lipossoma.



Fonte: Adaptado de Safari; Zanegar (2014).

Desde 1964, quando se descobriu a capacidade de pequenas moléculas de fármaco em difundir através da parede de tubos de silicone a uma taxa controlada, os polímeros têm sido objeto de cada vez mais estudos para atuarem como vetores de fármacos. O interesse sobre os polímeros reside na possibilidade de manipular sua produção para atender requisitos específicos, facilidade de produção em escala industrial e facilidade de controle das propriedades físico-químicas durante sua síntese (GRUND; BAUER; FISCHER, 2011). Em geral, os polímeros empregados devem ser biocompatíveis, a fim de que não ocorram reações ou toxicidade em tecidos ou órgãos vivos. É interessante ainda que os polímeros biocompatíveis sejam também biodegradáveis, evitando assim a necessidade de procedimentos cirúrgicos para sua remoção, e que apresentem resistência mecânica para atender as necessidades de aplicações específicas, solubilidade em diferentes solventes, estrutura versátil e tempo de validade economicamente aceitável (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Dentre as estruturas poliméricas comumente encontradas, estão os dendrímeros, micelas e micro/nano esferas/cápsulas. Além dessas estruturas, os fármacos também podem ser carregados por conjugados poliméricos, em que o fármaco e o polímero sofrem polimerização direta e a liberação ocorre quando esse agregado sofre hidrólise ou quebra enzimática (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Dentre as vantagens desses conjugados, estão a possibilidade de melhorar a solubilidade do fármaco ao conjugá-lo com um polímero solúvel, obter liberação controlada e alterar a farmacocinética e a biodistribuição do fármaco. A limitação desses sistemas está exatamente na estabilidade do conjugado. Conjugados pouco estáveis podem liberar o fármaco prematuramente, enquanto os mais estáveis podem retardar a liberação, mesmo quando se atinge o sítio desejado. Assim, há uma necessidade de se balancear a estabilidade e a liberação do fármaco, os

quais podem impactar diretamente a saúde e eficácia do tratamento (LARSON; GHANDEHARI, 2012). Na Figura 12 é apresentado um esquema de conjugado polimérico.

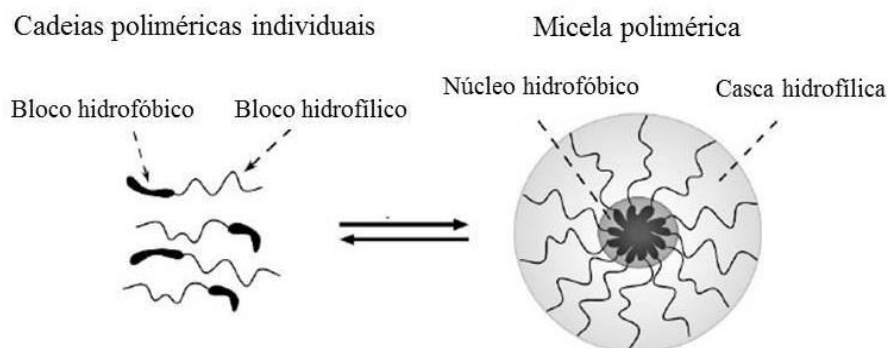
Figura 12 – Representação da polimerização direta entre o fármaco (●) e o polímero.



Fonte: Adaptado de Villanova; Oréfice; Cunha (2010).

As micelas compõem um sistema auto estruturado de núcleo-casca em que um polímero anfifílico se agrega espontaneamente ao entrar em contato com soluções aquosas, em condições de concentração e temperatura ideais. Para que as micelas se mostrem adequadas à aplicação farmacêutica, é esperado que seus polímeros formadores sejam biodegradáveis e/ou possuam baixa massa molar, o que ajuda na sua eliminação, evitando o acúmulo no organismo e consequente efeito tóxico. Dentre os compostos mais comuns para a formação da casca hidrofílica se destaca o polietilenoglicol (PEG) ou poli (óxido de etileno) (PEO), compostos pelo mesmo monômero de repetição ($\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O}$), diferenciados apenas pelo processo de síntese (BATRAKOVA *et al.*, 2006). Nas micelas, o fármaco é fisicamente encapsulado no núcleo hidrofóbico e fica protegido contra a hidrólise e a degradação enzimática. Essa proteção dada ao fármaco permite aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis ou ainda que fármacos em geral sejam encapsulados em concentrações que ultrapassem sua solubilidade aquosa (BHAGWAT; VAIDHYA, 2013). A Figura 13 apresenta um esquema da estrutura polimérica de micela.

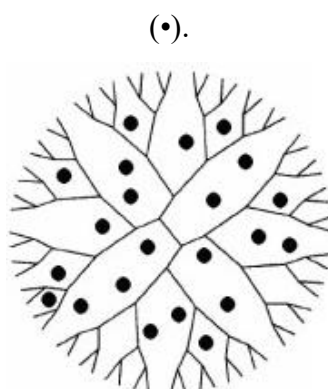
Figura 13 – Estrutura individual polimérica e estrutura da micela.



Fonte: Adaptado de Batrakova *et al.* (2006).

Os dendrímeros compõem mais um tipo de estrutura polimérica para carregamento de fármacos e, em geral, consiste de três componentes principais: o núcleo, blocos estruturais com diversas camadas constituídas por unidades repetidas e múltiplos grupos funcionais periféricos. Trata-se de uma estrutura tridimensional, multiramificada, monodispersa e de alta funcionalidade. Dentre suas vantagens destacam-se a alta densidade e reatividade dos grupos periféricos que permitem a fácil modificação de moléculas em sua superfície, a reprodutibilidade da farmacocinética pela estrutura globular bem definida e massa molar previsível, o tamanho controlável para aplicação biomédica, sua facilidade de penetrar através das membranas celulares, as metodologias de produção bem definidas, a facilidade de programação da liberação de bioativos e o aumento do tempo de residência do fármaco e proteção contra o ambiente gastrointestinal. As moléculas dos fármacos podem ser encapsuladas nas cavidades internas vazias dos dendrímeros ou podem se conjugar à sua estrutura através de ligações covalentes superficiais. A Figura 14 apresenta a estrutura de um dendrímero com a representação de um fármaco encapsulado (CHENG *et al.*, 2008; SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Figura 14 – Representação de um dendrímero com representação de fármaco encapsulado



Fonte: Adaptado de Cheng *et al.* (2008).

As micropartículas envolvem partículas na faixa de tamanho de 1,0 micra até alguns milímetros, sendo facilmente administradas por via oral, intramuscular ou subcutânea. Essas estruturas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas, sendo as microcápsulas semelhantes a sistemas reservatórios, em que o fármaco está localizado no núcleo de uma casca polimérica contínua de espessura finita, e as microesferas caracterizadas como um sistema sólido, semelhantes a um sistema matricial, com o fármaco distribuído homogeneamente em toda sua estrutura (PARIDA *et al.*, 2013). Com as micropartículas, é possível proteger o fármaco do ambiente gastrointestinal, obter

estabilidade de fármacos sensíveis, eliminar incompatibilidades e mascarar sabores desagradáveis, tudo isso utilizando métodos simples de produção (KUMAR *et al.*, 2011). Na Figura 15 estão representadas as formas de micropartículas possíveis.

Figura 15 – Representação de micropartículas.



Fonte: Adaptado de Singh *et al.* (2010).

2.5.1 Sistemas monolíticos e multiparticulados

Um medicamento pode conter um ou mais fármacos, os quais podem ser administrados em uma forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida, através da via mais adequada, sendo a mais comum a forma farmacêutica sólida de uso oral (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). No contexto das formas modificadas de liberação de fármaco, essas formas farmacêuticas sólidas de uso oral podem ser administradas em sistemas monolíticos ou multiparticulados (ZERBINI; FERRAZ, 2011).

Os sistemas monolíticos se referem a um sistema de dosagem única (comprimido ou cápsula), em que cada unidade contém uma dose única do fármaco disperso em uma matriz inerte, a ser administrado individualmente e com a liberação controlada principalmente por difusão. São vantagens desse sistema a produção simples e custo-benefício, a vasta gama de excipientes e polímeros disponíveis para liberação controlada do fármaco e a possibilidade de utilizar diferentes mecanismos para controlar a liberação (GANDHI; KAUL; PANCHAGNULA, 1999). No entanto, os sistemas multiparticulados têm demonstrado elevado potencial em comparação aos sistemas monolíticos por sua flexibilidade de formulação, maior biodisponibilidade do fármaco por eliminar as flutuações de concentração de fármaco no plasma e maiores benefícios terapêuticos ao paciente, como menor risco de irritação local, menor toxicidade e esvaziamento gástrico previsível (GANDHI; BAHETI, 2013; ZERBINI; FERRAZ, 2011).

O uso do conceito de sistemas multiparticulados teve início na década de 1950 e se refere às formas de dosagem oral constituídas por diversas pequenas unidades, na forma de *pellets*, grânulos ou pequenas esferas veiculadas em cápsulas gelatinosas duras, cada uma apresentando as características desejadas. Juntas, essas pequenas unidades são capazes de fornecer a dose necessária total do fármaco a ser liberado de forma controlada. Esse sistema apresenta algumas vantagens como a dispersão dos *pellets* no trato gastrointestinal, maximizando a absorção do fármaco; a redução do tempo de passagem pelo organismo, minimizando possíveis variações no plasma; evita picos de concentrações, que poderiam ser irritativos; quando em formulações de liberação modificada, são menos suscetíveis a dosagem extra; melhores propriedades de fluxo e estreita distribuição de tamanhos de partículas; apresentam forma ideal para aplicação de revestimento de filme e podem ter sua aparência e propriedades organolépticas melhoradas; e apresentam flexibilidade para outras modificações, como por exemplo, sofrer compressão para formar comprimidos ou serem revestidos para obter a forma de dosagem requerida (GANDHI; KAUL; PANCHAGNULA, 1999).

Sendo assim, diversas tecnologias têm sido estudadas no sentido de produzir as pequenas unidades que compõem os sistemas multiparticulados. Hoje, muitos dos produtos comercializados seguindo a estrutura multiparticulada são voltados à proteção do fármaco ou mascaramento de sabores, através de um revestimento próprio, ou ainda ao controle da liberação do fármaco. Para a escolha da melhor técnica de produção desses sistemas, costumam-se considerar variáveis como custo, perfil de liberação desejado (desde liberação imediata até os vários tipos de liberação modificada) e propriedades do fármaco (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

2.5.2 Métodos para obtenção de partículas carregadas com fármacos

Para produção de partículas carregadas com fármacos, costuma-se fazer uso da técnica de encapsulação, definida como o empacotamento de moléculas sólidas, líquidas ou gasosas no interior de uma camada de revestimento fina e contínua, a qual é composta em geral por um ou mais polímeros (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2005). Na área farmacêutica, a encapsulação é bastante aplicada visando obter formas de liberação prolongada ou com revestimento entérico, para mascarar o sabor de medicamentos amargos, para administrar medicamentos oleosos na forma de comprimidos, para proteger o fármaco da umidade, luz, oxigênio e calor do ambiente, para separar substâncias

incompatíveis, para reduzir a volatilidade de fármacos, para reduzir a necessidade de manuseio de substâncias tóxicas e para reduzir irritações gástricas (SINGH *et al.*, 2010).

Diversas técnicas estão disponíveis para incorporar sólidos e líquidos no interior de revestimentos poliméricos ou em matrizes. A escolha do método mais adequado depende da matéria-prima a ser utilizada e das características de solubilidade do fármaco que será incorporado (KUMAR *et al.*, 2011). Além disso, alguns requisitos devem ser atendidos para a preparação das partículas, como capacidade de incorporar concentrações relativamente elevadas de fármaco, bom controle da liberação do fármaco em uma larga escala de tempo e estabilidade da preparação, com uma vida útil clinicamente aceitável (PARIDA *et al.*, 2013).

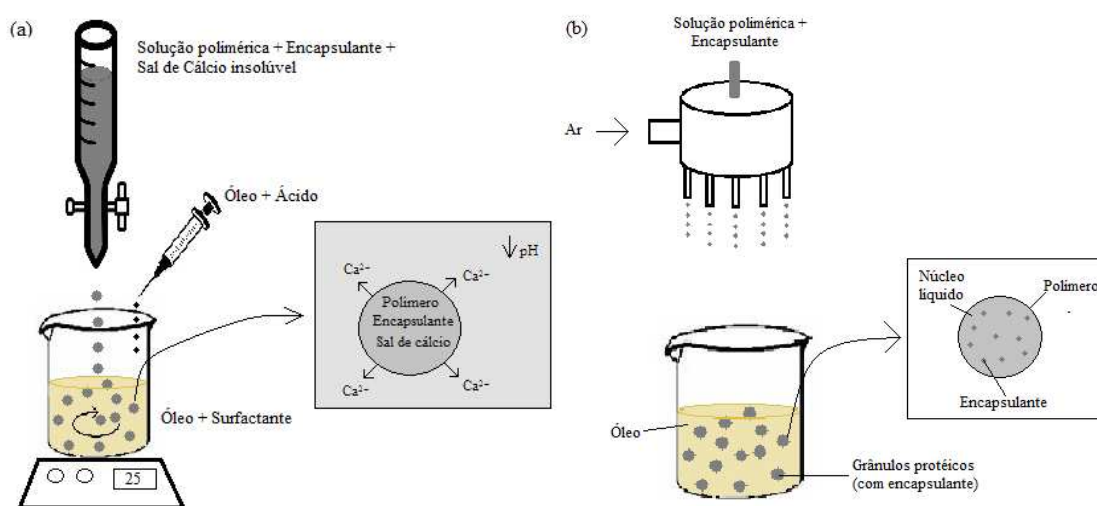
As técnicas empregadas na preparação das partículas podem ser de natureza química, quando envolve a ocorrência de reações químicas e utiliza monômeros ou pré-polímeros como matéria-prima, ou de natureza física e mecânica, quando não ocorrem reações químicas, mas sim a produção direta da partícula utilizando os próprios polímeros como matéria-prima. Dentre os métodos químicos, podem-se citar a polimerização por suspensão ou por emulsão e métodos de dispersão e interfaciais, sendo a polimerização por emulsão amplamente empregada para incorporação de fármacos. Já os métodos físicos e mecânicos são mais amplos e podem englobar reticulação por suspensão, evaporação/extração com solvente, coacervação/separação de fases, *spray drying*, revestimento em leito fluidizado, solidificação por fusão, precipitação, co-extrusão e deposição em camadas, sendo a evaporação/extração com solvente o método mais comum para preparação de partículas (KUMAR *et al.*, 2011). No que se refere à formação de partículas a partir do biopolímero alginato, tem-se feito extenso uso da técnica de gelificação iônica (KHAZAEI; PARDAKHTY; HASSANZADEH, 2008; MANDAL *et al.*, 2010; PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012), assim como o tem sido para a produção de partículas de sericina e alginato, visando incorporação de fármacos (KHANDAI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

A gelificação iônica é um processo de formação de partículas baseado na capacidade que determinados polieletrólitos possuem de se reticularem na presença de íons de carga oposta, formando grânulos de hidrogel. A formação desses grânulos ocorre ao gotear a solução polimérica em uma solução aquosa de cátions polivalentes, que se difundem no interior das gotas poliméricas e formam uma rede tridimensional reticulada

ionicamente. Trata-se de uma técnica facilmente afetada por fatores como concentração do polímero e do eletrólito reticulante, pela temperatura e pH da solução reticulante. Dentre os polieletrólitos mais utilizados para produção de partículas a partir dessa técnica se encontram os polímeros naturais alginato, quitosana, colágeno e ácido hialurônico, e os monômeros/polímeros sintéticos acetato de vinil, hidroxietil metacrilato e PEG-metacrilato (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012).

A gelificação iônica pode ocorrer por diferentes métodos, como por exemplo, gelificação por emulsão interna ou externa, gelificação por gotejamento e gelificação por *spray drying*. É uma técnica simples e de baixo custo, porém é de difícil aplicação industrial pelo elevado tempo necessário para formação das partículas (MENEZES *et al.*, 2015). A Figura 16 apresenta os esquemas da gelificação por emulsão interna e externa.

Figura 16 – Aparato para obtenção de partículas por meio de gelificação (a) interna e (b) externa.

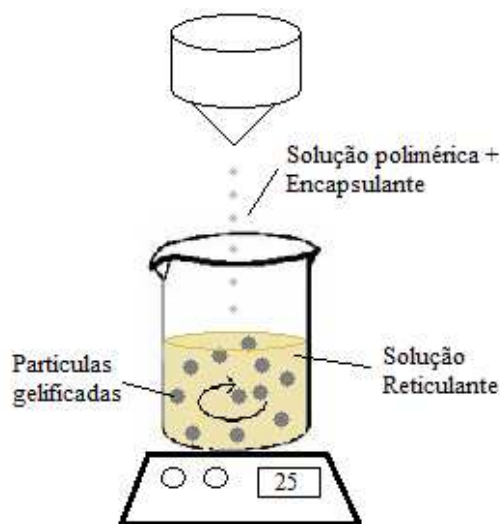


Fonte: Adaptado de Martínez *et al.* (2012) e Menezes *et al.* (2015).

Na gelificação interna, uma solução de sal de cálcio pouco solúvel em água é dispersa na solução polimérica (por exemplo, solução de alginato). Essa suspensão é emulsificada em óleo na presença de um surfactante, e posteriormente a emulsão é acidificada para solubilizar os íons de cálcio para gelificação dos grânulos protéicos. Já na gelificação externa, a solução protéica contendo o fármaco é gotejada em uma solução oleosa e depois o agente reticulante (por exemplo, CaCl_2) é adicionado para início da gelificação. O tamanho das partículas depende do sistema de extrusão empregado para o gotejamento (SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

A Figura 17 apresenta o aparato necessário para realização da técnica de gelificação por gotejamento. Nessa técnica, a solução polimérica contendo a substância a ser incorporada é gotejada diretamente na solução reticulante e mantida sob agitação constante. Observa-se inicialmente uma gelificação superficial e, ao longo do tempo, a difusão do agente reticulante em direção ao centro da partícula gelificada.

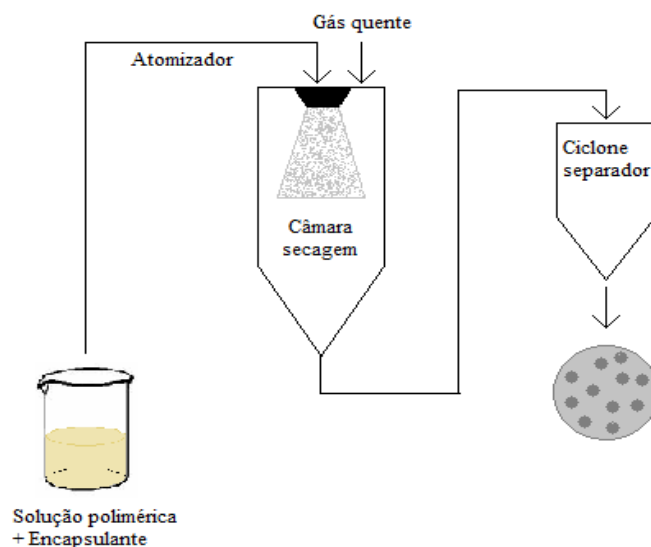
Figura 17 – Aparato para obtenção de partículas pelo método de gelificação por gotejamento.



Fonte: Adaptado de Sacchetin (2009).

O último método de gelificação empregado envolve a utilização de *spray-dryers*, cujo aparato experimental está representado na Figura 18. Nesse método, uma solução polimérica contendo o fármaco é atomizada e pulverizada para dentro de uma câmara de secagem, onde as gotículas são secas por ar quente (MILADI *et al.*, 2014). A rapidez, relativo baixo custo, alta reprodutibilidade e aplicabilidade em escala industrial tornam essa técnica extremamente atrativa. No entanto, apresenta um baixo campo de aplicação, especialmente pela necessidade de uso de alta temperatura, que pode não ser compatível com o agente encapsulado (BURGAIN *et al.*, 2011).

Figura 18 – Aparato empregado para produção de partícula em *spray-dryer*.



Fonte: Adaptado de Burgain *et al.* (2011).

2.5.3 Aplicação de matrizes poliméricas para encapsulação de fármacos para liberação controlada

As partículas farmacêuticas costumam ter como base polímeros, que podem ser tanto sintéticos quanto naturais. Dentre os polímeros sintéticos se destacam o poli (alquilcianoacrilato), o poli (metacrilato de metila) e o álcool polivinílico, enquanto os polímeros naturais podem englobar proteínas (albumina e colágeno), carboidratos (quitosana e amido) e carboidratos quimicamente modificados (amido poliacrílico) (PARIDA *et al.*, 2013). São necessárias algumas condições para a aplicação de um polímero natural como carregador de fármacos, dentre elas a não-toxicidade, não-imunogenicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (ou, pelo menos, que permita a formação de subprodutos de degradação aceitável) e facilidade de esterilização (BATYRBKOV; ISKAKOV; ZHUBANOV, 1998).

A Tabela 2 apresenta diversos trabalhos que utilizaram técnicas de encapsulação para obtenção de partículas com diferentes fármacos, em sistemas poliméricos matriciais, naturais ou sintéticos, com destaque para trabalhos que avaliaram a incorporação dos fármacos cetoprofeno e naproxeno, objetos de estudo da presente tese.

Tabela 2 – Trabalhos de aplicação de matrizes poliméricas para incorporação de fármacos.

Fármaco	Classe Farmacêutica	Matriz Polimérica	Referência
Ibuprofeno	Anti-inflamatório	Proteína da Soja	Wang; Liu; Long (2018)
Amicacina	Antituberculose	Alginato / PLGA	Abdelghany <i>et al.</i> (2019)
Moxifloxacina			
Cloridrato de tetraciclina	Antibiótico	NaCMC/HPMC reticulada com Ácido Cítrico	Dharmalingam; Anandalakshmi (2019)
Ofloxacino	Antibiótico	Goma gelana / PVA	Vashisth <i>et al.</i> (2017)
Itraconazol	Antifúngico	Poli (butil cianoacrilato)	Ćurić; Möschwitzer; Fricker (2017)
Resveratrol	Antioxidante	Sericina	Suktham <i>et al.</i> (2018)
Quercetina	Antioxidante	Alginato / Quitosana	Nalini <i>et al.</i> (2019)
Metronidazol	Antibiótico	Celulose	Dong <i>et al.</i> (2018)
Cloridrato de Propranolol	Anti-hipertensivo	HPMC	Phaechamud; Darunkaisorn (2016)
Naproxeno	Anti-inflamatório	PVP	Bettinetti; Mura (1994)
		HPMC	Katzhendler; Mäder; Friedman (2000)
		Etil Celulose	Iqbal; Babar; Ashraf (2002)
Cetoprofeno	Anti-inflamatório	HPMC / Eudragit® L30D-55	Hales <i>et al.</i> (2017)
		Quitosana / PEG	Chimsook (2013)
		PLGA	Gasmi <i>et al.</i> (2015)

*PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico); NaCMC: Carboximetilcelulose sódica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; PVA: álcool polivinílico; PVP: polivinilpirrolidona; Eudragit® L30D-55: dispersão aquosa de polímeros aniônicos com ácido metacrílico como grupo funcional; PEG: polietilenoglicol; PLGA: poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).

Da Tabela 2, observa-se que dentre os inúmeros trabalhos utilizando matrizes poliméricas para incorporação de fármacos, destacam-se os estudos envolvendo a incorporação de cetoprofeno e naproxeno, objetos de estudo dessa tese. Alguns desses estudos, no entanto, envolvem a utilização de polímeros sintéticos, como o Eudragit® L30D-55 para incorporação do cetoprofeno e o PVP para incorporação do naproxeno. As vantagens de se utilizar polímeros naturais, como a sericina e alginato, estão em sua abundância, relativa facilidade de isolamento, possibilidade de modificação química para atender alguma necessidade e possibilidade de degradação enzimática em organismos humanos, com produtos de degradação biocompatíveis (BHATIA, 2016). No que se refere especificamente aos polímeros utilizados para desenvolvimento dessa tese, é possível encontrar na literatura trabalhos que avaliaram a incorporação de cetoprofeno e naproxeno em matrizes de alginato puro ou em blenda com outros polímeros. Cheng *et al.* (2018) verificaram que o cetoprofeno incorporado em partículas de alginato de cálcio apresentaram característica de liberação imediata. Şanlı; Solak (2009) verificaram que o uso da blenda de alginato/PVA prejudicou a liberação do naproxeno, estabilizando a liberação sempre abaixo de 80%, independente da proporção de polímeros utilizada. Čalija *et al.* (2013) determinaram que formulações de naproxeno incorporado em matriz de alginato não apresentaram característica gastrorresistente. Sendo assim, se propõe a obtenção de formulações gastrorresistentes e de liberação prolongada a partir da incorporação de cetoprofeno ou naproxeno à blenda de sericina e alginato.

É possível que partículas farmacêuticas produzidas a partir de polímeros individuais ou a partir de blendas poliméricas não sejam capazes de atingir determinado objetivo terapêutico, como liberação retardada ou sustentada. Assim, pode-se fazer necessário o uso de algumas técnicas adicionais. A primeira delas é a adição de um agente reticulante covalente, que permite a formação de um hidrogel permanente, pela natureza química irreversível da ligação covalente, além de aprimorar as propriedades mecânicas desse gel (BERGER *et al.*, 2004). Na Tabela 3 são apresentados estudos que fizeram uso da reticulação covalente para aprimorar as propriedades de partículas com diferentes fármacos incorporados.

Tabela 3 – Trabalhos de aplicação de reticulação covalente para aprimorar propriedades de partículas farmacêuticas.

Fármaco	Classe Farmacêutica	Matriz Polimérica	Agente Reticulante	Referência
Cloridrato de tetraciclina	Antibiótico	NaCMC / HPMC	Ácido Cítrico	Dharmalingam; Anandalakshmi (2019)
Cloridrato de propranolol	Anti-hipertensivo	Quitosana / Silicato de Alumínio e Magnésio	Tripolifosfato de sódio	Khlibsuwan <i>et al.</i> (2017)
Fosfato dissódico de dexametasona	Antialérgico e Anti-inflamatório	Gelatina	Lactose	Etxabide <i>et al.</i> (2019)
Ácido Salicílico	Anti-inflamatório	Colágeno / PVA	Glutaraldeído	Zhang; Tang; Zheng (2016)
Curcumina	Anti-inflamatório	Quitosana	Tartarato de disuccinimidila	Nguyen; Tran; Hadinoto (2016)

Dentre os diversos reagentes empregados como agentes reticulantes covalentes de polímeros naturais, pode-se citar o álcool polivinílico (PVA), um polímero sintético não tóxico, quimicamente estável e biocompatível (HE *et al.*, 2017), reportado como reticulante do alginato (ANWAR *et al.*, 2017) e da sericina (CHAO *et al.*, 2018). O polietilenoglicol diglicídico (PEG) também foi reportado como reticulante tanto da sericina (MOTTA *et al.*, 2011) quanto do alginato (WANG *et al.*, 2007). Trata-se de um polímero biocompatível, facilmente sintetizado nas condições de massa molar especificada e em larga escala. O problema é que o PEG não é biodegradável, podendo se acumular no organismo pelo uso contínuo (LARSON; GHANDEHARI, 2012). A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um éter derivado da celulose, solúvel em água, não tóxico, insípido, inodoro e estável às variações fisiológicas (DHARMALINGAM; ANANDALAKSHMI, 2019). Song *et al.* (2018) o utilizaram como reticulante do alginato. Outro reagente reportado como agente reticulante da celulose (WIT, 2015) e da quitosana (FREGNAN *et al.*, 2016) é o fosfato de sódio dibásico (DSP), reagente de baixo custo e que possibilita obter formas farmacêuticas biodegradáveis e biocompatíveis (LI *et al.*, 2011). A proantocianidina (PA), um metabólito natural extraído da semente de uvas, é composta por estruturas fenólicas e apresenta baixa

toxicidade e biocompatibilidade, tendo sido reportada como agente reticulante do colágeno (HAN *et al.*, 2003) e da gelatina (HUANG *et al.*, 2012).

A segunda técnica que pode ser empregada é a reticulação térmica, que é a secagem em temperatura controlada, visando eliminar a umidade presente. Com o rearranjo térmico e a reticulação dos segmentos da cadeia polimérica, é possível melhorar propriedades da matriz polimérica, como por exemplo, sua estabilidade (JIN *et al.*, 2018). Gimenes; Liu; Feng (2007) verificaram que a exposição de uma membrana de sericina/PVA à elevada temperatura foi capaz de melhorar o grau de reticulação, apesar de tornar as membranas mais quebradiças. Mohammed; Hill; Mitchell (2000) verificaram que o aumento da temperatura de secagem aumentou a solubilidade de diferentes proteínas alimentícias. Isso é interessante na área farmacêutica, pois permite a liberação de fármacos de forma controlada.

2.6 Sericina

2.6.1 Seda e sericultura

A seda é uma proteína fibrosa secretada em forma de fio por animais pertencentes ao filo *Arthropoda* e que, geralmente, resulta em estruturas de casulos ou teias. O avanço das tecnologias analíticas tem aprimorado o conhecimento acerca de sua composição e propriedades, sendo os dois tipos mais estudados, a seda do *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda, e a seda produzida por determinadas espécies de aranhas, como por exemplo, *Nephila clavipes* e *Argiope trifasciata*. Diferente do bicho-da-seda, essas aranhas não tiveram sua produção domesticada devido à baixa quantidade de seda que esses animais são capazes de produzir. Além disso, são animais de natureza solitária e predatória, o que dificulta o cultivo em larga escala (GUINEA *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2007).

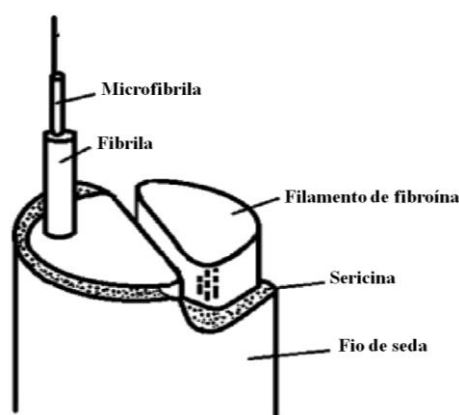
O *Bombyx mori* é nativo da China, mas teve sua domesticação espalhada pelo mundo ao longo dos últimos anos, especialmente em regiões de clima temperado e subtropical, onde é possível produzir filamentos de casulos mais refinados. O cultivo do bicho-da-seda é conhecido como sericultura, a qual é composta por diferentes estágios e de onde se obtém, além da seda, subprodutos como ovos, larva, pupa e fezes, de interesse para as indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de papel e de couro (SINGH; JAYASOMU, 2002).

A seda do *Bombyx mori* domesticado trata-se da mais explorada e caracterizada dentre todas as sedas, especialmente devido à otimização da atividade de sericultura ao longo de milhares de anos na China. Ela consiste em uma fibra têxtil de alto valor comercial, conhecida por seu brilho, conforto e elegância, tendo chegado, no passado, a ser considerada tão valiosa quanto o ouro. Seu uso inicial remete aos tempos de ascensão da China como uma grande civilização e, hoje, apesar de responder por menos de 0,2% do mercado têxtil global, tem sua produção espalhada por cerca de 60 países, com destaque ainda para a China e também para a Índia, de acordo com o Global Silk Production Statistics (2016). No Brasil, a sericultura teve início nos anos 1920, com a vinda de imigrantes italianos, e se organizou comercialmente durante a II Guerra Mundial, com a vinda de imigrantes japoneses. Nos anos 1970, a sericultura se estabeleceu nos estados de São Paulo e Paraná, os quais, até hoje, dominam a produção nacional, sob o controle de interesses japoneses (DATTA; NANAVATY, 2007). Segundo dados do Global Silk Production Statistics de 2018, o Brasil ocupa hoje o 5º lugar dentre os maiores produtores de seda do mundo.

2.6.2 Composição da seda

A fibra da seda produzida pelo bicho-da-seda *Bombyx mori* é composta majoritariamente por duas proteínas, a fibroína em dois filamentos na camada interior, revestida por uma camada exterior de sericina, além de outras impurezas naturais como gorduras, ceras, sais inorgânicos e pigmentos (MONDAL; TRIVEDY; KUMAR, 2007; UDE *et al.*, 2014). A sericina constitui 25 – 30% da fibra da seda e age como um envelope para manter os filamentos de fibroína unidos e ajudar na formação dos casulos, dando forma e estabilidade estrutural a eles (ZHANG, 2002). A Figura 19 apresenta um esquema da composição do fio de seda.

Figura 19 – Composição do fio de seda.



Fonte: Adaptado de Ude *et al.* (2014).

2.6.2.1 Fibroína

Dentre as duas proteínas que compõem o fio de seda do *Bombyx mori*, a principal componente é a fibroína, formada por duas cadeias proteicas: uma cadeia pesada (fibroína-H) de massa molar aproximadamente igual a 350 kDa, e uma cadeia leve (fibroína-L) de massa molar de cerca de 26 kDa (LIU; ZHANG, 2014). A composição básica da fibroína de cadeia pesada inclui repetições dos aminoácidos alanina e glicina, com serina e tirosina (ALTMAN *et al.*, 2003). A fibroína de cadeia leve apresenta uma composição padrão de aminoácidos, com uma sequência não repetitiva de leucina, isoleucina, valina e aminoácidos acídicos. É altamente aceitável dizer que a composição geral da fibroína apresenta uma sequência repetitiva $(\text{Gly-Ala})_n$, em uma conformação de folhas- β antiparalelas, predominantemente formada por regiões cristalinas, conectadas por regiões amorfas ou não-cristalinas. A cristalinidade da fibroína provém da repetição da sequência Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser em sua composição geral (LIU; ZHANG, 2014; TAKEI *et al.*, 1987).

A fibroína é uma proteína natural fibrosa e insolúvel em água, devido às suas altas concentrações de aminoácidos hidrofóbicos (MORAES *et al.*, 2010). Costuma ser empregada em aplicações biomédicas, principalmente em suturas, por suas propriedades de biocompatibilidade, podendo ser comparada a biomateriais mais comumente usados, como colágeno e ácido polilático (ALTMAN *et al.*, 2003). Também pode ser empregada para produção de membranas, aplicadas a processos de separação, para produção de pele artificial e, mais recentemente, para sistemas de liberação de fármacos modificada (MONDAL; TRIVEDI; KUMAR, 2007).

2.6.2.2 Sericina

A sericina, conhecida como cola de seda, é a segunda proteína que compõe o fio da seda, conferindo a ele dureza e resistência. Ao remover a sericina, o fio se torna macio, brilhante, suave e mais apto ao tingimento de suas fibras, o que é fundamental para aplicação na indústria têxtil. A sericina costuma ser descartada como resíduo desse processo, sem utilização imediata, sendo que de cada 400.000 t de casulos secos, estima-se que cerca de 50.000 t de sericina são geradas para descarte (LAMBONI *et al.*, 2015; PADAMWAR; PAWAR, 2004). Os efluentes contendo sericina são ricos em matéria orgânica e, para que seja degradada, os micro-organismos demandam uma elevada quantidade de oxigênio. Assim, em função da alta DQO (demanda química de oxigênio) há uma tendência em esgotar o oxigênio dissolvido nos corpos d'água, ameaçando as vidas aquáticas ali presentes (CAPAR; AYGUN; GECIT, 2008).

A sericina é uma proteína globular macromolecular com massa molar desde 10 até mais de 300 kDa e apresenta, em sua composição, cerca de 18 aminoácidos, dos quais se destacam em maior quantidade serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, treonina e lisina (DATTA; NANAVATY, 2007). A maioria desses aminoácidos é composta por fortes grupos polares laterais, tais como hidroxila, carboxila e amino e, em função disso, apresentam uma forte característica hidrofílica, tornando a sericina solúvel em água (ZHANG, 2002). Algumas características indesejáveis da sericina, como sua estrutura amorfa, ampla faixa de massa molar e alta solubilidade em água, a tornam um material bastante frágil e instável. Assim, algumas estratégias têm sido aplicadas para melhorar as propriedades físicas de materiais a base dessa proteína, como a reticulação, polimerização e formação de blendas com outros polímeros, que são possíveis devido à presença dos fortes grupos polares laterais. A serina é o aminoácido que está presente em maior quantidade na estrutura da sericina, chegando a 33% da composição total de aminoácidos. Dentre os demais aminoácidos, podem-se citar a glicina, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, treonina e tirosina, todos caracterizados pela presença dos grupos laterais supracitados (LAMBONI *et al.*, 2015).

A estrutura da sericina é formada predominantemente por uma forma espiral aleatória e amorfa solúvel e, em menor proporção, por uma estrutura organizada e cristalina de folhas- β insolúvel, essa última representada pelo eixo das cadeias poliméricas perpendicular ao eixo das fibras. No entanto, a forma espiral é facilmente convertida em

folhas- β como consequência da absorção de umidade e estiramento mecânico (PADAMWAR; PAWAR, 2004). A sericina exibe uma estrutura em camadas e costuma ser classificada em função dessas camadas e de sua solubilidade. Padamwar; Pawar (2004) estabeleceram uma divisão da sericina nos tipos A, B e C, sendo a sericina A, a camada mais externa e insolúvel em água quente, a B, a camada intermediária, e a C, a camada mais interna, adjacente à fibroína, insolúvel em água quente, e facilmente removida por tratamento ácido ou alcalino diluído quente. Outros autores propõem outros tipos de divisão das camadas de sericina, baseadas também em sua solubilidade, como por exemplo, sericina I, II, III e IV, ou S1, S2, S3, S4 e S5 (CAO; ZHANG, 2016).

Nas últimas décadas, o interesse sobre a sericina tem aumentado em função de suas importantes atividades biológicas e de suas propriedades, como a resistência à oxidação, ação antibacteriana, resistência à radiação ultravioleta, fácil absorção e liberação de umidade, atividade inibidora da tirosina e quinase, biocompatibilidade, biodegradabilidade e efeitos anticarcinogênicos (ARAMWIT; SIRITIENTONG; SRICHANA, 2012; MONDAL; TRIVEDI; KUMAR, 2007). A sericina de baixa massa molar (≤ 20 kDa) vem sendo amplamente utilizada em cosméticos, especialmente em produtos para cuidados da pele e cabelos. Já a sericina de alta massa molar (≥ 20 kDa) tem sido investigada para aplicação como biomateriais médicos, biomateriais degradáveis, biomembranas funcionais, hidrogéis e fibras e tecidos funcionais (ZHANG, 2002).

Outros aspectos interessantes da sericina envolvem sua capacidade de gelificação, resultado da conversão da forma espiral em estruturas de folhas- β pela redução de temperatura, que resulta na formação de um gel; a propriedade sol-gel, uma vez que se dissolve facilmente em água à 50 – 60 °C e retorna à forma de gel quando resfriada; sua solubilidade, que reduz quando da transformação da forma espiral em folhas- β e pode sofrer variações pela adição de diferentes agentes químicos, como o poliacrilato de sódio, que causa um aumento na solubilidade, ou a poliacrilamida e o formaldeído, que causam a redução da solubilidade (PADAMWAR; PAWAR, 2004). Tais características são fundamentais para aplicação da sericina na formação de estruturas tridimensionais.

2.6.3 Extração de sericina

Na indústria da seda, o principal objetivo é a remoção da sericina dos fios da seda, tornando-os mais lustrosos e macios. Para isso, realiza-se o processo conhecido como degomagem, no qual a sericina é solubilizada e removida, deixando o fio de seda para ser

enovelado para fins comerciais. Historicamente, a sericina era descartada nos efluentes desse processo, cenário esse que vem mudando pelo crescente interesse sobre essa proteína (LAMBONI *et al.*, 2015).

O processo de degomagem pode ocorrer por vias químicas, físicas ou enzimáticas, sempre buscando boa eficiência energética e eliminação do descarte de produtos químicos, além do mínimo dano possível à sericina, em função do aumento do interesse econômico sobre ela. As propriedades da sericina obtida dependem do método empregado para sua extração e recuperação (GUPTA; AGRAWAL; RANGI, 2014). Em geral, o processo de degomagem leva em consideração a solubilização da sericina em água quente, pela utilização de tratamento alcalino, tratamento ácido, ou sabões e detergentes, que podem aumentar essa solubilidade, ou ainda por digestão enzimática (GULRAJANI, 1992). No entanto, apenas a extração com água pode ser considerada segura, por causar o mínimo de degradação à fibra da seda (MISHRA, 2000).

Tradicionalmente, a degomagem da seda em processos industriais costumava ser realizada utilizando sabão em meio alcalino, sendo esse considerado o melhor método para remoção da sericina, já que não havia interesse sobre essa proteína, que era degradada pela ação alcalina, e também por tratar-se de um método barato (GUPTA; AGRAWAL; RANGI, 2014). Gradualmente, porém, o sabão foi sendo substituído por detergentes sintéticos, principalmente pelo custo benefício e qualidade da fibroína obtida (KHAN *et al.*, 2010). Quando o interesse do processo é a sericina, a extração com sabão ou detergente não é indicada, uma vez que a separação desses reagentes é extremamente complexa e, se restarem traços de sabão, o uso da sericina se torna bastante restrito (RANGI; JAJPURA, 2015).

Considerando a extração da sericina em meio ácido, pode-se utilizar os ácidos cítrico, tartárico ou succínico, enquanto na extração em meio básico costuma-se empregar carbonato de sódio, soda cáustica, bicarbonato de sódio ou fosfato trissódico. Porém, considerando-se a sericina como produto de interesse, ácidos e bases apresentam efeito degradativo sobre ela, que acaba sendo danificada durante sua extração nessas condições. Uma opção que causa menor degradação da sericina envolve solução de ureia, porém os custos e o tempo de processo aumentam devido à necessidade de purificação da sericina via diálise (MISHRA, 2000; RANGI; JAJPURA, 2015).

Devido às restrições apresentadas, para maximizar a obtenção da sericina e minimizar sua degradação, a extração em água quente se torna a mais adequada, especialmente pela facilidade de operação. Nesse método, a seda é submetida a aquecimento, sem adição de qualquer outro composto químico, e a quantidade de sericina obtida acaba sendo afetada diretamente pelo tempo e temperatura do processo de extração. Apesar de ainda causar a degradação da sericina, nesse método ela ocorre em quantidade mínima, fazendo com que as propriedades mais importantes da proteína sejam mantidas. Além disso, o aquecimento pode ser associado a diferentes condições de processo: pressão ambiente, alta pressão, radiação infravermelha, ou ainda micro-ondas, visando sempre a otimização da extração (RANGI; JAJPURA, 2015).

Yun *et al.* (2013) compararam diferentes métodos de extração de sericina do casulo do *Antheraea mylitta*, uma espécie de bicho-da-seda que não foi domesticado, mas que apresenta elevada importância econômica. Comparado ao *Bombyx mori*, a quantidade de sericina presente em seus casulos é menor. Como métodos de extração, foram avaliados sabão em meio alcalino, água quente a 120 °C, solução de ureia pura, solução de ureia e mercaptoetanol, solução de cloreto de sódio e solução de carbonato de sódio. Como esperado, a maior eficiência de extração foi obtida para o processo com sabão em meio alcalino, a qual não é indicada pela dificuldade em separar a sericina do sabão.

Gimenes *et al.* (2014) avaliaram os métodos de extração de sericina do *Bombyx mori* em água e em solução aquosa de carbonato de sódio nas temperaturas de 80 e 120 °C, com o melhor rendimento de extração obtido para extração em solução de carbonato de sódio a 120 °C. Isso ocorreu porque temperaturas elevadas diminuem a estabilidade das ligações de hidrogênio existentes entre os grupos hidroxila, permitindo que a água interaja com as hidroxilas dos aminoácidos polares. Assim, como a fibroína é formada predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos, é possível remover apenas a sericina em altas temperaturas. Além disso, a presença do carbonato de sódio provoca a quebra das interações da proteína, facilitando a entrada de água e consequentemente a remoção da sericina. A desvantagem é que a sericina extraída na solução de carbonato de sódio teve massa molar menor que 100 kDa, enquanto aquela extraída em água apresentou massa molar na faixa de 20 a 400 kDa, indicando que a sericina submetida ao processo com reagente químico sofreu hidrólise, enquanto a extração em água preservou sua estrutura primária e composição.

Diversos outros estudos empregaram diferentes métodos para extração da sericina do fio de seda do *Bombyx mori*, como a degomagem com ácido cítrico (KHAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2019), degomagem alcalina (JENA *et al.*, 2018; RAJKHOWA *et al.*, 2011), extração em alta temperatura e alta pressão (HTHP) (CHOUDHURY; DEVI, 2016; ZHANG *et al.*, 2004), extração em alta temperatura e radiação infravermelha (GUPTA *et al.*, 2013) e aquecimento em pressão atmosférica (CHIRILA; SUZUKI; MCKIRDY, 2016; KATO *et al.*, 1998). Todos se mostraram métodos eficientes para obtenção da sericina, com características que devem ser observadas para escolha do método mais adequado, como a possibilidade de gerar efluentes contaminados nas extrações ácidas, alcalinas, com sabão ou detergente; o aumento dos custos e a degradação da sericina na extração enzimática; a degradação da fibroína no processo à alta pressão, dentre outros.

2.6.3.1 Fracionamento e separação da sericina

Após o processo de extração, a sericina presente na solução de degomagem pode se apresentar ainda em baixa concentração, o que limita sua aplicação. Sendo assim, se faz necessário, além de separar a sericina obtida, também aumentar sua concentração, visando ampliar sua aplicação, especialmente na produção de biomateriais (GIMENES *et al.*, 2014). Com esse objetivo, diversos métodos podem ser empregados, como a filtração por membranas, a precipitação em etanol (ou outros solventes no qual a sericina é insolúvel), fracionamento por congelamento e descongelamento, secagem por *spray-dryers*, dentre outros (RANGI; JAJPURA, 2015).

A separação de proteínas é um dos maiores desafios na área de membranas, uma vez que a massa molar dessas proteínas afeta diretamente a eficiência da separação. A sericina, por exemplo, apresenta massa molar na faixa de 10 a 300 kDa e sua distribuição de massa varia em função da temperatura, pH e tempo de extração (CAPAR; AYGUN; GECIT, 2008). Gimenes *et al.* (2014) avaliaram o método de ultrafiltração para separação da sericina, obtendo bons resultados para massas molares acima de 100 kDa. Sonjui; Noomhorm; Promboon (2009) realizaram a preparação de membranas a partir de diferentes tipos de aditivos, obtendo assim membranas com vários tamanhos de poros. Como resultado, foi possível realizar a separação de sericina com uma ampla faixa de massas molares. As vantagens do processo com membranas envolvem o fato de ser um processo primário de separação física, além da minimização dos danos físicos às biomoléculas (GULRAJANI *et al.*, 2009).

Outro método de separação da sericina envolve a utilização de etanol, solvente no qual a sericina é insolúvel e, portanto, permite sua precipitação. Oh *et al.* (2011) realizaram essa técnica para obtenção de sericina e observaram que a adição de etanol à solução extraída em água quente provocou o fracionamento da sericina hidrofóbica e a remoção simultânea da sericina de baixa massa molar. Os grânulos obtidos se mostraram aplicáveis para transporte de fármacos e imobilização de enzimas, devido à melhor estabilidade mecânica. Takasu; Yamada; Tsubouchi (2002) conseguiram isolar os componentes principais da sericina por adição de etanol. Foi observado que as moléculas com diferentes massas molares poderiam ser separadas em função da quantidade de etanol adicionada.

O fracionamento por congelamento e descongelamento à temperatura ambiente foi realizado por Da Silva *et al.* (2014b), que conseguiram separar a sericina da solução de extração sem causar grandes modificações no perfil de distribuição de massa molar, o qual foi obtido na faixa de 20 a 400 kDa. O mesmo método foi avaliado por Tomadon Jr. (2011), que conseguiu obter 90% da sericina que se encontrava na solução de extração. A vantagem desse método é que não emprega agentes químicos e, portanto, dispensa etapas posteriores de remoção desses agentes. Inclusive, Yoo; Um (2013) demonstraram que o método de congelamento e descongelamento foi eficaz na melhoria das propriedades mecânicas da sericina.

Visando obter a separação e/ou o fracionamento da sericina, outros autores empregaram ainda *spray-dryers* (GUPTA; AGRAWAL; RANGI, 2014; PANTHONG; EAMCHOTCHAWALIT; SONGSERMPONG, 2015), técnica de congelamento e secagem em bandeja (VAITHANOMSAT; KITPREECHAVANICH, 2008), concentração por aquecimento (GILOTRA *et al.*, 2018) e secagem utilizando rota-evaporador (JANG; UM, 2017).

2.7 Alginato

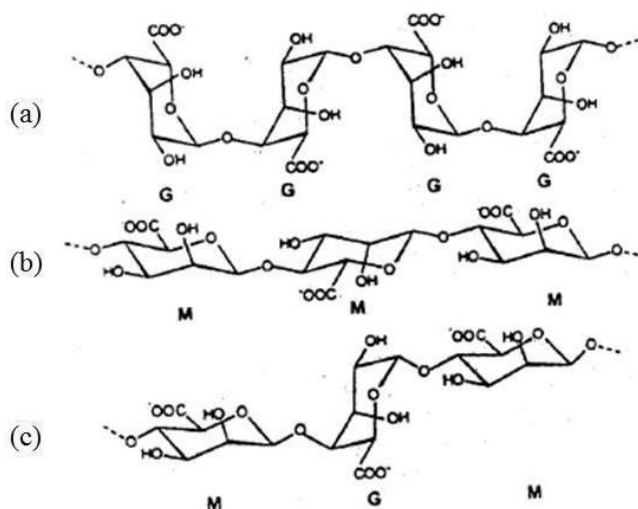
Como mencionado anteriormente, a sericina apresenta em sua estrutura fortes grupos polares laterais, como hidroxilas, carboxilas e aminas, que possibilitam a reticulação, polimerização e formação de blendas com outros polímeros, com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas e químicas e, assim, ampliar seu campo de aplicação. Diversos polímeros podem ser empregados com esse objetivo, especialmente na formação de blendas com a sericina, como é o caso do colágeno (DUAN *et al.*, 2016), álcool

polivinílico – PVA (HE *et al.*, 2017), lignina (KWAK *et al.*, 2016), quitosana (DU; SU; FENG, 2017), e alginato de sódio (DA SILVA *et al.*, 2014b).

Os alginatos são um grupo de polissacarídeos naturais, geralmente derivados das paredes celulares de algas marrons, principalmente das espécies *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*, mas que podem ser produzidos também por algumas linhagens de bactérias (SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 1990). No caso das algas, o alginato pode atingir até 40% de sua composição, em base seca, sendo o principal polissacarídeo presente. Ele atua como um componente formador da estrutura dessas algas, fornecendo a elas resistência mecânica e flexibilidade (REMMINGHORST; REHM, 2006). Na matriz intracelular das algas, o alginato costuma ser encontrado na forma de uma mistura de sais de vários cátions, que estão presentes também nas águas do mar, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e Na^{+} (GOMBOTZ; WEE, 2012).

O alginato é um biopolímero linear composto por blocos de β -D-ácido manurômico (M) e α -L-ácido gulurônico (G), conectados por ligações (1,4)-glicosídicas, e que podem se arranjar em cadeias de subunidades G consecutivas $(G)_n$, M consecutivas $(M)_n$, ou M e G alternadas $(GM)_n$. Quando extraídos de diferentes fontes, os alginatos podem apresentar diferentes composições, massas molares e sequências das cadeias M e G, estimando-se mais de 200 tipos de alginatos manufaturados comercialmente (LEE; MOONEY, 2012). A flexibilidade de suas cadeias varia justamente em função das sequências de blocos M e G formadas, aumentando na seguinte ordem: $(G)_n < (M)_n < (MG)_n$ (GOMBOTZ; WEE, 2012). Isso ocorre porque os blocos M se ligam por ligação equatorial – equatorial, se assemelhando a uma conformação de fita, enquanto os blocos G se ligam por ligação axial – axial, apresentando uma conformação mais corrugada e, portanto, mais rígida (MAHERIYA; PRAJAPATI, 2019). A Figura 20 apresenta um esquema estrutural dos blocos formados no alginato.

Figura 20 – Representação dos blocos (a) (G)_n, (b) (M)_n, (c) (GM)_n.

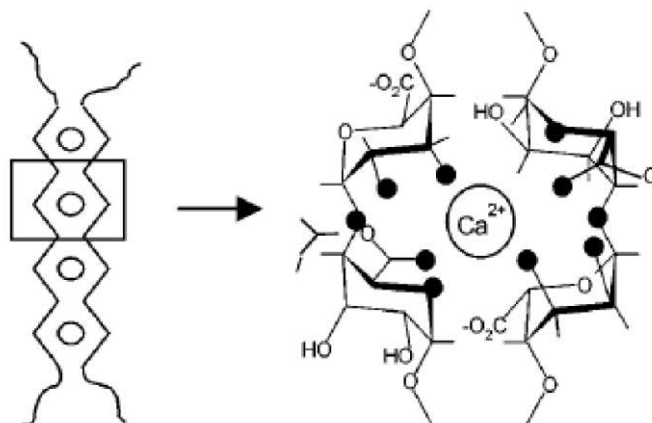


Fonte: Tønnesen; Karlsen (2002).

A proporção e conformação dos blocos M e G afetam diretamente algumas das propriedades do alginato, como a viscosidade, e as capacidades de gelificação e de absorção de água. Essa capacidade de formar géis é algo que desperta grande interesse, uma vez que possibilita a formação de estruturas sólidas ou semissólidas, numa ampla faixa de temperatura (0 – 100 °C). A gelificação é facilmente obtida na presença de diversos cátions divalentes, como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e Fe^{2+} , que interagem com dois grupos carboxila vizinhos, resultando em ligações iônicas entre as cadeias (KHAMPIENG; ARAMWIT; SUPAPHOL, 2015; MAHERIYA; PRAJAPATI, 2019).

No método mais comum de gelificação do alginato, cátions divalentes se ligam aos blocos guluronatos (G), os quais apresentam uma estrutura que permite um maior grau de coordenação desses íons. Então, os blocos G de cadeias adjacentes se ligam, formando um modelo de reticulação conhecido como “caixa de ovos”, que resulta na estrutura do hidrogel. Alginatos que possuam maior proporção de blocos G são capazes de gerar géis mais fortes e rígidos, enquanto alginatos com maior proporção de blocos M formam géis mais fracos, porém mais flexíveis (GRANT *et al.*, 1973). Um dos agentes gelificantes mais utilizados para reticular o alginato é o cloreto de cálcio (CaCl_2), que provoca a gelificação de forma rápida e descontrolada em função de sua elevada solubilidade em soluções aquosas (LEE; MOONEY, 2012). A Figura 21 apresenta a estrutura da formação do gel de alginato na presença de cátions Ca^{2+} .

Figura 21 – Modelo de “caixa de ovo” representando a coordenação de cálcio entre um par de cadeias de guluronato.



Fonte: Braccini; Perez (2001).

Outras características do alginato envolvem sua imunogenicidade, ou seja, a capacidade de induzir a imunidade no hospedeiro que foi infectado; e sua bioadesão, ou capacidade de aderir a um substrato biológico. Além disso, o ácido algínico e seus sais de sódio e cálcio podem ser considerados não-tóxicos, biocompatíveis e relativamente de baixo custo (GOMBOTZ; WEE, 2012; TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Em função dessas propriedades, esse polímero encontra vasta aplicação nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos, além de apresentar diversas aplicações biomédicas (TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Dentre essas aplicações biomédicas, podem-se citar a administração de medicamentos e proteínas no organismo, o uso em curativos para feridas crônicas, o uso como simulador de meio de cultura de mamíferos e a administração de proteínas ou populações de células visando regeneração de tecidos e órgãos humanos (LEE; MOONEY, 2012). Além disso, outra aplicação do alginato envolve a produção de partículas para tratamento de efluentes, para remoção de metais tóxicos (NIÑÁ *et al.*, 2007).

Na área farmacêutica, partículas de alginato têm sido amplamente estudadas para encapsulação de proteínas (ZHANG; TANG; ZHENG, 2016), enzimas (RAHIM *et al.*, 2013), anticorpos (VERNON *et al.*, 2018) e DNA (GOLDSHTEIN *et al.*, 2019). Isso acontece devido à necessidade de proteger tais compostos da ação ácida e enzimática do ambiente gastrointestinal e de encaminhá-los para a região de melhor absorção (COPPI *et al.*, 2002). Comercialmente podem ser encontrados diversos medicamentos que utilizam o alginato em sua composição, como o antiácido Gaviscon®, a pomada cicatrizante Purilon®

Gel e o supositório Natalsid®. Mais recentemente, o alginato também passou a ser avaliado na formação de blenda com a sericina para atuar na administração de fármacos que exigem liberação retardada e controlada (KHAMPIENG; ARAMWIT; SUPAPHOL, 2015; KHANDAI *et al.*, 2010).

2.8 Considerações sobre a revisão bibliográfica

Neste capítulo foram apresentados tópicos relevantes para o desenvolvimento desse projeto. Foi apresentada uma revisão a cerca dos sistemas de liberação modificada, bem como propriedades de fármacos candidatos a esses sistemas e a farmacocinética como forma de prever matematicamente a cinética de liberação do fármaco. Os fármacos cetoprofeno e naproxeno foram apresentados, indicando os motivos pelos quais foram empregados no presente trabalho. Foram apresentados os sistemas carregadores de fármacos e o uso de matrizes poliméricas na área farmacêutica. A indústria da seda e seus componentes foram descritos, trazendo a problemática do descarte da sericina, sem prévia aplicação, bem como suas excelentes propriedades para aplicações biomédicas, cosméticas e farmacêuticas. Foi também apresentado o alginato e a possibilidade de sua formação de blenda com a sericina para incorporação de fármacos. Por fim, foram descritas a reticulação covalente e a reticulação térmica como formas de aprimorar as propriedades de partículas poliméricas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo são apresentados o material e a metodologia empregados para o desenvolvimento desse trabalho.

3.1 Material e equipamentos

3.1.1 Material

Os materiais e reagentes empregados foram:

- Casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, gentilmente cedidos pela empresa de fiação de seda BRATAC, com sede na cidade de Londrina-PR (Brasil);
- Alginato de sódio, polietilenoglicol diglicídico (PEG) e álcool polivinílico (PVA), em padrão analítico, Sigma-Aldrich (Estados Unidos);
- Cetoprofeno (teor: 100,13%) e Naproxeno (teor: 99,47%), Purifarma (Brasil);
- Proantocianidina (PA) (teor: 97,20%), Galena (Brasil);
- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), MagisPharma (Brasil);
- Cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) (teor: 99,23%) e Ácido clorídrico (HCl) (teor: 37%), Anidrol (Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (teor: 99,5%), Hidróxido de sódio (NaOH) (teor: 99,5%) e Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (teor: 99,3%), Dinâmica (Brasil);
- Água ultrapura – Osmose Reversa, Gehaka (Brasil);
- Profenid[®] Entérico 100 mg, L: 720227, Sanofi-Aventis (Brasil);
- Flanax 275 mg, L: X23EU5, Grupo Bayer (Alemanha);
- Cloridrato de doxorrubicina, 10 mg, Pfizer, Inc. (EUA);
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Sigma-Aldrich (EUA);

3.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas etapas experimentais foram:

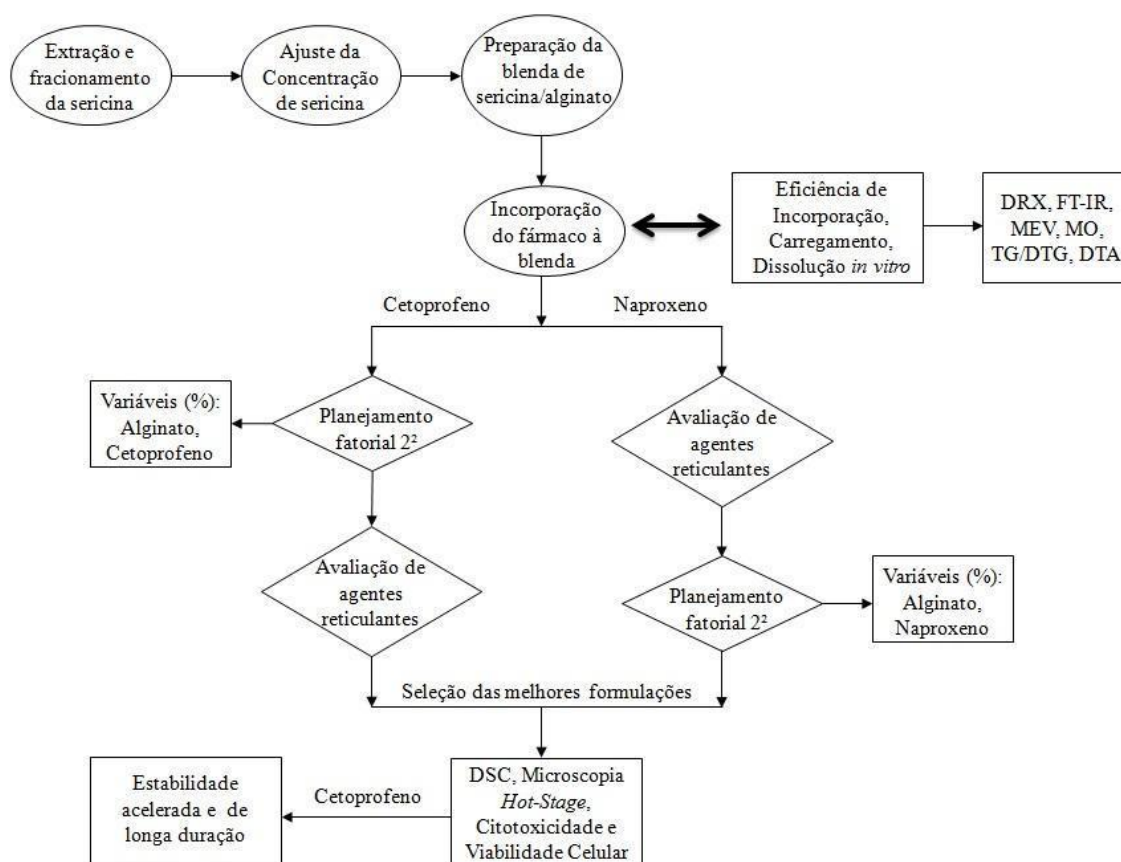
- Estufa, Famen (Brasil);
- Balança Analítica, Ohaus (EUA);
- Autoclave vertical AV-18, Phoenix (Brasil);
- Dispersor Ultra Turrax[®] T18, IKA (China)

- Agitador Magnético TE0851, Tecnal (Brasil);
- Bomba peristáltica 77201-60, Masterflex L/S (EUA);
- pHmetro HI2221-01, Hanna (Brasil);
- *Jar test* JT-203, Milan (Brasil);
- Pipeta volumétrica Nichipet EX, Nichiryo (EUA);
- Sonicador LS-9.5DA, LimpSonic (Brasil);
- Dissolutor de comprimidos e cápsulas UDT-814, Logan (EUA);
- Espectrofotômetro UVmini 1240, Shimadzu (Japão);
- Câmara Climática 420-CLDTS 150, Ethik (Brasil);
- Leitora de placas SpectraMax 340PC 384, Molecular Devices (EUA);
- Microscópio invertido EVOS XL Core, ThermoFisher Scientific (EUA).

3.2 Metodologia

A Figura 22 apresenta um fluxograma geral da metodologia empregada nessa tese de doutorado. Cada etapa é mais detalhada nos tópicos posteriores.

Figura 22 – Fluxograma geral da metodologia empregada.



3.2.1 Preparação dos casulos para extração

Para realizar a extração da sericina, os casulos precisavam estar limpos e em tamanhos pequenos, a fim de aumentar a área de contato com a água. Assim, com o auxílio de pinças e tesouras, qualquer sujidade presente foi eliminada e descartada, e os casulos limpos foram cortados em tamanhos de cerca de 1 cm², de forma que ficassem o mais plano possível. Em seguida, foram lavados em água corrente, enxaguados e lavados com água ultrapura por três vezes. Após a lavagem, os casulos foram secos em estufa a 50 °C até que toda a umidade fosse eliminada.

3.2.2 Extração de sericina

A extração de sericina foi realizada sob pressão e temperatura elevadas, seguindo a metodologia apresentada por Silva *et al.* (2015), adaptada de Tomadon Jr. (2011). Assim, os pedaços de casulos secos foram submersos em água em *erlenmeyer* na proporção de 40 gramas de casulo para cada litro de água. A suspensão foi levada à autoclave à pressão manométrica de 1 kgf/cm² e temperatura de 120 °C, durante 40 min. Ao final, a solução de sericina foi separada da fibroína por filtração simples.

3.2.3 Separação e fracionamento de sericina

Tomadon Jr. (2011) avaliou diferentes técnicas para obter a separação e fracionamento da sericina, sendo que o método de congelamento e descongelamento se mostrou bastante eficiente, o que foi validado posteriormente por Da Silva *et al.* (2014a) que obtiveram solução de sericina com massa molar na faixa de 20 – 400 kDa por esse método. Assim, após a extração, a solução de sericina foi mantida em recipiente fechado durante 12 horas. Nessa etapa, ela se tornou mais viscosa, formando um hidrogel e permitindo a estabilização dos grânulos proteicos. Após esse período, o recipiente foi acondicionado em congelador convencional por, pelo menos, 24 horas.

Para proceder com a etapa de fracionamento, a solução foi descongelada em temperatura ambiente, ocorrendo a formação de duas fases, com o sobrenadante contendo proteínas ainda insolubilizadas (maior massa molar) e uma fase aquosa com proteínas solubilizadas. Para obtenção da sericina de maior massa molar, realizou-se filtração simples com papel de filtro qualitativo, que foi suficiente para reter os peptídeos aglomerados de proteína de maneira fácil e rápida. Em seguida, a solução de proteína precipitada foi reaquecida em autoclave (1 kgf/cm², 10 min) a fim de solubilizar novamente a proteína.

3.2.4 Determinação da concentração de sericina

A concentração da solução de sericina foi determinada pelo método das massas, assim como reportado por Tao; Li; Xie (2005). Assim, um volume conhecido da solução de sericina foi colocado em uma placa de Petri de massa conhecida e, após 24 horas em estufa a 100 °C, a massa do conjunto placa + sericina foi determinada, em triplicata. A partir da Eq. 10, calculou-se a concentração da solução para posteriormente ajustá-la para o valor desejado, através de diluição.

$$C_s = \frac{m_f - m_i}{V} \cdot 1000 \quad (10)$$

Em que C_s é a concentração de sericina em solução (g/L), m_f é a massa final do conjunto placa + sericina após 24 horas em estufa (g), m_i é a massa da placa inicial (g) e V é o volume de solução de sericina adicionado inicialmente (mL). A solução de sericina teve sua concentração ajustada para 2,5% (m/V) através de diluição com água ultrapura (DA SILVA *et al.*, 2014b).

3.2.5 Incorporação de fármaco à blenda de sericina e alginato

A incorporação de fármaco seguiu a metodologia proposta por Vidart *et al.* (2016), adaptada de Khandai *et al.* (2010). A solução de sericina 2,5% (m/V) foi reaquecida em autoclave nas mesmas condições da extração, a 1 kgf/cm² e 120 °C, durante 10 min para ressolubilização dos grânulos proteicos, e depois colocada para agitação em Ultraturrax® a 4000 rpm até atingir a temperatura de 55 °C. Nesse momento, o alginato de sódio foi adicionado à sericina e mantido sob agitação constante no Ultraturrax® até atingir a completa homogeneização da solução. O fármaco foi então adicionado à blenda de sericina e alginato, inicialmente em agitação de 4000 rpm e, ao final, sob agitação de 8000 rpm, até a homogeneização. Quando se fez necessário, o agente reticulante covalente foi adicionado após o fármaco, nas mesmas condições de agitação do fármaco.

3.2.6 Preparação das partículas

As partículas foram preparadas pelo método de gelificação por gotejamento, semelhante ao realizado por Khandai *et al.* (2010). A solução polimérica já contendo o fármaco incorporado foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl₂) 3% (m/V), sob agitação magnética constante, com o auxílio de bomba peristáltica e uma

ponteira presa à mangueira. Ao gotejar, ocorria uma rápida gelificação da solução, formando uma partícula. Ao final do gotejamento, as partículas foram mantidas em agitação, a 100 rpm, em *jar test*, durante 30 min, a fim de completar a reticulação com todos os íons de cálcio difundindo completamente. Após esse período, as partículas foram lavadas com água corrente e água deionizada para remoção do cálcio e cloro residuais. A secagem das partículas foi realizada em temperatura ambiente, por pelo menos 24 horas, e depois armazenadas em frasco fechado e identificado, para posterior caracterização.

Nos casos em que foi realizada a reticulação térmica, seguiu-se metodologia reportada por Da Silva *et al.* (2016). As partículas lavadas foram secas em estufa a 40 °C durante 24 h e, em seguida, em estufa a 100 °C, durante mais 24 h. A etapa de secagem branda inicial foi realizada para evitar uma mudança brusca de temperatura que poderia causar a formação de rachaduras na superfície das partículas.

3.2.7 Desenvolvimento de formulações com cetoprofeno

3.2.7.1 Planejamento experimental

Para o cetoprofeno, inicialmente foi realizado um planejamento experimental fatorial 2², com triplicata do ponto central, realizando-se uma Análise de Variância por meio do programa Statistica®. As quantidades adicionadas inicialmente de alginato e de fármaco foram determinadas como variáveis independentes, e divididas nos valores mínimo, médio e máximo expostos na Tabela 4. Os valores escolhidos para cada variável se basearam em estudos anteriores. Vidart *et al.* (2018), avaliando a incorporação de diclofenaco de sódio à blenda de sericina e alginato, fizeram uma análise separada do fármaco e do alginato. Ao fixar o alginato em 2,0% (m/V) e variar o fármaco na faixa de 2,0 a 6,0% (m/V), verificaram que o aumento da fração de fármaco prejudicava a eficiência de incorporação, levando a fixar esse parâmetro em 2,0% (m/V) para avaliar a variação do alginato, na faixa de 0,5 a 3,6% (m/V). Valores de alginato abaixo de 2,0% (m/V) demonstraram a impossibilidade de formação de partículas, pois estas não ficaram bem definidas e, ainda, se apresentaram bastante frágeis. Valores elevados de alginato dificultaram o processo de gotejamento, ao formar soluções com elevada viscosidade. Assim, em função dessas limitações, restringiu-se a faixa de valores estudada nesse trabalho à faixa de 2,0 a 4,0% (m/V) para a quantidade de fármaco e 2,0 a 2,8% (m/V) para o alginato. A concentração inicial de sericina foi mantida constante em 2,5% (m/V). As variáveis-resposta, ou dependentes, foram estabelecidas como a eficiência de incorporação,

a capacidade de carregamento do fármaco e o tempo para liberação de 85% do fármaco incorporado, com o objetivo de obter os maiores valores para todas elas. Para efeitos de comparação, também foram produzidas partículas compostas somente por alginato e fármaco, e foi feito ensaio de dissolução do fármaco referência Profenid® Entérico.

Tabela 4 – Fatores e seus níveis utilizados no planejamento experimental completo.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Alginato de Sódio (% m/V)	2,0	2,4	2,8
Cetoprofeno (% m/V)	2,0	3,0	4,0

3.2.7.2 Avaliação de diferentes matrizes poliméricas

O resultado obtido com o planejamento experimental atingiu valores inferiores a outros reportados na literatura, especialmente em termos de tempo de liberação (Bezerra (2018); Freitas *et al.* (2018); Vidart *et al.* (2018)) e, portanto, foram avaliados diferentes agentes reticulantes covalentes adicionados à melhor formulação obtida no planejamento, visando prolongar a liberação do cetoprofeno. Foram avaliados o álcool polivinílico (PVA), fosfato de sódio dibásico (DSP), proantocianidina (PA) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) na concentração de 2,0% (m/V). Essas formulações foram avaliadas quanto à eficiência de incorporação, capacidade de carregamento do fármaco e liberação em meio gastrointestinal simulado. Com o melhor agente reticulante obtido, foram produzidas partículas em outras concentrações desse reagente, (0,5 e 1,0% (m/V)), utilizando os mesmos parâmetros de avaliação empregados anteriormente.

As duas melhores formulações (a primeira obtida do planejamento experimental e a segunda obtida pela adição de agente reticulante covalente) foram submetidas à etapa de reticulação térmica, conforme detalhado na seção 3.2.6, e avaliadas quanto à liberação em meio gastrointestinal simulado. Isso ocorreu porque a etapa de reticulação térmica, sendo apenas uma secagem controlada, não é capaz de alterar a quantidade de fármaco efetivamente incorporada. Na verdade, ela apenas elimina a água presente nas partículas. No entanto, no que se refere à dissolução, é possível que a elevada temperatura altere as estruturas poliméricas e provoque alterações na liberação *in vitro*.

3.2.8 Desenvolvimento de formulações com naproxeno

No caso do naproxeno, o desenvolvimento das formulações seguiu a metodologia inversa. Inicialmente foram avaliados diferentes agentes reticulantes covalentes, comparados a formulações compostas somente pela blenda de sericina e alginato e somente por alginato. Nesse caso, foram avaliados PVA, DSP e PEG na concentração de 2,0% (m/V). Os resultados dessa etapa, avaliando eficiência de incorporação, capacidade de carregamento do fármaco e liberação em meio gastrointestinal simulado, possibilitaram determinar as variáveis para o planejamento experimental fatorial completo, realizado nas mesmas condições da Tabela 4, sendo que os resultados de liberação das formulações do planejamento foram comparados ao ensaio de dissolução do medicamento referência Flanax[®]. Mais uma vez, as duas melhores formulações foram submetidas à etapa de reticulação térmica para avaliar seu efeito sobre a liberação *in vitro*.

3.2.9 Caracterização das partículas carregadas com fármacos

3.2.9.1 Curvas analíticas do cetoprofeno e do naproxeno

As curvas analíticas do cetoprofeno e do naproxeno foram obtidas para possibilitar a determinação das concentrações experimentais de fármaco por espectroscopia UV-vis em todos os ensaios realizados e apresentados nas seções seguintes. Para isso, foram produzidas soluções-mãe de cetoprofeno e de naproxeno em concentração de 0,2 g/L, utilizando os diferentes solventes empregados nas etapas experimentais (meio ácido pH 1,2, meio tampão pH 6,8 e pH 7,4). A partir delas, soluções de cetoprofeno foram preparadas com concentração na faixa de 0,00125 – 0,0145 g/L e soluções de naproxeno com concentração na faixa de 0,005 – 0,16 g/L. As absorbâncias das soluções com concentrações conhecidas foram determinadas por espectroscopia UV-vis nos comprimentos de onda de 258 nm e 332 nm para o cetoprofeno e naproxeno, respectivamente. Esses valores de comprimento de onda foram obtidos da Farmacopeia Americana (XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018) e confirmados por varredura no equipamento utilizado.

Também foram determinados os limites de detecção (LD) de cada fármaco (Eq. 11), os quais indicam a menor concentração de fármaco que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, pelo método de análise em questão (Resolução da ANVISA

– RDC nº 166, 24/07/2017). Para o cetoprofeno o LD foi igual a 0,000031 g/L e para o naproxeno foi de 0,0020 g/L.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad (11)$$

Em que σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica.

3.2.9.2 Eficiência de incorporação de fármaco

De acordo com Vidart *et al.* (2016), a blenda de sericina e alginato demonstrou total dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) após um período de 24 h. Assim, para avaliar a eficiência de incorporação do fármaco à blenda, seguiu-se metodologia adaptada de Sinha *et al.* (2015), na qual 0,1 g de partícula seca foi adicionada a 500 mL de tampão fosfato (pH = 6,8) durante 24 horas. Após o período de 24 horas, a suspensão foi submetida à sonicação durante 15 min e, depois, à filtração simples em filtro qualitativo 0,45 μ m. A concentração experimental de fármaco no filtrado foi obtida por espectroscopia UV-vis no comprimento de onda específico para cada fármaco (para o cetoprofeno, $\lambda = 258$ nm, e para o naproxeno, $\lambda = 332$ nm) e, através da Eq. 12, determinou-se a eficiência de incorporação (PAPADIMITRIOU; BIKIARIS, 2009). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Ressalta-se que todos os ensaios (eficiência de incorporação e os subsequentes carregamento e dissolução *in vitro*) foram realizados utilizando partículas com fármaco e partículas sem fármaco, para que fosse possível eliminar a interferência da matriz sobre as medidas experimentais.

$$Eficiência\ Incorporação\ (\%) = \frac{Concentração\ experimental}{Concentração\ teórica} \cdot 100 \quad (12)$$

Nesse caso, a *Concentração teórica* foi calculada considerando-se a fração mássica de fármaco adicionada à blenda inicialmente e a *Concentração experimental* é aquela obtida por espectroscopia.

3.2.9.3 Capacidade de carregamento de fármaco

Seguindo o mesmo procedimento empregado na etapa anterior, a capacidade de carregamento de fármaco pôde ser determinada conforme a Eq. 13 (PAPADIMITRIOU; BIKIARIS, 2009).

$$\text{Carregamento} = \frac{\text{massa de fármaco na partícula}}{\text{massa de partículas}} \cdot 100 \quad (13)$$

Em que *massa de fármaco na partícula* foi obtida experimentalmente por espectroscopia UV-vis e *massa de partículas* se refere à quantidade de partículas adicionada experimentalmente (0,1 g).

3.2.9.4 Cristalinidade

Para avaliar a cristalinidade das formulações utilizou-se o método de Difração de Raios X (DRX), uma técnica não destrutiva, rápida e bastante versátil (ZWELL, 1974). Os difratogramas foram obtidos no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) – UNICAMP utilizando Difrator de Raios X (X'Pert-MPD, Philips), com as seguintes condições de análise: radiação K α do Cobre, voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, 2 θ na faixa de 5 a 50°, com passo de 0,02° e velocidade de 0,02°/s.

3.2.9.5 Determinação de grupos funcionais

A análise de espectroscopia na região do infravermelho pode ser empregada para determinar os grupos funcionais existentes em determinada amostra, com base na interação entre a radiação eletromagnética e o material analisado, e respostas a partir da absorção dessa radiação (WILSON, 1994). A introdução de instrumentos de medição que empregam a transformada de Fourier para obter o espectro (FT-IR) aumenta o desempenho da análise, com maior precisão e maior velocidade na obtenção dos dados (MADEJOVÁ, 2003).

No presente trabalho, a análise de FT-IR foi realizada no LRAC/FEQ/UNICAMP (Espectrômetro de Infravermelho, Nicolet 6700, Thermo Scientific) no modo de transmitância usando método KBr, na faixa de 4000-400 cm⁻¹ e resolução de 4cm⁻¹.

3.2.9.6 Análise morfológica

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi empregada para analisar a morfologia e as características superficiais das partículas. Essa análise também foi realizada no LRAC/FEQ/UNICAMP (Microscópio Eletrônico de Varredura, Leo 440i, Oxford), com as amostras sendo recobertas por uma camada de ouro de 200 Å e obtendo-se micrografias em diferentes ampliações. As partículas analisadas foram secas nas mesmas condições de preparo de partículas, em temperatura ambiente.

3.2.9.7 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho

O diâmetro das partículas foi obtido através da técnica de Microscopia Óptica, realizada no LRAC/FEQ/UNICAMP (Microscópio Estéreo, DC4-456H, National). Para cada formulação, foram obtidas imagens das partículas e o diâmetro de 500 partículas foi medido, utilizando o programa ImageJ. Assim, foi obtido o diâmetro médio de cada formulação, a distribuição de tamanhos e o ajuste do modelo Gaussiano à distribuição.

3.2.9.8 Análises térmicas

Para avaliar a estabilidade térmica de uma formulação em função da variação da temperatura do meio, utilizam-se a análise termogravimétrica (TG) e a análise térmica diferencial (DTA). Na TG, o material é aquecido e o equipamento determina sua massa, quantificando perdas e ganhos de massa e decomposição ocorrida. Já na DTA, a temperatura do material é comparada à temperatura de um padrão, durante seu aquecimento, e verifica-se a ocorrência de transformações endotérmicas ou exotérmicas, identificadas por deflexões no termograma obtido (SANTOS, 1975).

Já a análise de DSC permite monitorar o fluxo de calor entre uma amostra e uma referência, submetidas a um aumento de temperatura controlado, ou seja, diferente da análise de DTA, que é puramente qualitativa, na análise de DSC é possível quantificar as entalpias das transições observadas (GROENEWOUD, 2001). Trata-se de uma análise amplamente empregada em estudos de pré-formulações para obter informações sobre possíveis incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e seus excipientes (VENKATARAM; KHOHLOKWANE; WALLIS, 1995). Esses estudos de pré-formulações envolvem a determinação de propriedades físicas e químicas do fármaco, de seus excipientes isoladamente e da combinação de ambos (WADKE; SERAJUDDIN; JACOBSON, 1989).

Para o presente estudo, as formulações foram analisadas em equipamento DTG-60 (Shimadzu) pertencente ao Laboratório de Engenharia Ambiental/Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais (LEA/LEPA) – FEQ/UNICAMP. As condições de análise foram atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, taxa de aquecimento 20 °C/min, na faixa de 30 – 1000 °C.

Para a análise de DSC, analisaram-se as melhores formulações obtidas no desenvolvimento de formulações para cada fármaco e os fármacos puros. Utilizou-se equipamento DSC1 (Mettler Toledo), pertencente ao LRAC/FEQ/UNICAMP. As condições de análise foram atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, taxa de aquecimento 10 °C/min, na faixa de 25 – 225 °C.

A fim de visualizar os fenômenos térmicos detectados nas análises de DTA e DSC, foi realizada Microscopia *Hot-Stage*, utilizando para isso microscópio ótico DM2700 M (Leica) acoplado a um controlador de temperatura LTS 420 (Linkam), ambos pertencentes ao Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF) da FEQ/UNICAMP. As amostras foram submetidas à taxa de aquecimento de 10 °C/min e as imagens foram obtidas a cada 10 s, em ampliação de 5x para as formulações e 20x para os fármacos puros, na faixa de 30 – 300 °C.

3.2.10 Ensaios de dissolução *in vitro*

Através dos ensaios de dissolução *in vitro* é possível simular o meio gastrointestinal para avaliar o perfil de liberação de fármaco em função do tempo (GIANOTTO *et al.*, 2007). Cada fármaco apresenta uma particularidade no ensaio de dissolução, de acordo com o proposto pela Farmacopeia Americana (XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018). Em comum para o cetoprofeno e para o naproxeno, os ensaios foram realizados em dissolutor, com aparato I (cesto), sob agitação de 50 rpm e temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C. Em tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 5 mL, com posterior reposição de 5 mL do meio fresco. A concentração de fármaco em cada alíquota foi determinada por espectroscopia UV-visível.

Para o cetoprofeno, utilizou-se uma quantia de partículas equivalente a 100 mg de fármaco. No caso das formulações do planejamento experimental, fez-se uso direto de 900 mL de solução tampão fosfato (pH = 6,8) como meio de dissolução (recomendado para liberação prolongada desse fármaco); para as formulações de cetoprofeno com agentes reticulantes, foi realizado ensaio considerando liberação retardada com o objetivo de avaliar a gastrorresistência das partículas ao se adicionar os agentes reticulantes e também porque o meio entérico usado é similar ao usado para liberação prolongada desse fármaco. Assim, utilizou-se 1000 mL de meio de dissolução ácido (pH 1,2) durante as primeiras 2 h e em seguida 1000 mL do mesmo meio tampão (pH = 6,8) foi empregado até atingir o equilíbrio.

Isso foi realizado porque a gastrorresistência da blenda de sericina e alginato já havia sido comprovada por Vidart *et al.* (2018).

Para o naproxeno, foi utilizada uma quantia de partículas equivalente a 110 mg de fármaco (considerando a dosagem ideal de 220 mg). Todas as formulações foram submetidas à dissolução direta em 900 mL de meio tampão (pH = 7,4). Para confirmar a gastrorresistência das formulações com agentes reticulantes, cada uma também foi submetida à dissolução em 1000 mL de meio ácido (pH = 1,2).

3.2.11 Estudo cinético da liberação

Os modelos matemáticos apresentados na Seção 2.3 – Farmacocinética, foram aplicados aos dados experimentais obtidos nos ensaios de dissolução *in vitro*, para posterior avaliação da cinética de liberação, por meio do programa Maple 17[®]. Os valores de coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) e Critério de Informação de Akaike (AIC) foram calculados para determinação dos melhores ajustes.

O uso do R^2_{aj} se justifica pela vantagem em eliminar uma limitação do convencional coeficiente de determinação (R^2). O valor do R^2 sempre é reduzido ou se mantém constante no caso de um parâmetro explanatório ser retirado, independente de sua importância, o que não acontece para o R^2_{aj} (BAR-GERA, 2017). Já o AIC é uma ferramenta útil para comparação de modelos com diferentes números de parâmetros, incluindo modelos incompatíveis (MAIER, 2013). Esse parâmetro leva em consideração a acurácia do ajuste e o número de parâmetros característicos do modelo (MIRCIÁ *et al.*, 2015).

3.2.12 Estudo de estabilidade

Além das próprias características físico-químicas dos componentes de um produto farmacêutico, as características ambientais, como temperatura, umidade e luz, também influenciam em sua estabilidade. Seguindo a Resolução da ANVISA (RDC nº 45, 09/08/2012), foram realizados testes de estabilidade acelerado e de longa duração, para as melhores formulações de cetoprofeno. No teste de estabilidade acelerado, a degradação foi acelerada em condições forçadas de armazenamento, enquanto no de longa duração foram avaliadas condições normais de armazenamento, visando verificar as características do fármaco durante e até depois de seu prazo de validade esperado. Para isso, as partículas foram colocadas dentro de cápsulas farmacêuticas, que foram armazenadas em blísteres. Os blísteres contendo as cápsulas foram armazenados em câmara climática e, a cada 3 meses,

análises de eficiência de incorporação e teste de dissolução *in vitro* foram realizadas. As condições do teste foram: 6 meses, 40 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ UR para o teste acelerado e 12 meses, 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR para o teste de longa duração.

3.2.13 Estudo da citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro*

Ao avaliar a viabilidade celular *in vitro* frente a um medicamento, este é colocado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, e qualquer alteração celular é avaliada. Os testes *in vitro* têm sido utilizados como primeira etapa para avaliar a biocompatibilidade de uma substância. Comparados aos testes *in vivo*, apresentam as vantagens de limitação do número de variáveis experimentais, obtenção facilitada de dados e em menor tempo (ROGERO *et al.*, 2003).

O presente trabalho utilizou o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular/citotoxicidade *in vitro* das partículas produzidas e foi realizado no Laboratório de Ciências Morfológicas e Moleculares em Farmacologia (LCiMM) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O MTT é um ensaio colorimétrico para medir a viabilidade, proliferação e ativação das células. No ensaio, a solução aquosa do sal Tetrazolium (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), de coloração amarela, é convertida em formazan, um produto insolúvel em água, de cor arroxeada, pela ação da enzima desidrogenase succínica, presente na mitocôndria de células. A quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis da mesma cepa ou linhagem, nas mesmas condições de cultivo (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

A metodologia do estudo de viabilidade celular/citotoxicidade utilizou linhagem de células do tipo queratinócito humano transformado (HaCaT) e seguiu o Protocolo de Mosmann (1983). A linhagem de HaCaT é composta por células epiteliais, tratando-se de uma linhagem amplamente empregada nesse tipo de estudo pela facilidade de propagação e fenótipo normal (López-García *et al.*, 2014). Assim, como teste inicial para avaliação da viabilidade celular, essa foi a linhagem escolhida. Em placas para cultura de células de 96 poços foram adicionadas as células HaCaT (10^4 células/poço), com volume final de 200 μ L em meio de cultura RPMI 1640. Amostras dos fármacos puros, das melhores formulações de cada fármaco e de suas respectivas partículas sem fármaco foram adicionadas às placas contendo as células, em concentrações na faixa de 100 – 0,0001 μ g/mL de células, e mantidas incubadas por 72 horas. Esse tempo longo de incubação poderia permitir que efeitos de citotoxicidade que não aparecessem em menores tempos, pudessem ser

observados (CHAMBERS *et al.*, 2012). Após esse período, 10 µL de MTT, dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) na razão de 5 mg/mL, foi adicionado a cada poço e, posteriormente, mantidos incubados a 37 °C durante 4 horas. Para dissolver os cristais azuis escuros, as células foram ressuspensas em 150 µL de álcool isopropílico. A absorbância foi lida em leitor de placas a 570 nm (RISS *et al.*, 2016).

A viabilidade celular foi determinada pela Eq. 14.

$$\% Viabilidade Celular = \frac{Abs_{exp}}{Abs_{controle}} \cdot 100 \quad (14)$$

Em que Abs_{exp} se refere à absorbância das amostras em contato com as formulações desenvolvidas, nas diferentes concentrações e $Abs_{controle}$ é referente à absorbância do controle positivo, nesse caso o cloridrato de doxorrubicina (SANTOS, 2015). Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

3.3 Considerações sobre o material e a metodologia

No presente capítulo foi descrita detalhadamente a metodologia empregada para produção de partículas de sericina e alginato incorporadas com os fármacos cetoprofeno e naproxeno, bem como as análises realizadas para avaliação da eficiência dessa incorporação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de formulações com cetoprofeno

4.1.1 Planejamento experimental: eficiência de incorporação, carregamento e dissolução *in vitro*

A primeira etapa da obtenção de partículas com cetoprofeno incorporado seguiu a metodologia de planejamento experimental fatorial 2². Ressalta-se que os ensaios foram realizados de forma aleatória, conforme proposto pelo programa Statistica®. Na Tabela 5 são apresentadas as formulações obtidas, bem como suas composições de sericina, alginato e de cetoprofeno e os resultados obtidos para as variáveis dependentes, eficiência de incorporação, capacidade de carregamento de fármaco e tempo para liberação de 85% do fármaco (t_{85}), sendo que o desvio padrão de cada variável se refere aos ensaios em triplicata. Além disso, deve-se reforçar que as faixas de concentrações de alginato e fármaco foram determinadas de acordo com estudos anteriores, conforme mencionado na Seção 3.2.7.1. Os pontos centrais (K5, K6 e K7) tiveram seus resultados agrupados em “Centrais” e a formulação K2* se refere a uma formulação similar a K2, porém composta somente por alginato e fármaco.

Tabela 5 – Formulações de cetoprofeno incorporado em blenda de sericina e alginato, obtidas a partir do planejamento experimental, e resultados das variáveis dependentes eficiência de incorporação, carregamento e tempo para liberação de 85%.

Formulação	SER	ALG	CETO	Eficiência de Incorporação (%)	Carregamento (%)	t_{85} (min)
K1	2,5	2,0	2,0	91,19 ± 0,41 ^a	28,06 ± 0,13 ^a	94,15 ± 1,57 ^a
K2	2,5	2,8	2,0	74,96 ± 0,55 ^b	20,54 ± 0,15 ^b	92,36 ± 2,75 ^a
K3	2,5	2,0	4,0	85,53 ± 0,48 ^a	40,25 ± 0,23 ^c	103,73 ± 2,80 ^a
K4	2,5	2,8	4,0	76,48 ± 2,69 ^{b,c}	32,90 ± 1,16 ^d	105,09 ± 1,36 ^a
Centrais	2,5	2,4	3,0	83,87 ± 6,33 ^{a,c}	31,85 ± 2,40 ^d	111,65 ± 11,50 ^a
K2*	-	2,8	2,0	66,07 ± 0,75 ^d	25,09 ± 0,28 ^a	158,33 ± 38,87 ^b

Legenda: SER: concentração de sericina, ALG: concentração de alginato, CETO: concentração de cetoprofeno, todos em % (m/V). Os sobrescritos a, b, c, d se referem à análise de similaridade estatística realizada por meio do teste de Tukey.

A eficiência de incorporação se refere à quantidade de fármaco que foi efetivamente incorporada às partículas em relação à quantidade inicialmente adicionada, ou seja, trata-se

de um parâmetro de processo que descreve a eficiência do método de preparação para incorporar o fármaco à matriz polimérica. Já o carregamento de fármaco expressa a quantidade de fármaco presente em uma massa de partículas conhecida, sendo, portanto, um indicativo da porcentagem da massa de partículas que corresponde ao fármaco incorporado. Ambos são diretamente afetados pelas propriedades físico-químicas e estruturais da matriz polimérica, e pela interação entre o fármaco, a matriz e o meio em que estão inseridos (JUDEFEIND; DE VILLIERS, 2009; SHEN *et al.*, 2017). Os resultados obtidos para esses dois parâmetros foram submetidos ao teste estatístico de Tukey, um teste de comparação de médias, no programa Statistica® (WILLIAMS, 1974). Assim, valores com sobrescritos iguais na Tabela 5 são considerados estatisticamente equivalentes, com 95% de confiança.

Pode-se observar que os valores de eficiência de incorporação obtidos no planejamento experimental variaram na faixa de $74,96 \pm 0,55\%$ a $91,19 \pm 0,41\%$. Estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey, as formulações que apresentaram eficiências iguais se agruparam assim: K1, K3 e Centrais; K2 e K4; K4 e Centrais. Portanto, pode-se considerar que as maiores eficiências foram obtidas para formulações com quantidades intermediárias ou mínimas de alginato. As maiores quantidades de alginato foram responsáveis pelas menores eficiências, enquanto a quantidade de fármaco parece não exercer grande influência sobre esse parâmetro. Os valores obtidos são bastante semelhantes a outros reportados na literatura e indicam que elevada quantidade de fármaco foi efetivamente incorporada durante a produção das partículas. Abdallah *et al.* (2012) obtiveram eficiências na faixa de 60,19% a 87,63% ao avaliar a produção de microesferas de cetoprofeno utilizando Eudragit®RS100 como matriz polimérica, enquanto Al-Tahami (2014) obteve eficiências de 70,88% a 96,12% pela incorporação de cetoprofeno ao alginato, dependendo da composição das partículas.

O carregamento de fármacos apresentou valores na faixa de $20,54 \pm 0,15\%$ a $40,25 \pm 0,23\%$. No caso do máximo carregamento, esse valor significa que em 1 g de partícula há 402 mg de fármaco. Estatisticamente, somente o par K4 e Centrais se mostraram equivalentes. Todos os outros resultados do planejamento experimental demonstraram diferença estatística com 95% de confiança, sendo que os maiores valores de carregamento foram obtidos quando se aumentou a quantidade de fármaco adicionada e quando a quantidade de alginato foi reduzida. O carregamento afeta diretamente a quantidade de partículas a serem encapsuladas para obter um determinado objetivo

terapêutico. Al-Tahami (2014) obteve carregamentos de cetoprofeno na faixa de 19% a 60% em matriz polimérica de alginato, o que é coerente ao encontrado no presente trabalho.

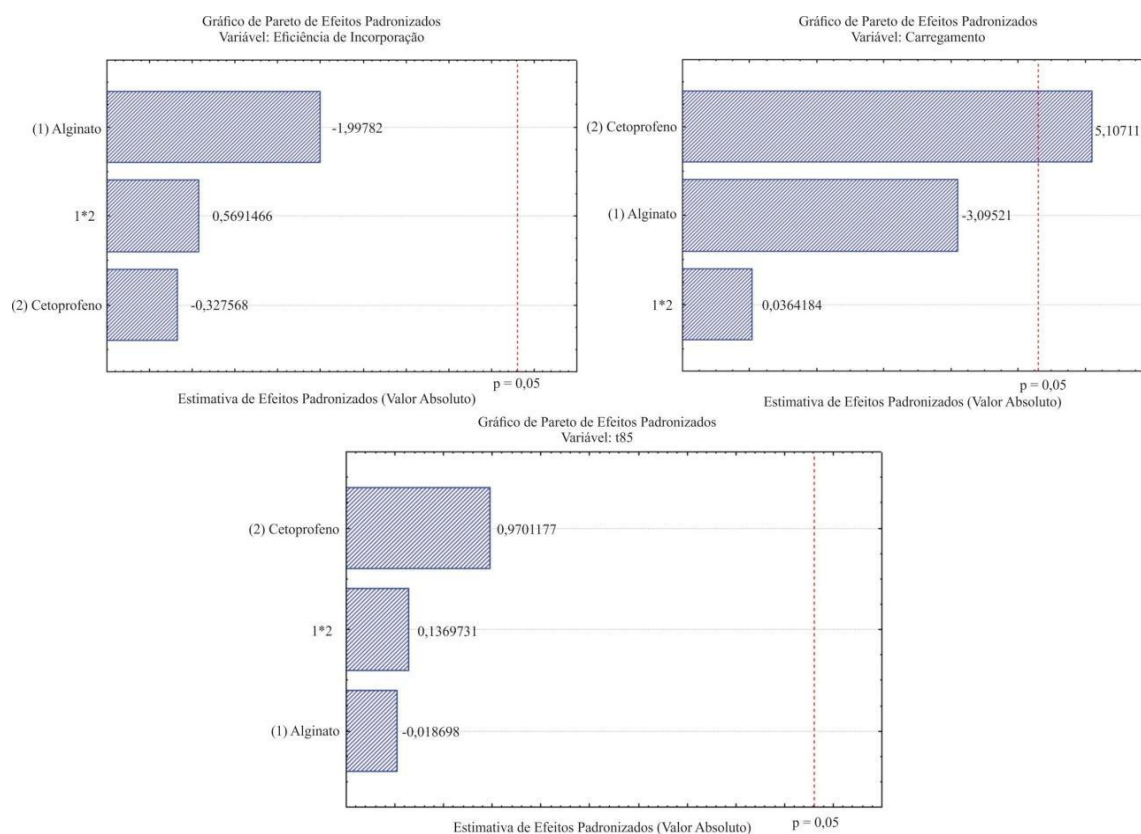
Para efeitos de comparação, foi obtida uma formulação contendo somente alginato e fármaco, identificada na Tabela 5 como K2*, uma vez que foi produzida com a mesma composição de alginato e fármaco da formulação que apresentou os menores valores de eficiência de incorporação e carregamento, a K2. O carregamento de K2* está dentro da faixa dos valores obtidos para o planejamento experimental, o que já era esperado em função da fração de fármaco inicial, que demonstrou afetar diretamente essa grandeza. Além disso, esse valor foi maior do que o obtido para K2, justamente em função dessa maior fração de fármaco, a qual também afetou o valor de eficiência, que para K2* foi o menor valor apresentado na Tabela 5 e, também, o único que não apresentou similaridade estatística com nenhum dos demais valores apresentados. Ao comparar com K2, isso era esperado, pois o aumento da razão mássica fármaco:polímero gera menores eficiências de incorporação (DHAKAR *et al.*, 2010).

No entanto, ao se comparar a K2* com a formulação K4, com razões mássicas fármaco:polímero próximas, observa-se que, tanto a eficiência quanto o carregamento, são maiores em K4. Isso significa que a sericina aprimorou a incorporação do cetoprofeno na matriz, e isso pode ser explicado em função dos fortes grupos laterais presentes em sua estrutura, como os grupos hidroxila, carboxila e amina (ZHANG, 2002). Durante a etapa de gelificação iônica, esses grupos se ligam fortemente às moléculas de alginato, prevenindo a perda de cristais de fármaco, antes de sua completa incorporação. Em relação ao tempo de liberação de 85% do fármaco, o maior valor, estatisticamente diferente dos demais, foi o da formulação K2*, indicando que o alginato contribui na prolongação da liberação do cetoprofeno, em detrimento da blenda de sericina/alginato, a qual possibilitou tempos menores de liberação e estatisticamente semelhantes para todas as formulações do planejamento. Esse resultado já havia sido observado por Freitas *et al.* (2018), que avaliaram a incorporação do ibuprofeno à blenda de sericina e alginato, tendo observado influência direta do alginato sobre a prolongação da liberação.

As variáveis dependentes também foram submetidas a uma análise dos efeitos das variáveis independentes, alginato e cetoprofeno inicialmente adicionados. Foram obtidos, assim, os gráficos de Pareto da Figura 23, considerando intervalo de confiança de 95% e cálculo do erro puro, em função da repetição no ponto central.

Os gráficos de Pareto apresentam o valor absoluto da estimativa dos efeitos padronizados e, destacada em vermelho, a linha representativa do p -valor = 0,05 (para 95% de confiança). Efeitos com a barra azul ultrapassando a linha do p -valor são considerados significativos. Pode-se observar que, no intervalo estudado, apenas a quantidade de fármaco exerceu influência significativa sobre o carregamento. Em relação às demais variáveis dependentes, nenhuma delas apresentou qualquer efeito significativo. Por essa razão, optou-se por não apresentar a tabela ANOVA e as equações do modelo, que fariam sentido apenas em caso de maior significância do modelo obtido.

Figura 23– Gráficos de Pareto obtidos a partir da análise dos efeitos das variáveis alginato e cetoprofeno sobre a eficiência de incorporação, carregamento e tempo para liberação de 85% do fármaco.



A explicação para essa baixa significância pode estar nas faixas de valores empregadas para as variáveis independentes, escolha essa que foi função direta do processo de produção de partículas. Como mencionado anteriormente, o aumento da quantidade de fármaco prejudicava a eficiência de incorporação, enquanto valores baixos de alginato demonstraram a formação de partículas não definidas e frágeis, e valores altos de alginato dificultaram o processo de gotejamento, por contribuir com o aumento da viscosidade das

soluções. Assim, em função dessas limitações, restringiu-se a faixa de valores a 2,0 a 4,0% (m/V) para o fármaco e 2,0 a 2,8% (m/V) para o alginato.

Apesar da pouca significância demonstrada por todos os parâmetros, é possível observar uma tendência em obter os valores desejados para cada variável, de acordo com os resultados da Tabela 5. No caso da eficiência de incorporação, os maiores valores foram obtidos para as menores quantidades de alginato adicionadas, com pouca variação em toda a faixa de fármaco, enquanto o carregamento foi maior, para maiores quantidades de fármaco e menores quantidades de alginato adicionadas. No caso do tempo para liberação de 85% do fármaco, deseja-se um maior tempo de liberação para obtenção de formulações prolongadas. Pode-se observar que esse resultado foi independente da quantidade de alginato, e aumentou com o acréscimo da quantidade de fármaco adicionada. As formulações K1, K3 e os Centrais apresentaram os maiores valores de eficiência de incorporação, os quais são estatisticamente similares. O tempo de liberação para todas as formulações do planejamento também foram estatisticamente iguais. Sendo assim, se destaca apenas o carregamento, com maior valor obtido para a formulação K3, a qual demonstrou diferença estatística das demais formulações. Pode-se considerar, então, que a formulação K3, composta por 2,5% (m/V) de sericina, 2,0% (m/V) de alginato e 4,0% (m/V) de cetoprofeno, foi a melhor formulação obtida no planejamento experimental.

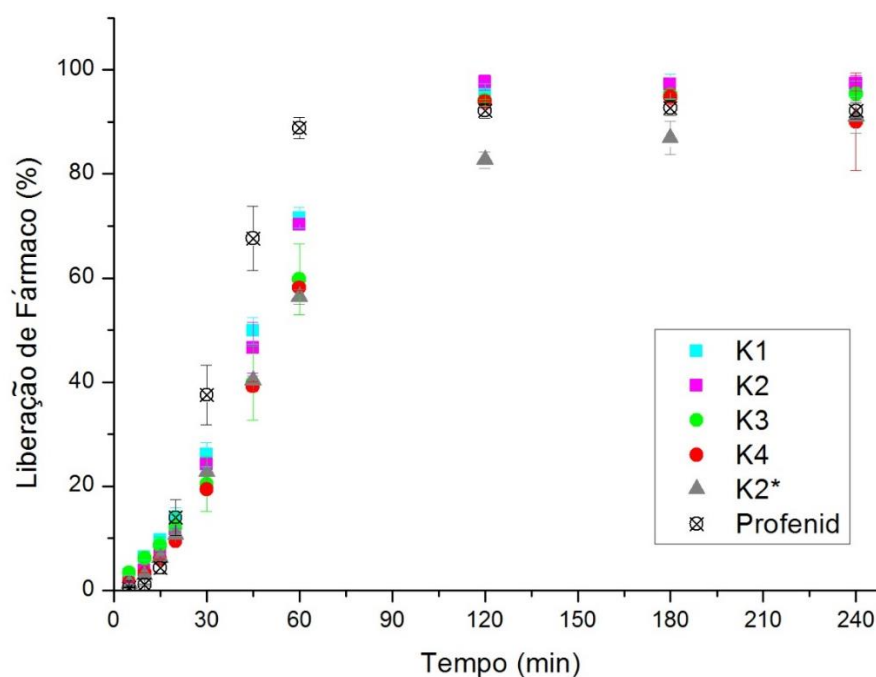
4.1.2 Ensaios de liberação *in vitro*

Como mencionado na Seção 3.2 – Metodologia, os ensaios de liberação *in vitro* das formulações de cetoprofeno do planejamento experimental foram realizados diretamente em tampão fosfato (pH = 6,8), simulando o meio entérico. O caráter gastrorresistente da blenda de sericina e alginato foi verificado por Vidart *et al.* (2018) e, portanto, pretendeu-se no presente trabalho verificar a ocorrência da liberação prolongada. Os perfis de liberação em função do tempo, obtidos para as formulações K1 – K4 e para a formulação K2*, estão apresentados na Figura 24, assim como o perfil obtido nas mesmas condições das formulações do planejamento experimental, para o medicamento referência Profenid® Entérico 100 mg. Ressalta-se que ao final dos ensaios, as partículas compostas somente por alginato e fármaco se diluíam quase completamente. Já as partículas compostas pela blenda e fármaco finalizavam o ensaio mais definidas, mas com caráter bastante intumescido.

Pode-se observar que todas as formulações apresentaram tempo de equilíbrio da liberação semelhante (~180 min), com exceção da formulação K2*, que apresentou tempo

de equilíbrio entre 240 e 300 min, como já era esperado pelo resultado da Tabela 5. Apesar de essa liberação ter ocorrido num tempo curto, quando comparada a outros resultados para a mesma blenda, 1440 min para o ibuprofeno (FREITAS *et al.*, 2018) e 720 min para a furosemida (BEZERRA, 2018), pode-se considerar que houve uma prolongação da liberação ao comparar com o medicamento referência Profenid® Entérico. Shohin *et al.* (2012) realizaram uma revisão da literatura e de dados experimentais para auxiliar na decisão de renunciar a testes de bioequivalência *in vivo* para aprovação de formas sólidas de dosagem oral e liberação imediata do cetoprofeno (processo conhecido como *biowaiver*, ou bioisenção). Os autores verificaram que se alguns pré-requisitos de formulação e ensaios *in vitro* fossem satisfeitos, seria possível dispensar os ensaios *in vivo*. Dentre os critérios citados, os autores estabeleceram que 85% do fármaco deveria ser liberado em até 30 min, em tampão com pH 6,8. O resultado obtido no presente trabalho foi de tempos de liberação acima de 90 min para liberação de 85% do fármaco (Tabela 5), o que indica perfil diferente do esperado para sistemas de liberação imediata do cetoprofeno em meio tampão pH 6,8. Pode-se considerar então que a blenda de sericina e alginato possibilitou obter prolongação da liberação com possibilidade de melhorar a eficácia terapêutica do medicamento.

Figura 24 – Curvas de dissolução das formulações K1 – K4 do planejamento experimental e do Profenid® Entérico, obtidas em tampão pH 6,8.



Pode-se observar que as formulações desenvolvidas apresentaram uma liberação mais lenta do que aquela apresentada pelo medicamento referência. Além disso, a liberação

dele atinge um patamar em valor de liberação mais baixo (~ 91%) do que o obtido para a maioria das formulações do presente trabalho (~ 95%), demonstrando que há possibilidade de maior disponibilidade de fármaco para a ação terapêutica nas formulações desenvolvidas nesse trabalho. Essa diferença entre os resultados das formulações e do Profenid pode ser analisada pelo fator de similaridade (f2), altamente recomendado para comparação de curvas de dissolução e calculado de acordo com a Eq. 15. Duas curvas de dissolução são consideradas similares se $50 < f2 < 100$ (KALEEMULLAH *et al.*, 2017).

$$f2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{x} \sum_{x=1}^x (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad (15)$$

Em que R_t é o valor de dissolução referência no tempo t , T_t é o valor de dissolução da formulação a ser comparada no mesmo tempo e x é o número de pontos da dissolução. A Tabela 6 apresenta os dados de f2 obtidos ao se comparar a curva de dissolução de cada formulação com a curva obtida para o medicamento referência.

Tabela 6 – Fator de similaridade (f2) *in vitro* para comparação dos perfis de dissolução obtidos para as formulações e o Profenid® Entérico.

Formulação	ALG (%, m/V)	CETO (%, m/V)	f2	Perfil de Dissolução
K1	2,0	2,0	48,35	Diferente
K2	2,8	2,0	46,22	Diferente
K3	2,0	4,0	38,74	Diferente
K4	2,8	4,0	37,98	Diferente
Centrais	2,4	3,0	40,07	Diferente
K2*	2,8	2,0	38,37	Diferente

Observa-se na Tabela 6 que nenhuma formulação apresentou valor de $f2 > 50$, indicando que não há similaridade entre as curvas de dissolução das formulações obtidas e a curva do medicamento comercializado. Assim, pode-se concluir que a nova forma farmacêutica tem perfil de dissolução diferenciado em comparação ao Profenid® Entérico, também desenvolvido para ser gastrorresistente, porém com liberação mais rápida ao atingir o meio entérico.

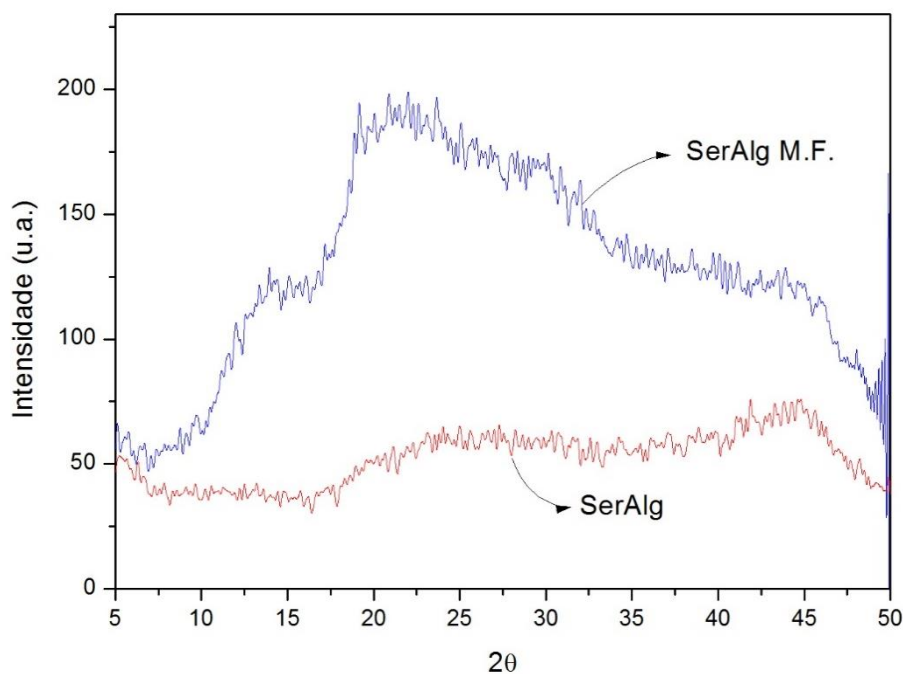
4.1.3 Caracterização das partículas de cetoprofeno obtidas pelo planejamento experimental

A etapa de caracterizações das partículas de cetoprofeno foi realizada sobre todas as formulações do planejamento experimental e sobre o fármaco cetoprofeno puro. Quando fosse necessário, para efeitos de comparação, foi analisada também a formulação contendo somente a blenda de sericina e alginato, com composição similar à dos pontos centrais do planejamento, por ser a composição intermediária dentre todas as analisadas.

4.1.3.1 Cristalinidade

A fim de avaliar as interações entre os componentes da matriz polimérica, sericina e alginato, foi realizada a difração de raios X sobre a blenda e também sobre a mistura física dos componentes da blenda. Para isso, a sericina foi extraída e seca a 100 °C, e depois foi misturada ao alginato comercial. Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 25, em que M.F. se refere à mistura física.

Figura 25 – Difratogramas obtidos por DRX para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e para a mistura física de sericina e alginato (SerAlg M.F.).



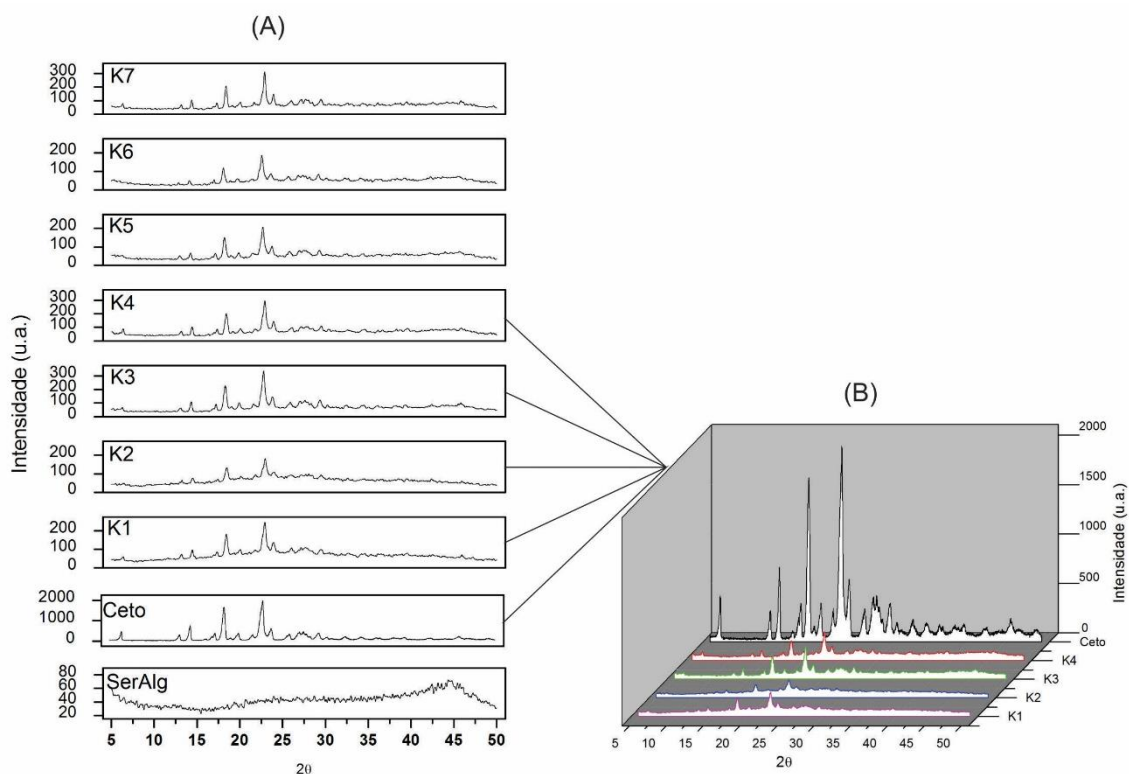
Pode-se observar que tanto o difratograma das partículas formadas pela blenda de sericina e alginato (SerAlg) quanto o da mistura física dos componentes (SerAlg M.F.), apresentam característica predominantemente amorfa, com alguns picos cristalinos

representativos de seus componentes, mais evidentes na mistura física. A sericina de alta massa molar apresenta uma banda típica próxima a 20° , característica de sua conformação de folhas- β cristalinas, além de bandas mais amplas próximas a 10° , 28° e 43° (GUPTA *et al.*, 2013; MIYAKE *et al.*, 2003), enquanto o alginato apresenta picos característicos em $13,5^\circ$, 22° e 39° relativos às estruturas de poliguluronatos, polimanuronatos e outros halos amorfos, respectivamente (SUNDARRAJAN *et al.*, 2012). Ao comparar os difratogramas da Figura 25, observa-se a redução na intensidade dos picos característicos da sericina e alginato em SerAlg, em função da redução no grau de cristalinidade, possivelmente pela forte interação intermolecular entre seus componentes, causada pela reticulação e formação da blenda. Esse fato confirma a boa compatibilidade entre os polímeros da blenda, com uma mudança para uma característica mais amorfa. Considerando a aplicação farmacêutica, é desejável que esse perfil seja atingido, tornando as partículas mais solúveis e permitindo a liberação do fármaco de forma gradual.

Na Figura 26 (A) os difratogramas das partículas compostas pela blenda de sericina e alginato (SerAlg) são comparados aos difratogramas obtidos para as formulações do planejamento experimental (K1 – K7) e para o fármaco cetoprofeno puro (Ceto).

O difratograma do cetoprofeno puro apresenta característica predominantemente cristalina, com picos bem definidos em $2\theta = 13,13^\circ$, $14,38^\circ$, $17,31^\circ$, $18,37^\circ$, $20,07^\circ$, $22,86^\circ$ e $23,88^\circ$ (SALMAN *et al.*, 2015). Ao se analisar os difratogramas das formulações K1 – K7, observa-se grande semelhança entre todos eles, com característica cristalina predominante e com os picos do cetoprofeno ainda detectados na mesma posição, indicando que ele não sofreu grandes mudanças estruturais ao ser incorporado, se apresentando ainda na forma de cristais no interior das partículas (BELKACEM; SHEIKH SALEM; ALKHATIB, 2015). No entanto, analisando-se a Figura 26 (B), na qual se comparam as intensidades dos picos do fármaco e das formulações K1 – K4 observa-se uma redução significativa dessa intensidade. Ressalta-se que foram apresentadas somente essas formulações em função da semelhança com as demais. Assim, conclui-se que parte do fármaco incorporado se apresenta numa forma amorfa, em função da mistura física ou dissolução na matriz polimérica. Essa mistura ocorre por meio dos grupos funcionais da blenda se ligando a uma pequena fração dos grupos funcionais do fármaco através, por exemplo, de ligações do tipo ponte de hidrogênio. Resultado similar foi observado por Mathew *et al.* (2009), que verificaram que o cetoprofeno incorporado em microesferas de albumina também apresentou característica cristalina, com parte do fármaco convertida à forma amorfa.

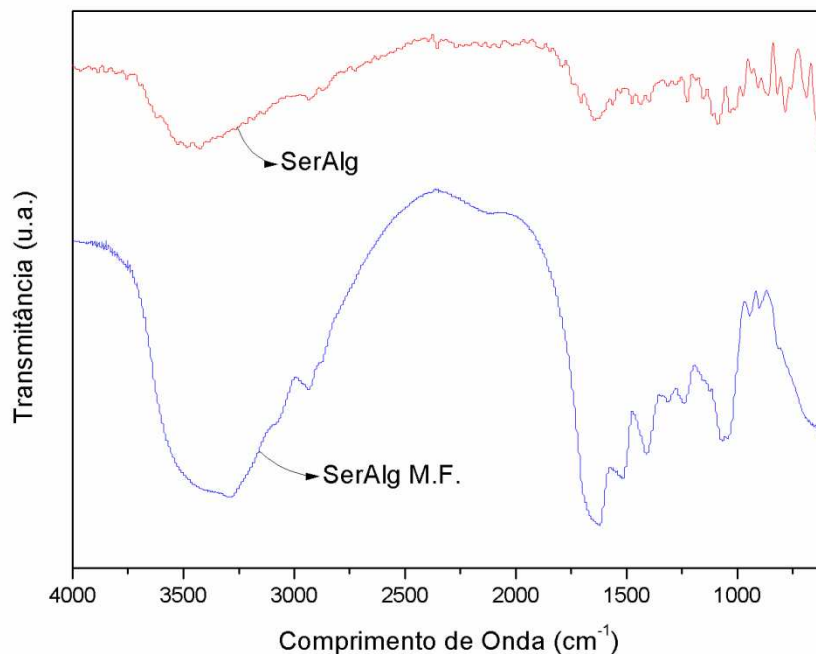
Figura 26 – (A) Difratomogramas obtidos por DRX para as formulações do planejamento experimental (K1 – K7), para o fármaco puro (Ceto) e para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e (B) difratogramas obtidos para as formulações K1 – K4 e para o fármaco puro (Ceto), evidenciando suas intensidades.



4.1.3.2 Grupos funcionais

Para avaliar os grupos funcionais, também foi realizada a análise de FT-IR sobre a blenda de sericina e alginato e sobre a mistura física desses compostos, com os espectros apresentados na Figura 27, sendo M.F. correspondente à mistura física.

Figura 27 – Espectros de FT-IR obtidos para a blenda de sericina e alginato (SerAlg) e para a mistura física de sericina e alginato (SerAlg M.F.).



A análise de FT-IR é uma técnica amplamente empregada na identificação de grupos funcionais, uma vez que esses grupos são capazes de absorver energia em comprimentos de onda específicos, permitindo sua identificação (MOODY; NEEDLES, 2004). A sericina, sendo uma proteína, apresenta bandas características de grupos amida. Duas bandas relacionadas a amidas A e B podem ser visualizadas na faixa de 3000 – 3500 cm^{-1} , e são relacionadas ao alongamento N – H, que se sobrepõe aos resíduos hidroxilados de aminoácidos. Outros grupos amida presentes na sericina podem ser identificados no espectro, como a amida I (1600 – 1700 cm^{-1}), amida II (1504 – 1582 cm^{-1}) e amida III (1200 – 1350 cm^{-1}). A região da amida I possibilita a identificação das estruturas secundárias dessa proteína, a qual é composta predominantemente por uma estrutura de bobina aleatória amorfa (solúvel) e, em menor quantidade, por uma estrutura organizada de folhas- β cristalinas (difícil de dissolver) (CASTRILLÓN *et al.*, 2018; PADAMWAR; PAWAR, 2004). No espectro da SerAlg M.F. observa-se um pico em 1620 cm^{-1} , correspondente às folhas- β . Na blenda (SerAlg), a intensidade desse pico é reduzida e ele é deslocado para a faixa de 1647 – 1655 cm^{-1} , que é equivalente à estrutura de bobinas aleatórias (HU; KAPLAN; CEBE, 2006). Assim, pode-se concluir que a reticulação, associada à formação da blenda, contribuiu para a transformação da estrutura secundária da

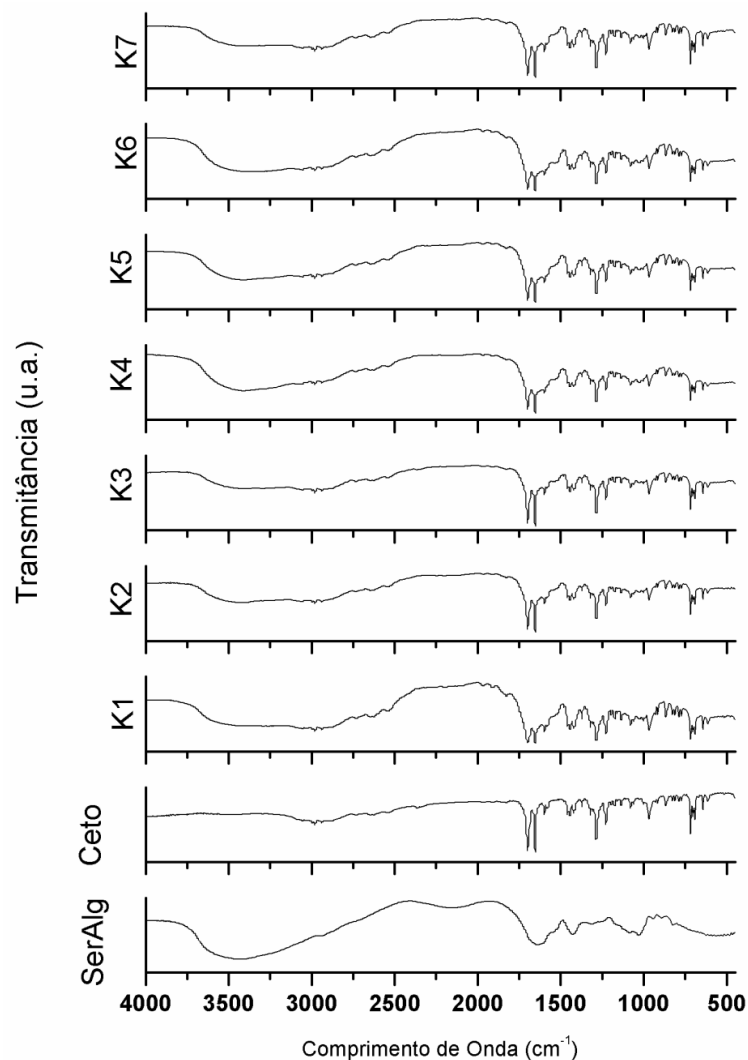
sericina, de folhas- β para bobinas aleatórias (TURBIANI *et al.*, 2011). Isso confirma o que havia sido observado na análise de DRX, na qual houve a redução do pico equivalente à estrutura cristalina, e corrobora com a aplicação farmacêutica dessa blenda. Ao obter uma forma mais solúvel, é possível obter a liberação gradual de fármaco ao permitir o inchamento da matriz polimérica em contato com solução aquosa.

No que se refere à estrutura do alginato, na faixa de $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$, ocorre uma banda ampla referente ao estiramento – OH de polissacarídeos naturais (SAARAI *et al.*, 2013). Esta banda pode também estar relacionada aos grupos amida A e B da sericina e teve sua intensidade reduzida na blenda (SerAlg), possivelmente pela redução das ligações intramoleculares. Saaraí *et al.* (2013) desenvolveram hidrogéis de alginato e gelatina e concluíram que um pico em 1025 cm^{-1} , seguido da banda em 1071 cm^{-1} , relacionado aos estiramentos C – C e C – O, estão diretamente ligados à ocorrência da reticulação. Bandas similares são visualizadas no espectro da SerAlg, mas não ocorrem em SerAlg M.F., confirmando a ocorrência desse processo. Outras bandas do alginato coincidem com aquelas dos grupos amida da sericina, e estão presentes somente no espectro de SerAlg M.F., sendo elas em 1620 e 1410 cm^{-1} , referentes ao estiramento de grupos carboxila assimétrico e simétrico, respectivamente (WANG; WANG; HUANG, 2017).

Na Figura 28, são apresentados os espectros de infravermelho das formulações K1 – K7 e do fármaco cetoprofeno puro, comparados ao espectro da blenda de sericina e alginato.

O espectro do cetoprofeno puro apresenta algumas bandas características desse fármaco. Próximo a 3000 cm^{-1} , se refere à vibração de alongamento do anel aromático; em 1696 e 1651 cm^{-1} ocorre pelo estiramento C = O do ácido carboxílico e da cetona, respectivamente; e em 1601 e 1440 cm^{-1} , pelo estiramento C = C e C – C do anel aromático (AL-TAHAMI, 2014; VITTAL *et al.*, 2012). Com relação às formulações K1 – K7, picos similares ao do fármaco puro são observados, além da ampla banda próxima a 3500 cm^{-1} , característica da matriz polimérica. Não houve desaparecimento ou substituição de qualquer banda, indicando que não ocorre uma forte interação entre o fármaco e os polímeros da blenda (fármaco mantém sua característica original), confirmando também sua compatibilidade e estabilidade no processo de incorporação. O resultado da Figura 28 confirma o que foi observado na análise de DRX, de que o fármaco se encontra predominantemente em sua forma cristalina, mesmo quando incorporado nas formulações.

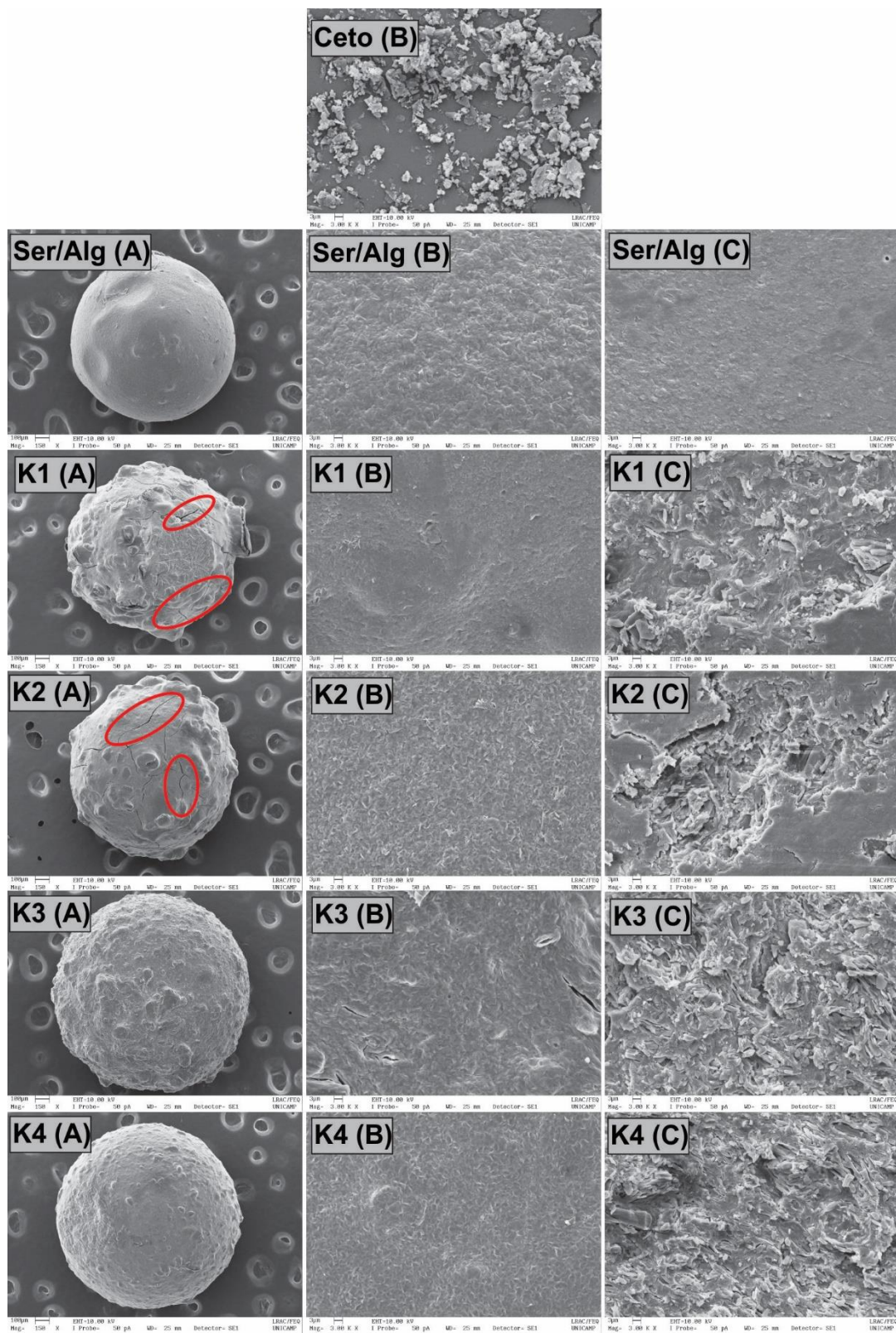
Figura 28 – Espectros obtidos por FT-IR para as formulações K1 – K7, para o fármaco puro (Ceto) e para a blenda de sericina e alginato (SerAlg).



4.1.3.3 Análise morfológica

Na Figura 29 são apresentadas as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para a blenda de sericina e alginato, para o fármaco cetoprofeno puro e para as formulações K1 – K4. As micrografias das demais formulações não foram apresentadas, pois sua análise se assemelha às apresentadas. Para uma melhor avaliação, foram obtidas micrografias do corte da seção transversal das partículas, identificadas na Figura pela letra (C), possibilitando visualizar seu interior.

Figura 29 – Micrografias obtidas por MEV da blenda de sericina e alginato (SerAlg), do cetoprofeno puro (Ceto) e das formulações K1 – K4, nas ampliações de (A) 150x, (B) e (C) 3000x. As micrografias (A) e (B) foram obtidas da superfície externa das partículas e as micrografias (C) a partir do corte da seção transversal das partículas.



Analisando as micrografias (A), com ampliação de 150x, pode-se observar que aquela composta somente pela blenda de sericina e alginato (SerAlg) é a que apresenta superfície mais homogênea, sem as rugosidades observadas nas partículas das formulações K1 – K4. No caso das formulações, observa-se um aumento do tamanho das partículas, maior homogeneidade e desaparecimento das fissuras (identificadas em vermelho na Figura), influenciados principalmente pelo aumento da quantidade de fármaco adicionada (formulações K3 e K4). Essa característica contribuiu para retardar a liberação do fármaco, observada na Tabela 5, possivelmente por dificultar a penetração de solução aquosa, requerida para o inchamento e desintegração das partículas. As fissuras de K1 e K2 contribuíram para um menor tempo de liberação de 85% do fármaco, enquanto o oposto ocorreu para K3 e K4.

Nas micrografias com ampliação de 3000x obtidas da superfície externa das partículas (K1 – K4 (B)) não é possível observar a presença do fármaco, uma vez que estas se assemelham muito à estrutura visualizada em SerAlg (B). Isso indica que o fármaco se encontra no interior dessas partículas, o que pode ser confirmado pelas micrografias do corte da seção transversal (K1 – K4 (C)). Em SerAlg (C), observa-se uma superfície lisa, inclusive mais do que aquela observada externamente (SerAlg (B)), possivelmente pelo elevado grau de reticulação atingido na formação da blenda. Nas formulações, é possível observar a presença dos cristais de fármaco semelhantes àqueles da micrografia Ceto (B), confirmando o que havia sido analisado no DRX e no FT-IR, de que o fármaco incorporado manteve sua característica predominantemente cristalina.

4.1.3.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho

Por meio da microscopia ótica foram obtidas imagens das partículas com ampliação de 10x e, utilizando o programa ImageJ®, mediu-se o diâmetro de 500 partículas de cada formulação. Na Tabela 7, apresentam-se o diâmetro médio obtido para cada formulação, assim como o R^2_{aj} obtido do ajuste Gaussiano (função normal) à frequência relativa da distribuição. Os perfis de distribuição de tamanhos obtidos são apresentados na Figura 30.

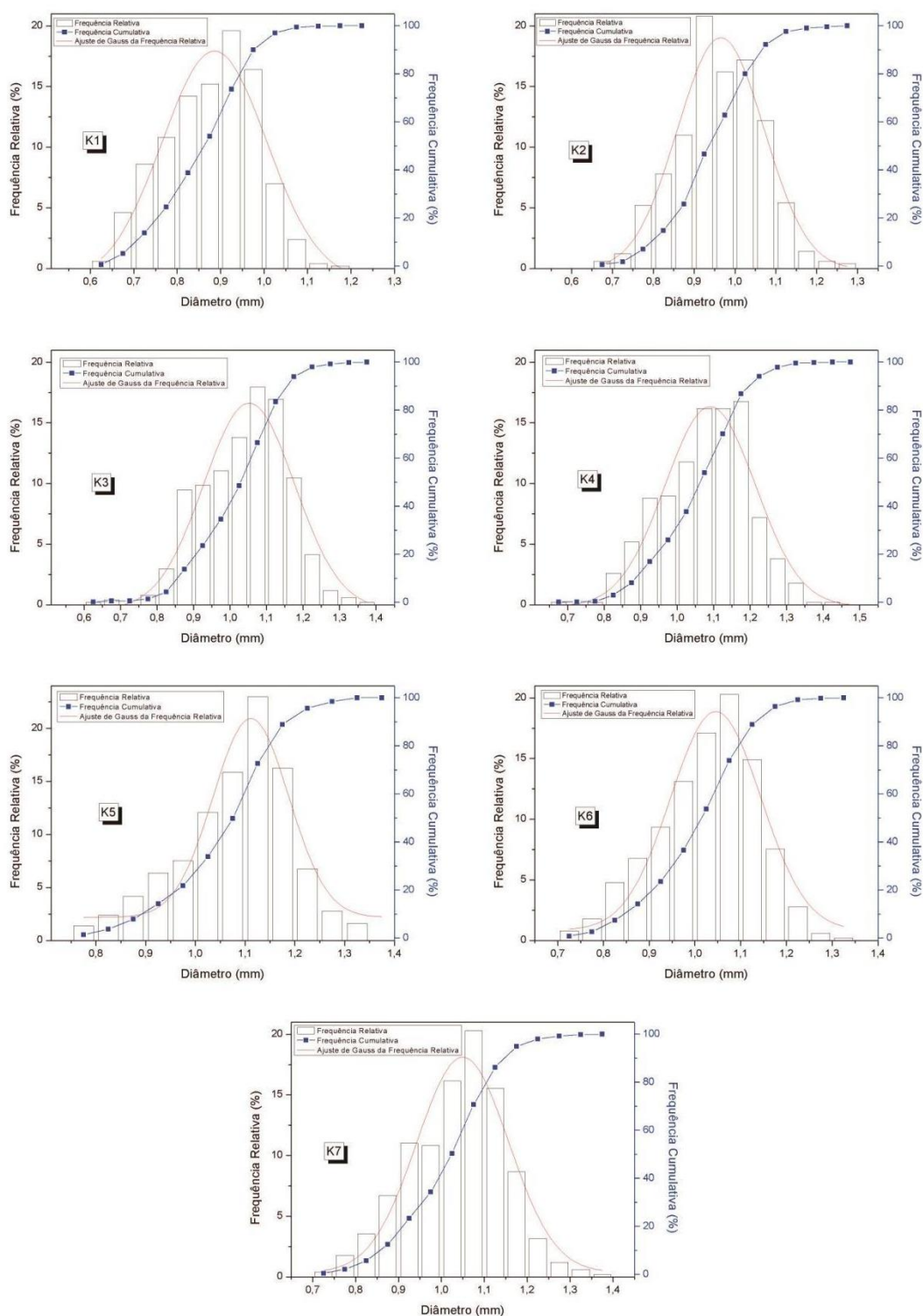
Tabela 7 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações K1 – K7.

Formulação	Diâmetro Médio (mm)	R^2_{aj}
K1	$0,88 \pm 0,10$	0,907
K2	$0,96 \pm 0,10$	0,938
K3	$1,04 \pm 0,11$	0,907
K4	$1,08 \pm 0,12$	0,922
K5	$1,08 \pm 0,11$	0,905
K6	$1,03 \pm 0,11$	0,936
K7	$1,04 \pm 0,11$	0,920

As formulações de cetoprofeno apresentaram diâmetro médio na faixa de $0,88 \pm 0,10$ a $1,08 \pm 0,12$ mm, tamanho adequado para partículas a serem empregadas em sistemas multiparticulados, as quais devem apresentar diâmetros na faixa de 0,05 – 2,00 mm (DEY; MAJUMDAR; RAO, 2008). Estatisticamente, pelo teste comparativo de médias de Tukey, todos os diâmetros são equivalentes com 95% de confiança. Porém, pode-se analisar a tendência dos tamanhos obtidos. Ao se aumentar as quantidades de alginato e de fármaco adicionadas, houve também um aumento dos diâmetros das partículas, em função da maior quantidade de material compondo essas partículas, conforme já havia sido observado nas micrografias da Figura 29.

O tamanho e distribuição de tamanhos das partículas carregadas com fármacos podem influenciar a administração do medicamento, sua distribuição no organismo, a degradação da matriz carregadora, a cinética de liberação e a eficiência terapêutica, sendo considerados parâmetros cruciais para a segurança do paciente durante a terapia medicamentosa (UYEN *et al.*, 2019). Em relação aos dados obtidos na Tabela 7, não foi possível observar uma relação direta entre o tamanho das partículas e os parâmetros eficiência de incorporação e carregamento de fármaco. No entanto, os maiores tempos de liberação de 85% do fármaco incorporado ocorreram para as maiores partículas. Isso pode ter ocorrido porque no caso de partículas maiores, uma menor área de superfície em relação à massa total está exposta ao meio de dissolução, o qual deve penetrar nas partículas para intumescê-las e permitir a liberação do fármaco.

Figura 30 – Distribuição de tamanhos obtida para as formulações K1 – K7.



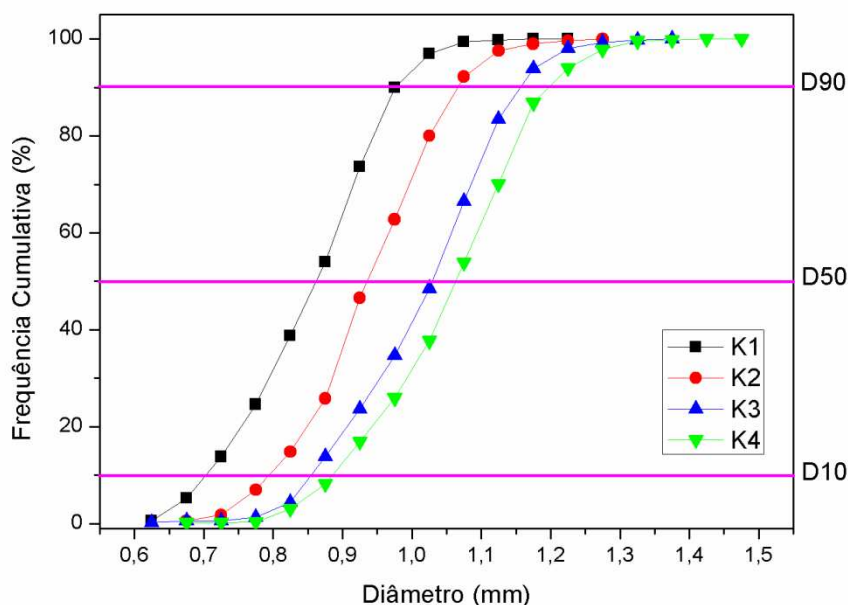
O perfil de frequência relativa mostra a porcentagem de partículas, dentre o total, que apresenta determinado diâmetro. Por exemplo, no caso da formulação K1, 19,6% das partículas apresentam diâmetro de 0,925 mm. Já o perfil de frequência cumulativa se refere à porcentagem de partículas que são menores do que o valor de diâmetro correspondente. É

importante avaliar esses parâmetros, pois mesmo que duas amostras apresentem o mesmo diâmetro médio, é possível que sua distribuição seja diferente (GRIESSER; STOWELL, 2003). A partir da frequência cumulativa, é possível obter os parâmetros D10, D50 e D90 que se referem aos valores de diâmetro que limitam o tamanho de 10, 50 e 90% do total de amostra, respectivamente. A partir desses parâmetros, pode-se obter o *Span* da distribuição, o qual permite caracterizar sua amplitude, conforme a Eq. 16.

$$Span = \frac{D90 - D10}{D50} \quad (16)$$

O *Span* fornece uma indicação de quão distantes estão os valores de D10 e D90, normalizados pelo ponto médio (D50). Com isso, obtém-se a amplitude da distribuição de tamanhos, a qual deve ser a menor possível para caracterizar maior homogeneidade nos tamanhos das partículas. Deve-se ressaltar que um bom ajuste do modelo de Gauss não indica, necessariamente, baixa amplitude da distribuição. Para melhor análise, calcularam-se os valores de *Span* apenas das formulações K1 – K4, a partir dos perfis de frequência cumulativa da Figura 31. Nela, as linhas em rosa destacam as bases para determinação de D10, D50 e D90.

Figura 31 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações K1 – K4.



As formulações K1, K2, K3 e K4 apresentaram, nessa ordem, os seguintes valores de *Span*: 0,279, 0,280, 0,296 e 0,299. Pode-se concluir que o aumento de alginato, mas principalmente o aumento de fármaco, adicionados inicialmente, contribui para amplificar a

distribuição de tamanho (aumento do valor do *Span*). Isso ocorre, pois há um aumento da viscosidade da solução a ser gotejada, contribuindo para aumentar a coalescência das partículas e, conseqüentemente, alargar a distribuição de tamanhos (AZEVEDO; PINTO, 2019).

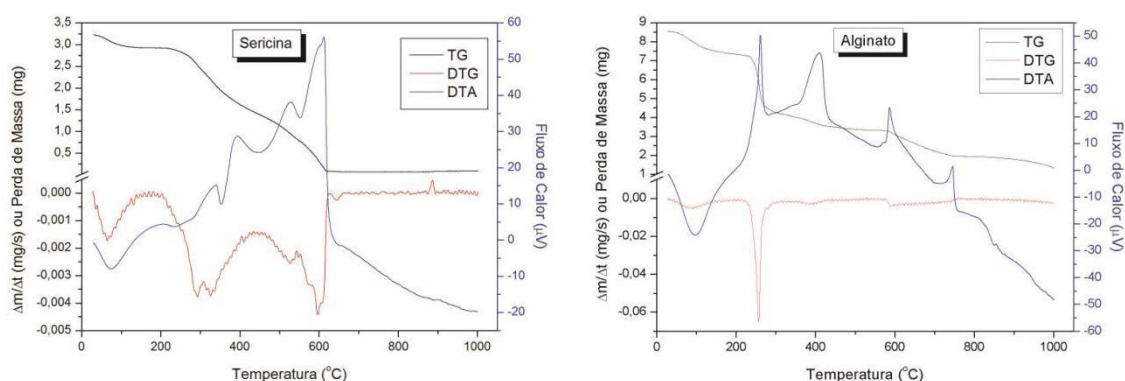
No que se refere aos ajustes de Gauss da frequência relativa, apresentados na Figura 31, com os respectivos R^2_{aj} apresentados na Tabela 7, pode-se observar que todos apresentaram um bom ajuste, seguindo uma distribuição normal, com valores de R^2_{aj} acima de 0,9 para todas as formulações. Pelos valores obtidos, pode-se concluir que o alginato contribui para melhorar esse ajuste, com os melhores valores de R^2_{aj} encontrados para as formulações com as maiores quantidades de alginato.

4.1.3.5 Análises térmicas

Diversas técnicas podem ser empregadas para realizar a análise térmica de determinada amostra. Dentre as mais comuns, podem ser citadas a análise térmica diferencial, DTA, a calorimetria exploratória diferencial, DSC, e a análise termogravimétrica, TG. Na DTA, mede-se a diferença de temperatura entre a amostra e uma referência, que não sofre mudanças de fase, submetidas a um aumento de temperatura controlado. Sua limitação reside no fato de não permitir quantificar os resultados de entalpia das transições da amostra. Por essa razão, foi concebida a análise de DSC, visando justamente eliminar tais limitações. Nesse caso, mede-se a diferença de fluxo de calor entre a amostra e a referência. Na análise de TG (e, conseqüentemente, em sua derivada DTG) mede-se a mudança na massa da amostra em função do aumento de temperatura a que ela está submetida (STODGHILL, 2010).

As análises de TG/DTG e DTA foram realizadas simultaneamente e, inicialmente, sobre os componentes da blenda, sericina e alginato. Na Figura 32 são apresentados os perfis obtidos para essas duas amostras, para posterior comparação com a blenda formada.

Figura 32 – Perfis de TG/DTG e DTA obtidos para a sericina e alginato puros.

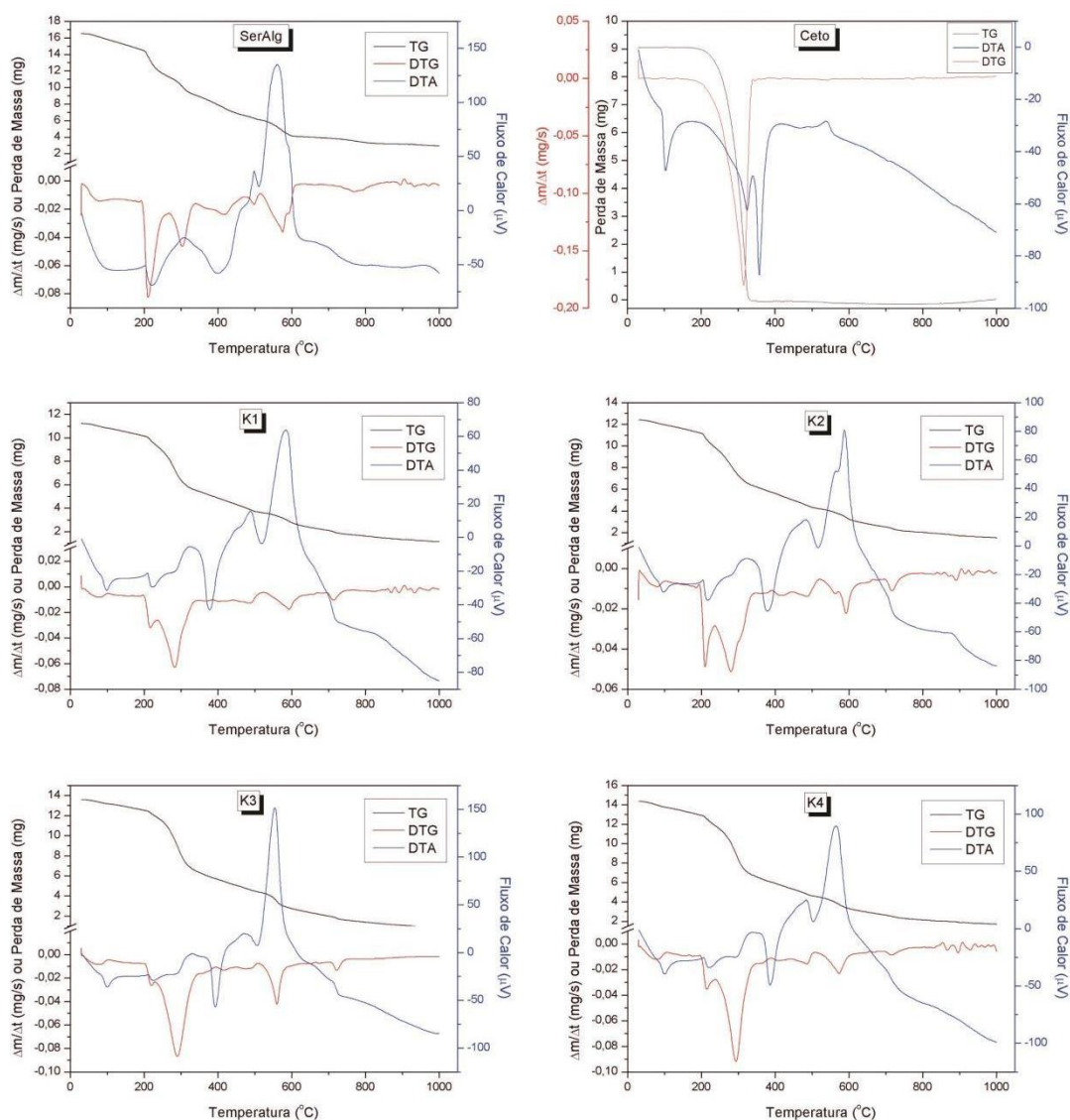


Analisando-se as curvas TG/DTG da sericina, observam-se diversas perdas de massa, associadas aos fenômenos que podem ser observados na curva de DTA. Próximo a 70 °C, a perda está associada à evaporação de água. Na faixa entre 200 – 600 °C ocorre uma perda de massa mais significativa, com diferentes regiões de decomposição: entre 200 e 308 °C, entre 308 e 446 °C e entre 446 e 600 °C. Nessa faixa, as perdas de massa se associam a degradações dos grupos laterais dos aminoácidos e clivagem das ligações peptídicas (ZHANG *et al.*, 2012). Na curva de DTA, picos exotérmicos nessa faixa estão associados à decomposição (quando há perda de massa correspondente), mas também à recristalização (sem perda de massa) de estruturas de bobinas aleatórias em folhas- β (MAGOSHI *et al.*, 1977; STODGHILL, 2010).

As curvas de TG/DTG do alginato indicam uma pequena perda de massa próxima a 100 °C, também representada por um pico endotérmico na curva de DTA, relacionada à perda de água. Porém, a perda mais pronunciada ocorre em 256 °C, referente à degradação das cadeias carbônicas do alginato e formação de Na_2CO_3 e material carbonizado, o qual decompõe de forma mais lenta na faixa de 600 – 750 °C. Todas essas perdas se relacionam aos picos exotérmicos observados na curva de DTA (SOARES *et al.*, 2004). Ao final do ciclo de aquecimento, restou ainda cerca de 15% da amostra como um resíduo formado por material inorgânico e altamente estável a altas temperaturas (acima de 800 °C), resultado similar ao reportado por outros autores (FERNANDES *et al.*, 2018; SKWAREK *et al.*, 2017).

Na Figura 33 são apresentados os perfis de TG/DTG e DTA obtidos para a blenda de sericina e alginato, para o cetoprofeno puro e para as formulações K1 – K4. As demais não foram apresentadas devido à similaridade na análise.

Figura 33 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (SerAlg), para o cetoprofeno puro (Ceto) e para as formulações K1 – K4.



Analisando-se as curvas de SerAlg, observa-se novamente uma pequena perda de massa relacionada à umidade, abaixo de 100 °C. Em seguida, na faixa de 200 a 600 °C ocorrem perdas de massa mais significativas em diferentes estágios, com as mais pronunciadas em 200, 300, 400 e 600 °C. Como observado anteriormente, essas perdas estão associadas aos fenômenos de decomposição da sericina e do alginato. No caso da sericina, ocorre a degradação de grupos laterais e clivagem das ligações peptídicas. Já o alginato se decompõe em subprodutos pela destruição das ligações das cadeias carbônicas. Na curva de DTA, até 400 °C, a perda de massa está relacionada a fenômenos endotérmicos, sendo que nos componentes puros (Figura 32) as perdas nessa faixa se associavam a fenômenos exotérmicos. Possivelmente, a redução do grau de cristalinidade

observada nas análises de DRX e FT-IR causaram essa alteração. Assim, após a formação da blenda, o aumento da temperatura pode provocar mudanças na estrutura da blenda, com movimentos segmentares das cadeias amorfas, associados à absorção de calor. Esses movimentos são facilitados pela aleatorização das cadeias poliméricas (NAGURA *et al.*, 2001). Na faixa de 500 – 600 °C há a ocorrência de fenômenos exotérmicos bastante significativos, associados à decomposição do material que compõe a blenda e formação de subprodutos. Mais uma vez, cerca de 17% de material inorgânico permanece como resíduo da análise, possivelmente por sua elevada estabilidade a altas temperaturas.

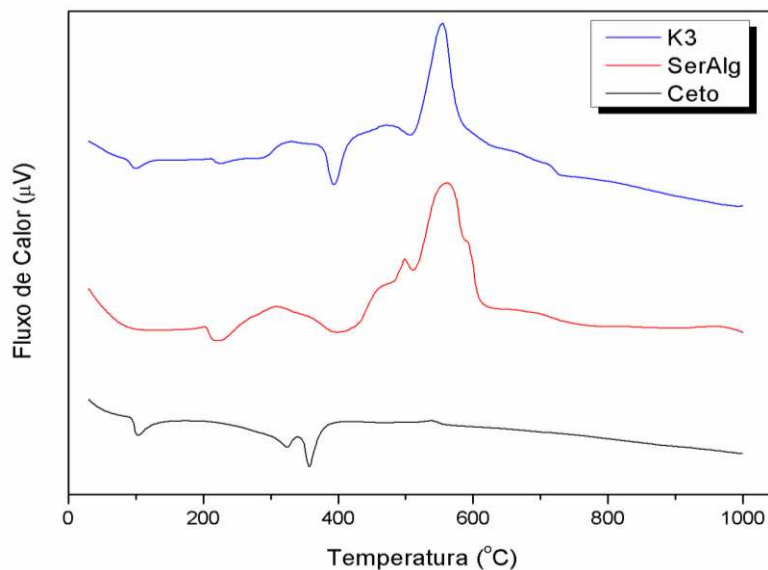
As curvas de TG/DTG do cetoprofeno foram separadas em dois eixos y à esquerda do gráfico, para melhor visualização. Observa-se que esse fármaco apresenta perda de massa em uma etapa, na faixa entre 200 – 340 °C. Na curva de DTA, há a ocorrência de um pico acentuado entre 90 – 130 °C, referente à fusão do material e sem perda de massa equivalente. Na literatura, a fusão do cetoprofeno é reportada na faixa 94 – 97 °C. Próximo a 400 °C observam-se a ocorrência de dois eventos endotérmicos em sequência, os quais correspondem à decomposição térmica do fármaco, e estão associados à perda significativa observada anteriormente (TIȚA; FULIAȚ; TIȚA, 2013).

Observando-se então as curvas de TG/DTG e DTA das formulações obtidas (K1 – K4), observa-se bastante semelhança com os perfis obtidos para a blenda, adicionados do fenômeno de fusão e decomposição do fármaco, visualizados especialmente na DTA. Próximo a 100 °C, além do fenômeno de desidratação, há a fusão do cetoprofeno e, por isso, os picos de DTA das formulações nessa faixa são mais pronunciados.

Para verificar a compatibilidade entre o fármaco e os componentes da blenda, plotaram-se no mesmo gráfico as curvas de DTA obtidas para SerAlg, Ceto e a formulação K3, conforme exposto na Figura 34 (OLIVEIRA; FERRAZ; MATOS, 2005).

Pode-se observar bastante semelhança entre os perfis obtidos, com a ocorrência dos eventos térmicos das espécies isoladas e sobreposição das curvas individuais. Considerando a curva de K3 como uma soma dos eventos térmicos observados em SerAlg e Ceto, pode-se assumir que não houve interação entre o fármaco e a blenda, confirmando sua compatibilidade. O principal evento térmico associado é a fusão do fármaco, que permanece em sua faixa original, mesmo após a incorporação à blenda de sericina e alginato.

Figura 34 – Curvas de DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (SerAlg), para o fármaco puro (Ceto) e para a formulação K3.



4.1.4 Análise geral da produção de partículas de cetoprofeno incorporado à blenda de sericina e alginato

Diante de todas as análises apresentadas a cerca da incorporação do cetoprofeno à blenda de sericina e alginato, foi possível observar que poucas variações foram obtidas a partir do planejamento experimental aqui proposto. As limitações nas faixas de quantidades de fármaco e de alginato adicionados fez com que pouca variação fosse observada nas formulações obtidas. Apesar disso, verificou-se um aumento da eficiência de incorporação e do carregamento pela redução da quantidade de alginato, além de aumento no carregamento e no tempo de liberação pelo aumento da quantidade de fármaco. Apesar de ter sido demonstrada a obtenção de uma nova forma farmacêutica, o tempo de liberação total foi de 3 h, inferior a resultados obtidos para outros fármacos como ibuprofeno (FREITAS *et al.*, 2018) e furosemida (BEZERRA, 2018), abrindo margem para novos ensaios visando prolongar ainda mais a liberação do cetoprofeno.

Para isso, recorreu-se à adição de um agente reticulante covalente à blenda de sericina e alginato, o que possibilita obter hidrogéis com uma estrutura tridimensional permanente, dada a característica irreversível das ligações covalentes. Com isso, é possível obter maior resistência mecânica das partículas, proporcionando um melhor controle da liberação do fármaco (BERGER *et al.*, 2004). A composição das novas formulações foi baseada no melhor resultado obtido na etapa anterior, ou seja, da formulação K3 (2,5% (m/V) de sericina, 2,0% (m/V) de alginato e 4,0% (m/V) de cetoprofeno).

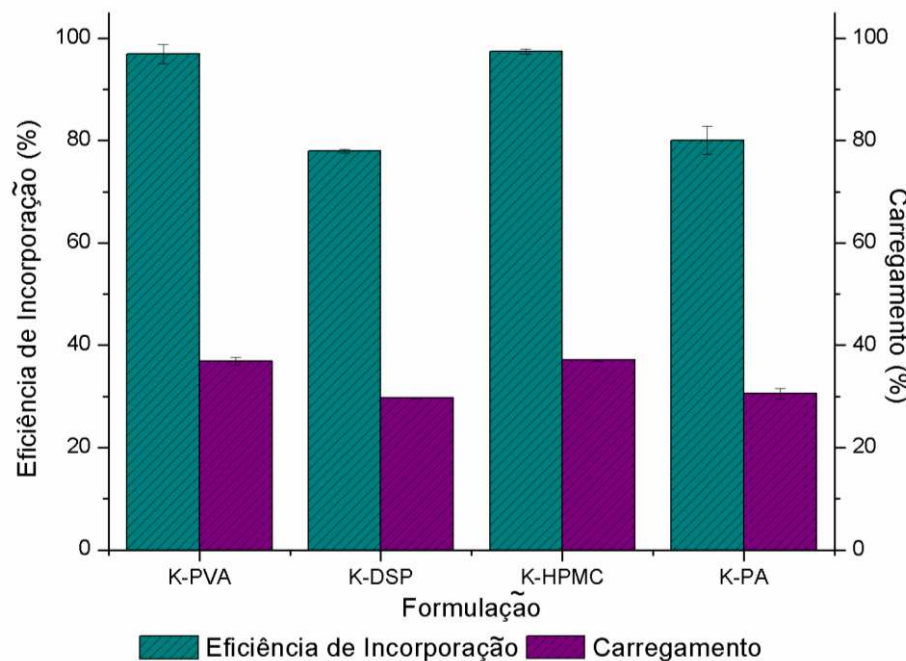
4.1.5 Avaliação de agentes reticulantes covalentes adicionados às partículas de cetoprofeno

4.1.5.1 Determinação do agente reticulante

Para determinar o melhor agente reticulante covalente para o sistema sericina/alginato/cetoprofeno, foram avaliados os seguintes compostos: álcool polivinílico (PVA), fosfato de sódio dibásico (DSP), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e proantocianidina (PA). O PVA, um polímero sintético hidrofílico com baixa toxicidade e característica de degradabilidade (NARRA *et al.*, 2012), foi previamente reportado como agente reticulante tanto da sericina (CHAO *et al.*, 2018) quanto do alginato (ANWAR *et al.*, 2017). Já o DSP, reagente de baixo custo amplamente empregado para obter formas farmacêuticas biodegradáveis e biocompatíveis (LI *et al.*, 2011), foi reportado como reticulante da celulose (WIT, 2015) e da quitosana (FREGNAN *et al.*, 2016). O HPMC é um polímero sintético obtido a partir de modificações da celulose e que apresenta baixa toxicidade (BURDOCK, 2007), com resultados reportados para reticulação da quitosana (ZEESHAN *et al.*, 2018). A PA é um metabólito natural composto por estruturas polifenólicas e comumente extraído de sementes de uvas, possui baixa toxicidade e biocompatibilidade, tendo sido reportado como reticulante do colágeno (HAN *et al.*, 2003) e da gelatina (HUANG *et al.*, 2012).

Dessa forma, as partículas foram produzidas utilizando 2% (m/V) do respectivo agente reticulante na composição da formulação K3, sendo obtidas as formulações K-PVA, K-DSP, K-HPMC e K-PA para cada um dos reticulantes descritos anteriormente. Na Figura 35, são apresentados os resultados de eficiência de incorporação e carregamento obtidos para cada uma dessas formulações.

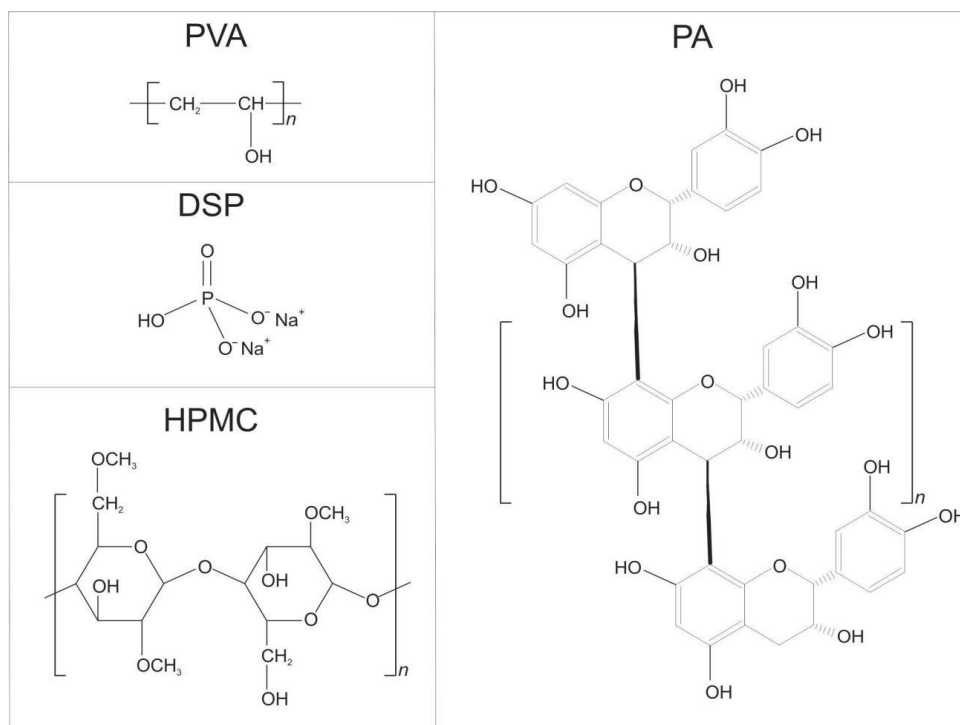
Figura 35 – Resultados de eficiência de incorporação e carregamento obtidos para as formulações utilizando agentes reticulantes, K-PVA, K-DSP, K-HPMC e K-PA.



A eficiência de incorporação apresentou resultados na faixa de $77,97 \pm 0,40\%$ a $97,39 \pm 0,49\%$, indicando uma pequena melhora em relação à faixa obtida somente com a blenda ($74,96 \pm 0,55\%$ a $91,19 \pm 0,41\%$) e o carregamento, na faixa de $29,70 \pm 0,15\%$ a $37,10 \pm 0,18\%$, indicou resultados dentro da faixa obtida anteriormente ($20,54 \pm 0,15\%$ a $40,25 \pm 0,23\%$). Aplicando-se o teste estatístico de comparação de médias de Tukey, obtém-se que tanto a eficiência de incorporação quanto o carregamento são estatisticamente similares para os pares K-PVA/K-HPMC (eficiência de $\sim 97\%$ e carregamento de $\sim 37\%$) e K-DSP/K-PA (eficiência de $\sim 80\%$ e carregamento de $\sim 30\%$), com intervalo de confiança de 95%. Como as composições são iguais em todas as formulações, observa-se um efeito do agente reticulante em contribuir, ou não, para o aumento desses parâmetros, o que pode ser explicado pelas diferenças estruturais desses compostos, apresentadas na Figura 36.

O PVA (na forma comercial, $500 < n < 5000$, equivalente à faixa de massa molar de 20.000 – 200.000) (BRADY *et al.*, 2017) e o HPMC (massa molar na faixa de 10.000 – 1.500.000) (ZAMAN *et al.*, 2016) são polímeros de cadeia extremamente longa e que, portanto, possuem um número muito elevado de sítios disponíveis para ligação com a blenda e favorecimento do aprisionamento do fármaco.

Figura 36 – Fórmulas estruturais do PVA, DSP, HPMC e PA.



Fonte: Adaptado de Brady *et al.* (2017), PubChem (2019), Tanaka *et al.* (2007).

No caso do DSP, trata-se de um sal inorgânico com estrutura química que limita a quantidade de radicais para reticulação com a blenda. A PA pode apresentar uma estrutura química mais complexa, podendo se apresentar na forma de monômeros, oligômeros ou polímeros de flavan-3-ols, nos quais se incluem as unidades monoméricas catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina. Esses monômeros podem se ligar para formar os oligômeros (2 – 8 monômeros) e os polímeros (> 8 monômeros) (ZIMMERMANN, 2005), que podem apresentar massa molar na faixa de 1500 – 5000 (CZOCHANSKA *et al.*, 1980), valor bastante inferior à dos polímeros citados anteriormente. A PA utilizada nesse trabalho foi extraída de sementes de uva da espécie *Vitis vinifera L.*, o que indica que apresenta uma característica de baixo grau de polimerização (em torno de 10) (ZHAO; PANG; DIXON, 2010). Assim, uma menor quantidade de sítios está disponível para ligação, quando comparado ao PVA e HPMC e, portanto, menor quantidade de fármaco é incorporada, refletindo diretamente nos resultados de eficiência e carregamento.

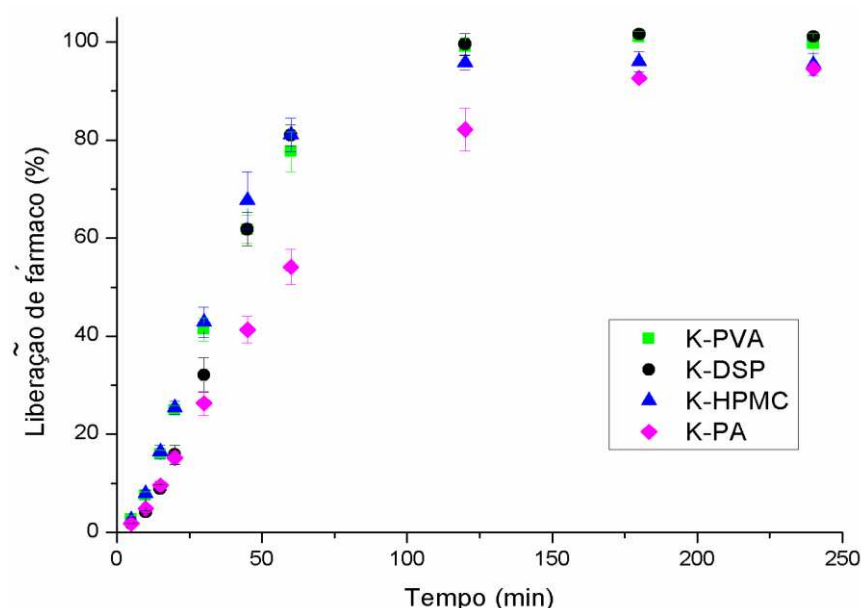
A segunda etapa experimental para determinação do melhor agente reticulante foi a dissolução *in vitro* em meio ácido durante as duas primeiras horas, seguido da etapa básica (tampão fosfato pH 6,8) até atingir o equilíbrio. Nesse caso, optou-se por realizar a etapa

ácida, pois houve uma mudança na composição da matriz polimérica. Assim, foi necessário determinar se a característica gastrorresistente observada para a blenda de sericina e alginato por Vidart *et al.* (2018) foi preservada. Na Tabela 8 são apresentadas as liberações em meio ácido e na Figura 37, apresentam-se as curvas de dissolução obtidas em meio tamponado.

Tabela 8 – Liberação em meio ácido para as formulações K-PVA, K-DSP, K-HMPC e K-PA, após 2 horas de ensaio.

Formulação	Liberação em meio ácido (%)
K-PVA	$11,55 \pm 1,45$
K-DSP	$11,89 \pm 0,34$
K-HPMC	$11,58 \pm 0,44$
K-PA	$7,82 \pm 0,82$

Figura 37 – Curvas de dissolução das formulações K-PVA, K-DSP, K-HMPC e K-PA obtidas em meio tampão (pH 6,8).



De acordo com a Farmacopeia Americana (XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018), para ser considerada forma farmacêutica de liberação retardada, a liberação em meio ácido depois de 2 h de ensaio deve ser menor que 10%. Os resultados da Tabela 8 indicam que apenas a formulação K-PA, que utilizou a PA como agente reticulante, pode ser considerada gastrorresistente. Além disso, da Figura 37 essa

formulação foi também a que apresentou o maior tempo para atingir o equilíbrio da liberação (~240 min), sendo que as demais atingiram esse equilíbrio entre 120 e 180 min.

A explicação para o comportamento da PA diante dos demais agentes reticulantes testados também está em sua fórmula estrutural. Apesar de sua cadeia ser menor que as cadeias do PVA e HPMC, seu monômero é formado por uma maior quantidade de grupos laterais hidroxila do que os monômeros desses outros polímeros. Radicais hidroxila podem se ligar fortemente através de ligações de hidrogênio e, no caso da PA, pela maior quantidade de grupos disponíveis, uma estrutura tridimensional mais forte é formada, impedindo a saída do fármaco em meio ácido e prolongando sua saída em meio básico.

4.1.5.2 Avaliação da concentração de proantocianidina em partículas de cetoprofeno reticuladas covalentemente

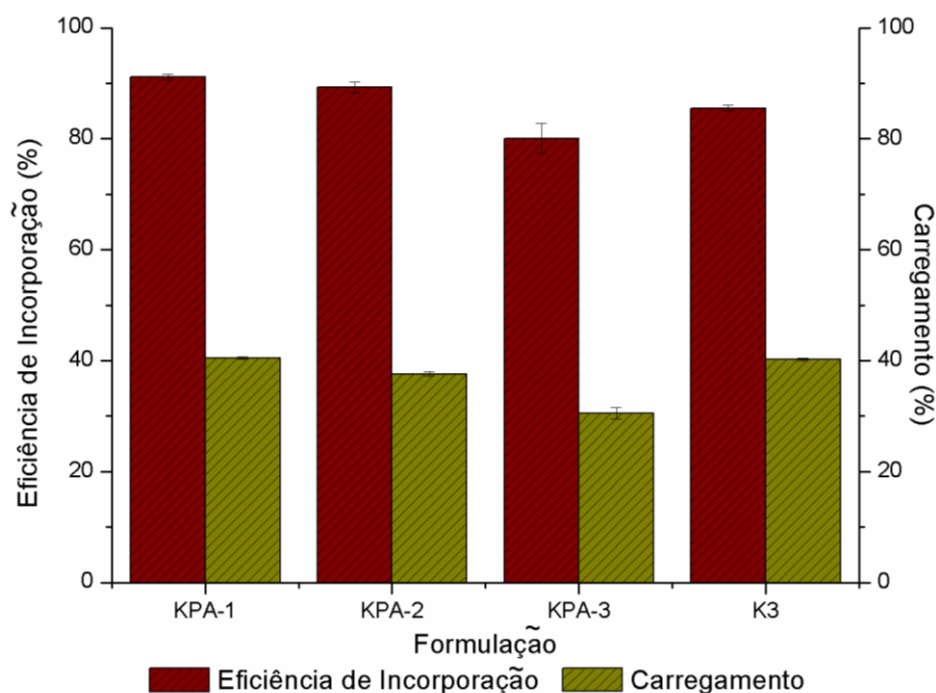
Diante dos resultados obtidos anteriormente, foi realizada uma análise da variação da quantidade de PA adicionada à formulação, a fim de obter a melhor formulação em termos de eficiência de incorporação, carregamento e liberação *in vitro*. Para isso, desenvolveram-se as formulações apresentadas na Tabela 9, com base ainda na melhor formulação do planejamento experimental, e utilizando a PA como agente reticulante. Aqui, a formulação K-PA da etapa anterior passou a ser chamada KPA-3 e foi utilizada para comparação com os resultados das demais formulações desenvolvidas.

Tabela 9 – Formulações de cetoprofeno desenvolvidas utilizando PA como agente reticulante.

Formulação	Sericina (%, m/V)	Alginato (%, m/V)	Cetoprofeno (%, m/V)	Proantocianidina (%, m/V)
KPA-1	2,5	2,0	4,0	0,5
KPA-2	2,5	2,0	4,0	1,0
KPA-3	2,5	2,0	4,0	2,0

Mais uma vez, foram obtidas a eficiência de incorporação e o carregamento das formulações, apresentados na Figura 38. Para efeitos de comparação, foram apresentados também nessa Figura os resultados da formulação K3 (sericina/alginato/cetoprofeno) obtidos no planejamento experimental.

Figura 38 – Eficiência de Incorporação e Carregamento obtidos para formulações com PA.



Observa-se na Figura 38 que as formulações com PA apresentaram eficiências de incorporação na faixa de $80,08 \pm 2,73\%$ – $91,11 \pm 0,53\%$ e carregamentos na faixa de $30,51 \pm 1,04\%$ – $40,49 \pm 0,24\%$, sendo que menores quantidades de PA adicionadas inicialmente foram responsáveis pelos maiores valores de ambos os parâmetros. A explicação para isso é que, possivelmente, atingiu-se o limite de ligações entre a blenda e a PA já com 0,5% (m/V) e, portanto, houve uma saturação da matriz com posterior redução da capacidade para aprisionar o fármaco. O aumento da concentração de PA só contribuiu para aumentar a competição entre os sítios disponíveis para ligação e impedir a entrada de íons Ca^{2+} durante o processo de gelificação iônica permitindo, assim, a saída do fármaco antes de sua completa incorporação.

De acordo com o teste estatístico de Tukey, os pares KPA-1/KPA-2 e KPA-2/K3 são estatisticamente equivalentes para o parâmetro eficiência de incorporação. A formulação KPA-3, que apresentou o pior resultado, é também a única estatisticamente diferente das demais. Em relação ao carregamento, as formulações contendo PA apresentam, todas, resultados estatisticamente diferentes. Apenas o par KPA-1/K3 é considerado similar, com 95% de confiança. Assim, analisando o efeito da PA em relação aos resultados obtidos anteriormente para a formulação K3, vê-se que a eficiência de incorporação aumentou pela adição desse reagente, sem influência sobre o carregamento. Isso ocorreu porque a reticulação covalente fornece maior estabilidade estrutural às

partículas em função das ligações mais fortes e estáveis (WANG *et al.*, 2014). Além disso, a adição da PA contribuiu para o aumento da viscosidade da solução, bloqueando os poros das partículas e, conseqüentemente, prevenindo a saída de fármaco antes de sua completa incorporação. Resultado semelhante foi observado por Narra *et al.* (2012), que avaliaram a adição de PVA e PVP (Polivinilpirrolidona) à matriz de alginato para incorporação do antibiótico rifampicina. O PVA e PVP contribuíram para aumentar a eficiência de incorporação e o carregamento de fármaco naquela matriz.

4.1.6 Ensaios de liberação *in vitro* das partículas de cetoprofeno reticuladas com proantocianidina

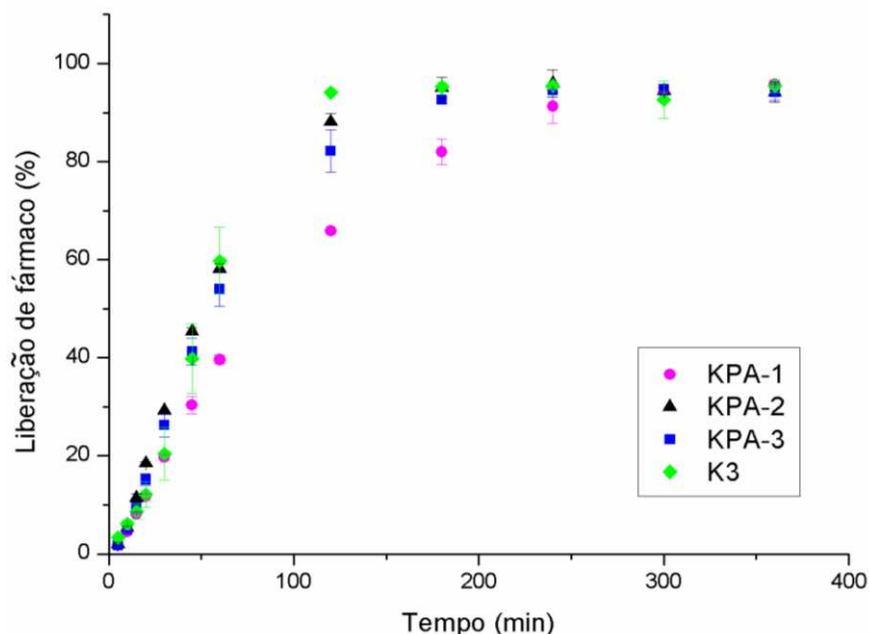
Assim como no caso da avaliação de agentes reticulantes, as partículas com PA também foram submetidas às etapas ácida e básica subsequentes para avaliação da dissolução *in vitro*. A Tabela 10 mostra as porcentagens de liberação obtidas para cada uma das formulações na etapa ácida.

Tabela 10 – Liberação de fármaco em meio ácido das formulações KPA-1, KPA-2, KPA-3.

Formulação	Liberação em meio ácido (%)
KPA-1	7,38 ± 0,25
KPA-2	7,47 ± 0,18
KPA-3	7,82 ± 0,82

Assim como já havia sido observado anteriormente, formulações com liberação em meio ácido abaixo de 10% se referem a formas farmacêuticas de liberação retardada. Portanto, todas as formulações com PA, independente da concentração, apresentaram característica gastrorresistente, em função da força das ligações entre a PA e a blenda de sericina e alginato. Na Figura 39 são apresentadas as curvas de dissolução em meio tamponado (pH 6,8) das formulações com PA e da formulação K3, para efeitos de comparação. As partículas compostas pela blenda, o fármaco e a PA foram as que mantiveram suas características iniciais mais íntegras ao final da dissolução. Era possível apenas visualizar o inchamento da matriz pelo contato com a solução aquosa, porém elas ainda se mantinham bem definidas e distintas umas das outras.

Figura 39 – Curvas de dissolução *in vitro* das formulações KPA-1, KPA-2, KPA-3 e K3, obtidos em meio tampão pH 6,8.



Pode-se observar da Figura 39 que as formulações KPA-2 e KPA-3 atingiram o equilíbrio em 240 min, enquanto a formulação KPA-1 atingiu o equilíbrio em 360 min. A adição da PA foi fundamental para prolongar a liberação do cetoprofeno, já que a formulação K3 havia atingido o equilíbrio da liberação em apenas 180 min. Isso pode ser explicado pelo efeito da PA em bloquear os poros das partículas, atrasando a saída do fármaco. Além disso, compostos fenólicos possuem valores de pKa próximos a 8,0 (MUZOLF-PANEK *et al.*, 2012) e, diferente da sericina e do alginato, no pH da solução tampão usada no ensaio de dissolução (pH 6,8) esses compostos se encontram na forma não ionizada, formando ligações mais fortes e estando menos suscetíveis à ocorrência do intumescimento da matriz para liberação do fármaco (VERZA; PAVEI; ORTEGA, 2008).

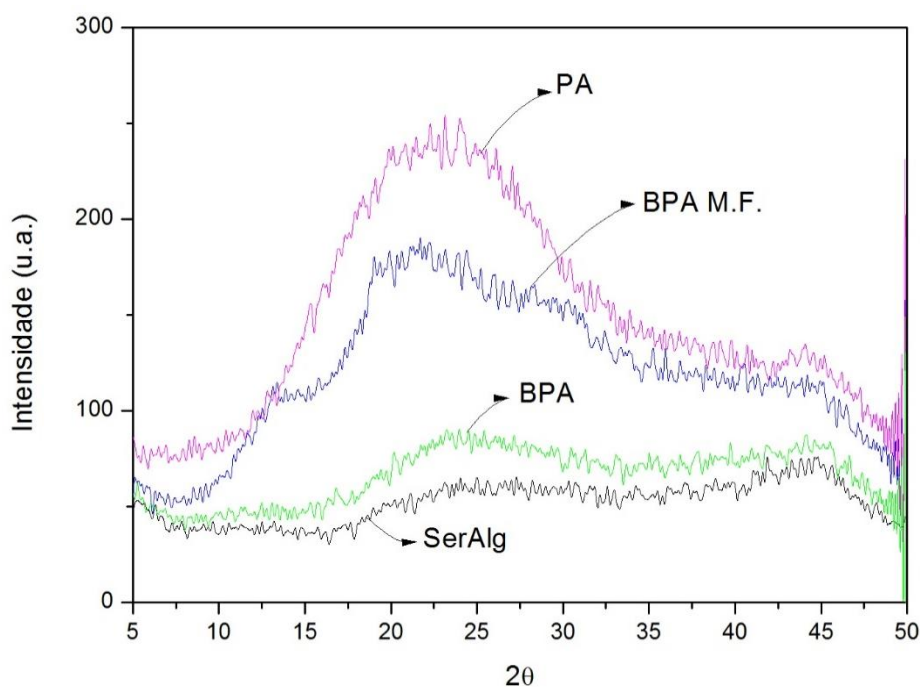
Mais uma vez a quantidade de PA adicionada afetou o resultado, com a liberação *in vitro* sendo mais prolongada para a formulação com a menor quantidade de PA (KPA-1). Possivelmente o excesso de PA nas demais formulações tornou suas ligações mais frágeis em função da maior competição pelos sítios de ligação, fazendo com que o fármaco fosse liberado mais rapidamente do que no caso com menos PA.

4.1.7 Caracterização das partículas de cetoprofeno reticuladas com proantocianidina

4.1.7.1 Cristalinidade

Assim como no caso da blenda de sericina e alginato, realizou-se a análise de difração de Raios X sobre a blenda reticulada com PA e sobre a mistura física dos componentes da partícula, além da própria PA. Os perfis obtidos estão expostos na Figura 40. Para fins de comparação, também foi apresentado o perfil de SerAlg já apresentado anteriormente (Figura 25).

Figura 40 – Difratomogramas obtidos por DRX da PA, da blenda de sericina e alginato (SerAlg), da blenda reticulada com PA (BPA) e da mistura física dos componentes da blenda (BPA M.F.).

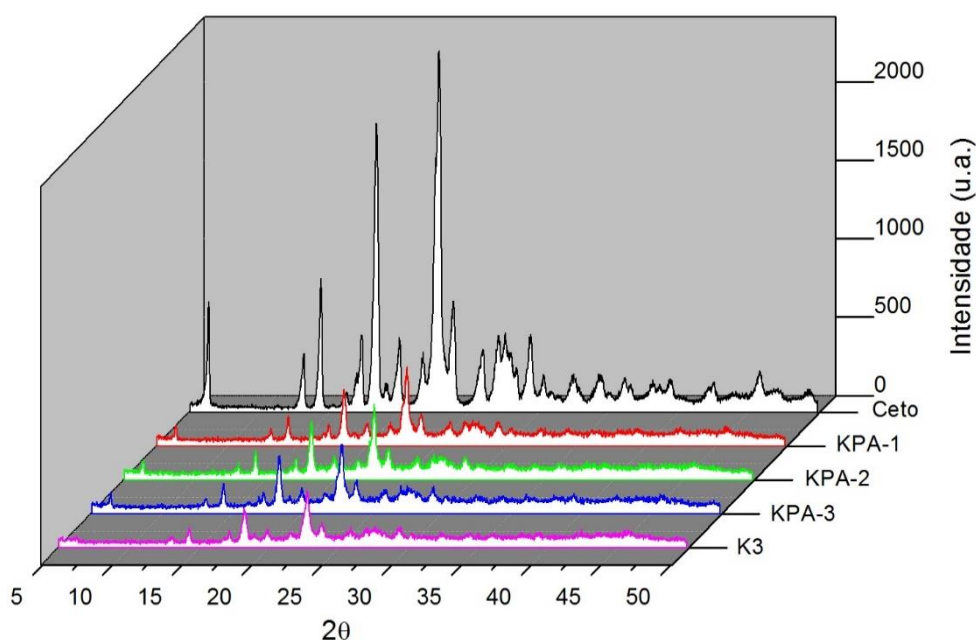


A PA geralmente se apresenta na forma de um pó amorfo (XIE; DIXON, 2005), apesar de ter apresentado alguns picos cristalinos em 22,5 e 45°, de acordo com os resultados da Figura 40. O difratograma da mistura física dos componentes da blenda (sericina/alginato/PA – BPA M.F.) também apresenta característica amorfa, porém com alguns picos cristalinos similares aos observados para seus componentes puros (13, 20 e 45°), enquanto o difratograma da blenda reticulada com PA (BPA) permanece com característica amorfa, porém com picos cristalinos em 12, 25 e 45°. No caso da SerAlg também se observam os picos em 25 e 45°, indicando que eles não ocorrem pela presença

de PA. Assim, pode-se afirmar que os picos cristalinos dos componentes da blenda desapareceram em função da forte interação entre eles, com o empacotamento das moléculas sendo substituídos por cristalitos novos ou regulares, evidenciando a compatibilidade entre os polímeros na blenda. Além disso, houve uma redução na intensidade dos picos após a formação da blenda, o que está associado à redução do grau de cristalinidade decorrente da reticulação entre sericina, alginato e PA (SARKER *et al.*, 2014).

Na Figura 41 é possível comparar os difratogramas do fármaco puro (Ceto), das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3 e da formulação K3, obtida do planejamento experimental.

Figura 41 – Difratogramas obtidos por DRX do fármaco puro (Ceto), das formulações com PA (KPA-1, KPA-2 e KPA-3) e da formulação K3.



Assim como já havia sido observado anteriormente, o cetoprofeno apresenta característica cristalina com picos bem definidos ($2\theta = 6,35^\circ, 13,13^\circ, 14,38^\circ, 17,31^\circ, 18,37^\circ, 20,07^\circ, 22,86^\circ$ e $23,88^\circ$) (SALMAN *et al.*, 2015). Analisando os difratogramas das formulações com PA, é possível notar que apresentam grande semelhança entre elas, com os picos cristalinos do cetoprofeno ainda sendo detectados, porém com alguma característica amorfa. Isso significa que, apesar de parte da estrutura do fármaco ter se mantido intacta, outra parte pode ter se diluído na matriz polimérica (MATHEW *et al.*,

2009). Ao comparar tais perfis com o da formulação K3, observa-se que sem a adição da PA a intensidade dos picos aparenta ter sido mais afetada. Quando houve a adição da PA, os picos se mostraram mais intensos, demonstrando menores mudanças estruturais do fármaco e, portanto, sua compatibilidade com a matriz em questão. Sendo assim, além de aprimorar características de incorporação e dissolução, a PA também demonstrou preservar melhor a estrutura do fármaco incorporado, com menor redução do grau de cristalinidade.

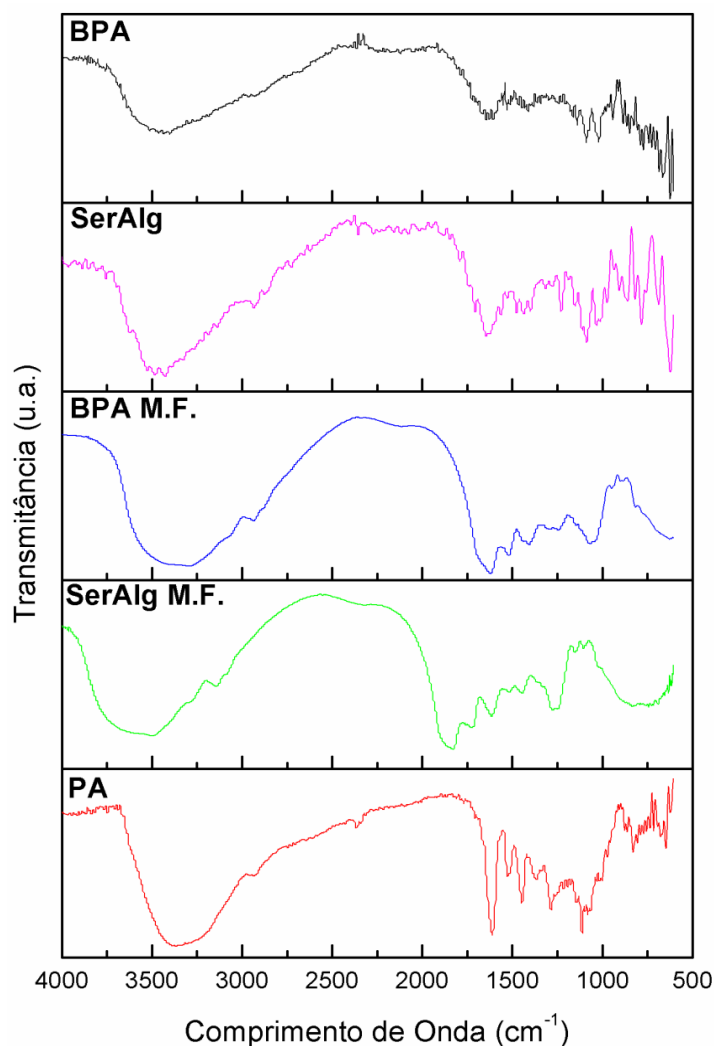
4.1.7.2 Grupos funcionais

Assim como no caso da análise de DRX, o FT-IR também foi realizado sobre a PA, a blenda reticulada com PA (BPA) e a mistura física dos componentes dessa blenda (BPA M.F.). Na Figura 42 são apresentados os espectros obtidos, além do obtido para a blenda (SerAlg) e para a mistura física (SerAlg M.F.) sem agente reticulante, para comparação.

No espectro da PA, uma ampla banda é observada em 3350 cm^{-1} devido ao estiramento de estruturas fenólicas e formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas fenólicas. Em 1610 , 1520 , 1450 e 1280 cm^{-1} observam-se as bandas referentes ao estiramento do anel aromático. Na faixa de $1610 - 1105\text{ cm}^{-1}$ as múltiplas bandas se referem aos grupos funcionais de poli flavonoides em PAs. A faixa entre $780 - 730\text{ cm}^{-1}$, indicativa de bandas da deformação CH fora do plano dos anéis aromáticos, permite determinar a estrutura monomérica predominante. No caso da Figura 42, bandas com intensidades semelhantes são observadas em 771 cm^{-1} e em 735 cm^{-1} , as quais são características de estruturas formadas por (epi)catequinas e (epi)galocatequinas, respectivamente, indicando que a PA do presente trabalho é formada por proporções semelhantes de cada um desses monômeros (FU *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2012).

Analisando-se os espectros das misturas físicas dos componentes das blendas (M.F. na Figura), observa-se que houve um deslocamento da banda referente às hidroxilas (3540 cm^{-1} em SerAlg M.F. para 3350 cm^{-1} em BPA M.F.), em função da presença da PA e suas estruturas fenólicas. Estas se sobrepõem às bandas referentes às amidas A e B da sericina e aos grupos hidroxila de polissacarídeos, no caso o alginato. As múltiplas bandas da PA na região abaixo de 1610 cm^{-1} não aparecem em BPA M.F., possivelmente pela baixa concentração desse componente em relação à sericina e alginato.

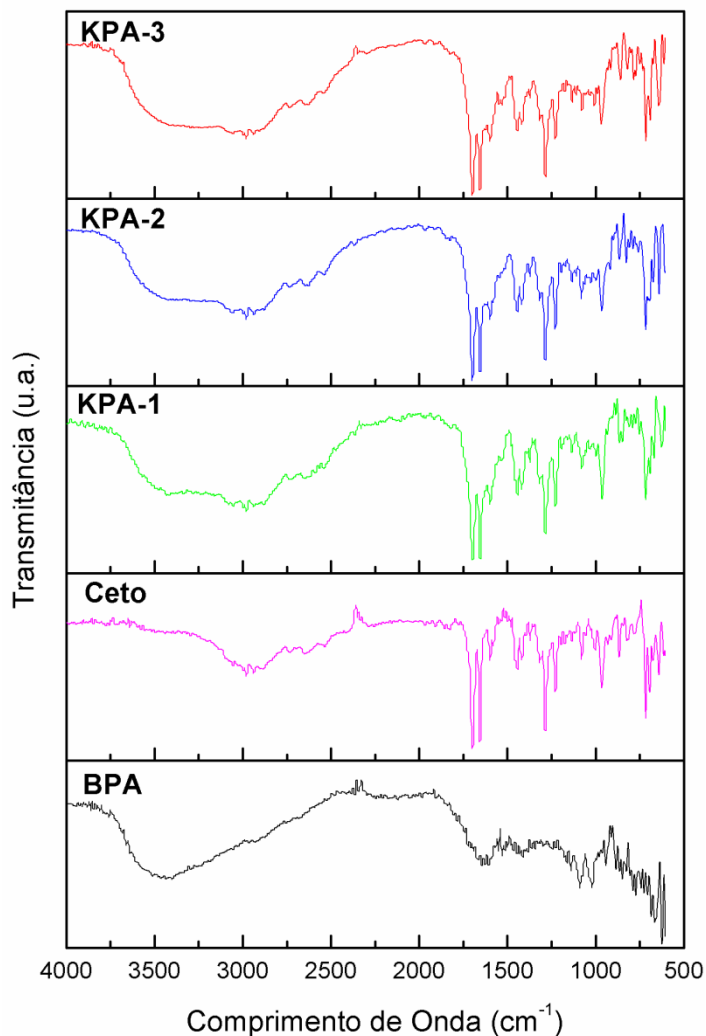
Figura 42 – Espectros obtidos por FT-IR para a PA, a mistura física de sericina/alginato/PA (BPA M.F.), a blenda de sericina e alginato reticulada com PA (BPA) e a blenda de sericina e alginato (SerAlg).



Comparando-se então os espectros da blenda, observa-se que a banda ampla na faixa entre 3000 – 3600 cm⁻¹ tem seu máximo em 3440 cm⁻¹ para ambas as partículas, SerAlg e BPA, indicando que a reticulação e formação da blenda ocorre através de alguns dos grupos hidroxila e amidas A e B presentes. Múltiplas bandas ocorrem em SerAlg na faixa de 620 – 1650 cm⁻¹, mas sua quantidade é reduzida em BPA, indicando que grupos funcionais referentes a essa faixa podem ter sido reticulados pela PA. Dentre eles, estão os grupos amida I, II e III da sericina e as carboxilas do alginato.

Na Figura 43 são apresentados os espectros de FT-IR obtidos das formulações contendo PA (KPA-1, KPA-2 e KPA-3) para comparação com a formulação sem fármaco (BPA) e o fármaco puro (Ceto).

Figura 43 – Espectros obtidos por FT-IR para a blenda reticulada com PA (BPA), para o fármaco puro (Ceto) e para as formulações com PA (KPA-1, KPA-2 e KPA-3).

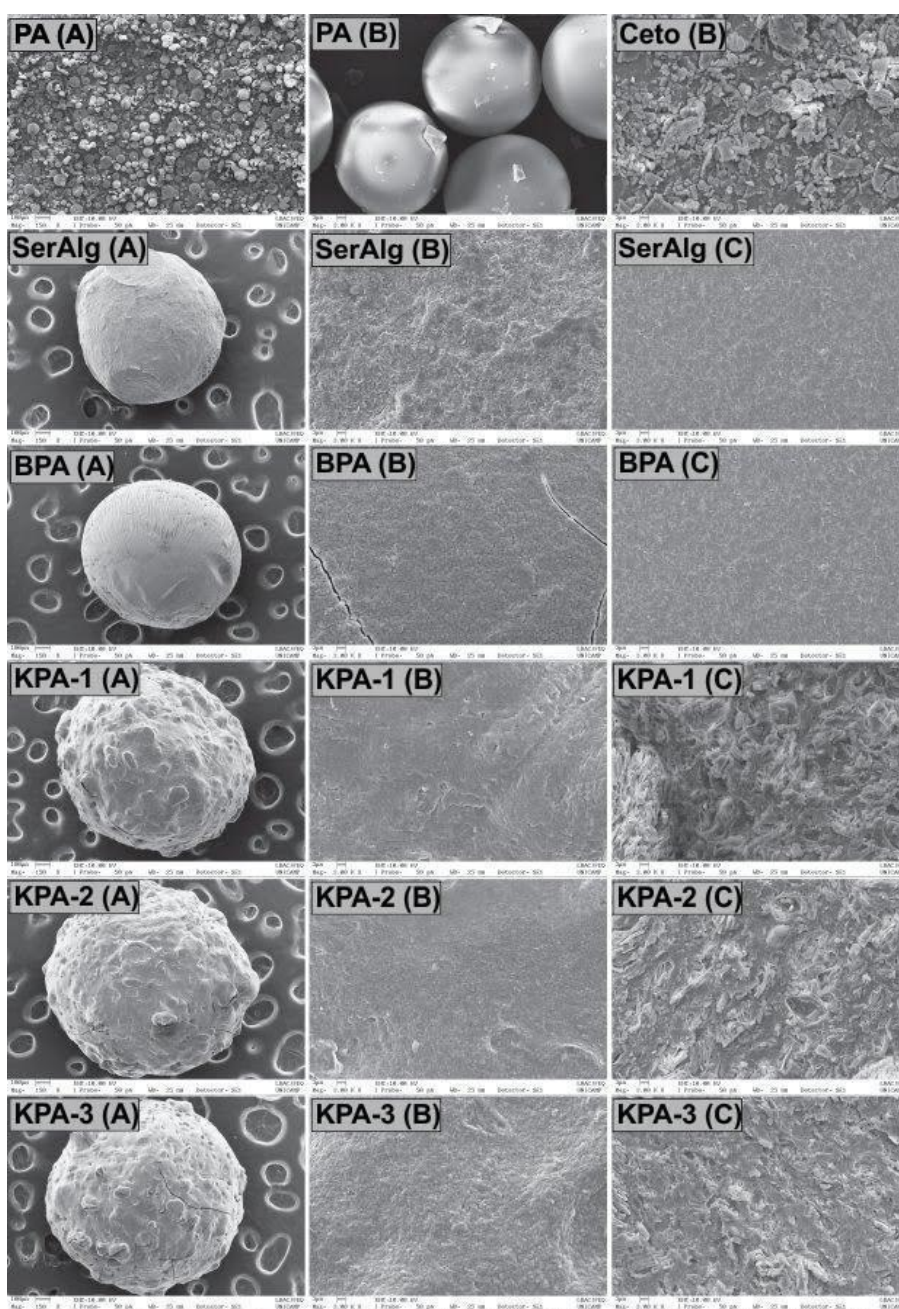


No espectro do cetoprofeno, algumas bandas características podem ser observadas em 3000 cm⁻¹, pelas vibrações C = C do anel aromático, em 1650 cm⁻¹ relacionada às vibrações C = O da cetona e em 1700 cm⁻¹ pelas vibrações C = O da carboxila (AL-TAHAMI, 2014). Analisando-se os espectros das formulações KPA-1, KPA-2, KPA-3, estes apresentaram bastante semelhança entre eles e também com o fármaco puro. A exceção está na banda em 3500 cm⁻¹, que estava presente na blenda (BPA) e também se destacou nas formulações. Assim, pode-se concluir que não houve forte interação entre o cetoprofeno e a matriz polimérica em que ele foi incorporado, confirmando a compatibilidade existente entre eles, mesmo após a adição da PA. O fármaco manteve sua estrutura original, conforme já havia sido observado na análise de DRX.

4.1.7.3 Análise morfológica

As micrografias obtidas por MEV da PA, da blenda reticulada com PA (BPA) e das formulações desenvolvidas (KPA-1, KPA-2 e KPA-3) são apresentadas na Figura 44, assim como aquelas já apresentadas na Figura 29 (SerAlg e Ceto) para comparação.

Figura 44 – Micrografias obtidas da proantocianidina (PA), do cetoprofeno puro (Ceto), da blenda de sericina e alginato (SerAlg), da blenda reticulada com PA (BPA) e das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3, nas ampliações de (A) 150x, (B) e (C) 3000x. As micrografias (A) e (B) foram obtidas da superfície externa das partículas e as micrografias (C) a partir do corte da seção transversal das partículas.



A partir das micrografias da PA, SerAlg e BPA é possível avaliar o efeito da adição do agente reticulante à blenda de sericina e alginato. Em ampliação de 150x (identificados por 'A' na Figura 44), pouca diferença é observada em relação ao tamanho de SerAlg e BPA, porém, na maior ampliação, de 3000x (identificados por 'B' na Figura 44), observa-se uma redução na rugosidade da superfície da partícula após a adição de PA, possivelmente devido à reticulação covalente. Internamente, (identificado por 'C' na Figura 44) ambas as partículas apresentam morfologia semelhante, com superfície lisa e homogênea. Comparando essas partículas com as micrografias da PA, não é possível visualizar esse composto em sua forma integral nem na superfície nem em seu interior, o que indica que ele se diluiu perfeitamente na blenda, confirmando a reticulação observada na análise de FT-IR.

As formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3 também tiveram micrografias obtidas com ampliação da superfície externa de 150x (A) e 3000x (B). Observa-se que a adição do fármaco contribuiu para o aumento das partículas em relação à BPA, além de aumentar a rugosidade dessas partículas. Na ampliação de 3000x não se observa a presença do fármaco na superfície externa, o que pode indicar que ele foi incorporado em seu interior. Comparando as três formulações obtidas, nota-se um aumento da rugosidade em função do aumento da quantidade de PA adicionada, o que pode ter contribuído para reter o fármaco de forma mais fraca contribuindo para sua liberação em um menor tempo. Em relação às micrografias da formulação K3 (Figura 29), diferente das formulações com PA, haviam sido observadas algumas fissuras na ampliação de 3000x, o que pode ter contribuído para a liberação mais rápida.

No interior das partículas com ampliação de 3000x (C) é possível confirmar que o fármaco está interno a elas, principalmente quando comparado à micrografia do fármaco puro (Ceto). Comparando com a formulação K3, naquele caso o fármaco aparentava estar em sua forma mais natural, sendo que nas formulações com PA ele aparenta estar mais fortemente ligado à matriz polimérica, o que pode ter contribuído para prolongar sua liberação. Dentre as formulações, a KPA-1 é a que aparenta ter a maior quantidade de fármaco, seguida de KPA-2 e por último de KPA-3. Assim, a superfície menos rugosa de KPA-1, associada à maior quantidade de fármaco observada em seu interior, corrobora com seu maior tempo de liberação, estando o fármaco incorporado de forma mais eficiente.

4.1.7.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanhos

A distribuição de tamanhos para as formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3 está apresentada na Figura 45. Os diâmetros médios obtidos para cada uma dessas formulações e os valores de R^2_{aj} obtidos do ajuste de Gauss à frequência relativa da distribuição são apresentados na Tabela 11. Também foram apresentados os dados referentes à formulação K3.

Figura 45 – Distribuição de tamanhos para as formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.

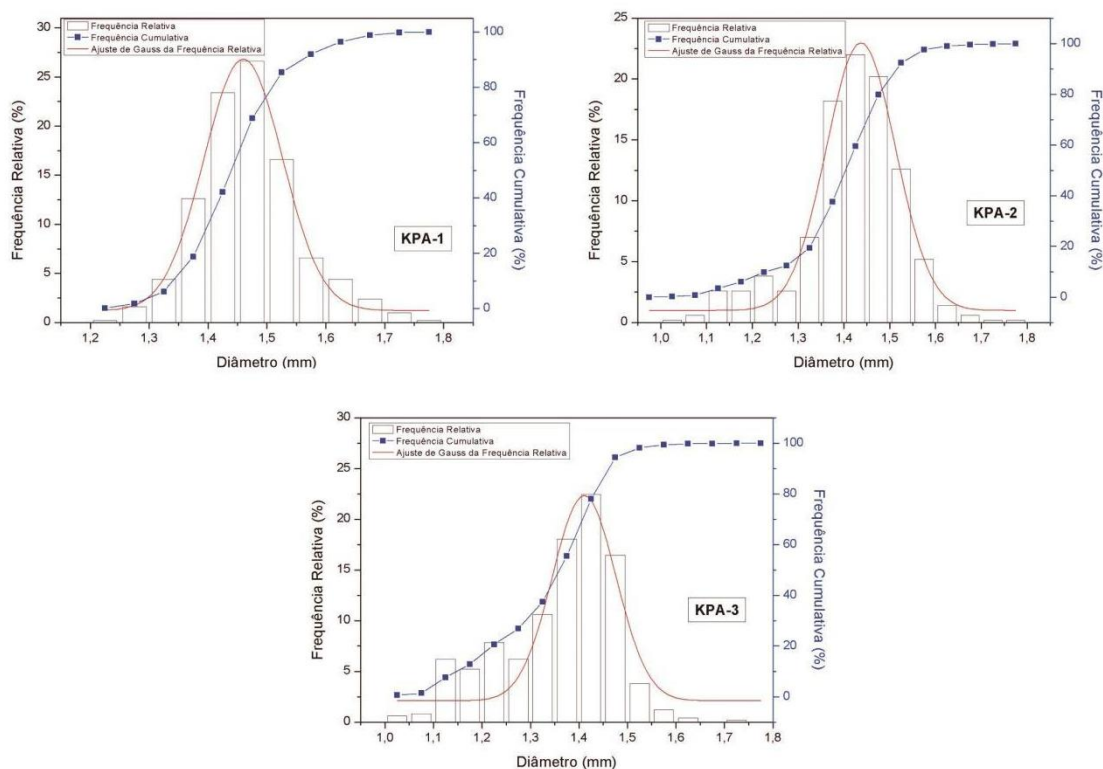


Tabela 11 - Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3 e para a formulação K3.

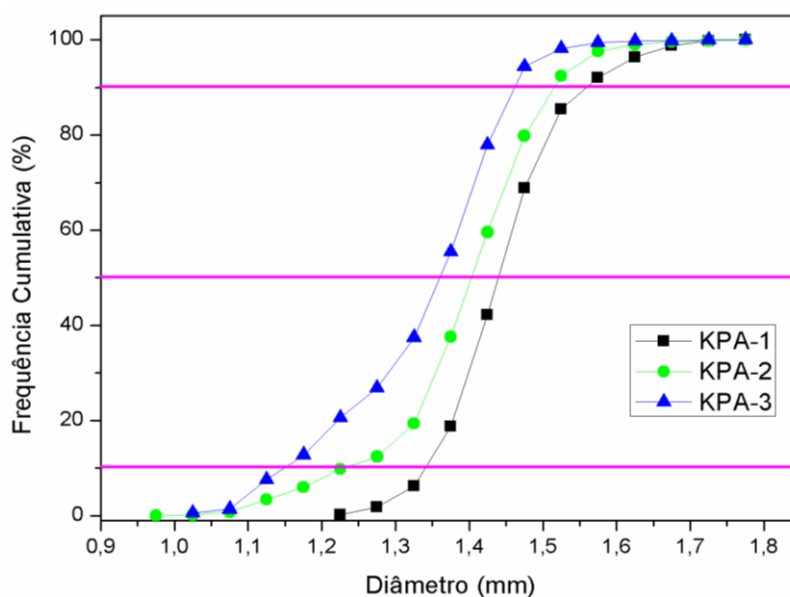
Formulação	Diâmetro Médio (mm)	R^2_{aj}
KPA-1	$1,47 \pm 0,09$	0,989
KPA-2	$1,42 \pm 0,11$	0,974
KPA-3	$1,36 \pm 0,12$	0,847
K3	$1,04 \pm 0,11$	0,907

As partículas reticuladas com PA apresentaram diâmetros na faixa de $1,36 \pm 0,12$ – $1,47 \pm 0,09$ mm, valor maior do que aqueles obtidos sem a PA, o que já era esperado pelo aumento da quantidade de componentes nas partículas. Estatisticamente, de acordo com o

teste de Tukey, as formulações com agente reticulante apresentaram diâmetros médios equivalentes, com 95% de confiança, enquanto a formulação K3, com o menor diâmetro na Tabela 11, é estatisticamente diferente de todas as outras. Sendo assim, nota-se uma relação direta entre o tamanho da partícula e a dissolução do fármaco. Partículas maiores conseguiram aprisionar o fármaco de forma mais eficiente, prolongando sua liberação. Chu *et al.* (2012) avaliaram a influência do tamanho das partículas de fármacos (ibuprofeno, aceclofenaco e hidroclorotiazida) sobre sua dissolução e obtiveram que partículas menores contribuem para uma dissolução mais rápida, corroborando com o resultado encontrado no presente trabalho.

Os valores de R^2_{aj} dos ajustes de Gauss da frequência relativa indicam que os melhores ajustes foram obtidos para as formulações KPA-1 e KPA-2, indicando que a formulação com os melhores resultados de incorporação e liberação, é também aquela que apresenta maior homogeneidade de tamanhos. Foram obtidos os valores de *Span* da distribuição (Eq. 16), a partir dos perfis da frequência cumulativa apresentados na Figura 46, a fim de avaliar o quão distante os valores de D10 e D90 estão, normalizados pelo ponto D50. Mais uma vez, as linhas em rosa destacam as bases para determinação de D10, D50 e D90.

Figura 46 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.



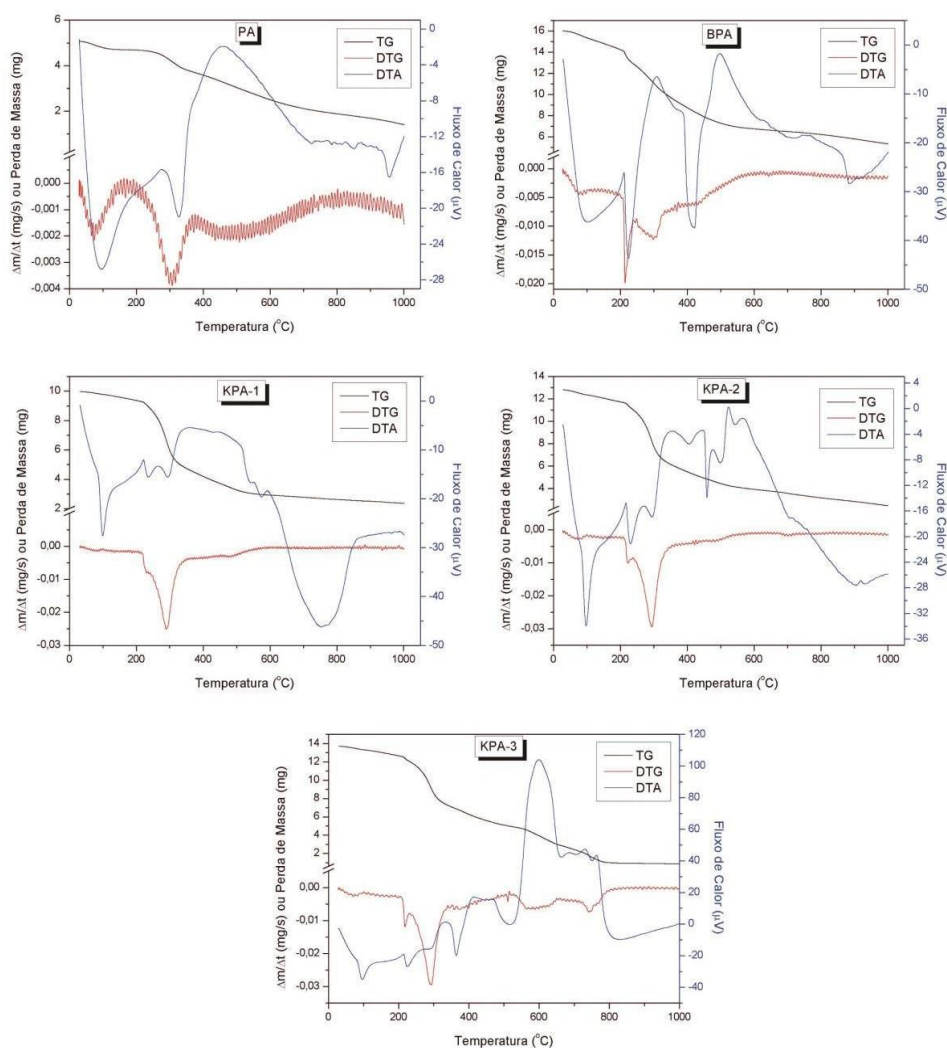
As formulações com agentes reticulantes KPA-1, KPA-2 e KPA-3 apresentaram os seguintes valores de *Span*: 0,148, 0,214 e 0,235, respectivamente. Observa-se que a maior

homogeneidade da distribuição de tamanhos obtida pelo ajuste de Gauss, se confirma com o valor do *Span*, com a formulação KPA-1 obtendo o menor valor para esse parâmetro, indicando a menor distância relativa entre D10 e D90. Novamente a viscosidade influenciou no resultado. As formulações com maiores quantidades de PA se tornaram mais viscosas, contribuindo para a coalescência das partículas e a maior distribuição de tamanhos.

4.1.7.5 Análises térmicas

As análises de TG/DTG e DTA das formulações reticuladas com PA, da PA pura e da blenda de sericina e alginato reticulada com PA (BPA) geraram as curvas apresentadas na Figura 47.

Figura 47 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a PA, blenda de sericina e alginato reticulada com PA (BPA) e formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3.



Pode-se observar na curva de TG/DTG da PA uma perda de massa próxima a 75 °C, possivelmente relacionada à perda de água, e próxima a 300 °C está relacionada à degradação do material. Na curva de DTA, se destaca um pico endotérmico em 100 °C, relacionada à evaporação, mas podendo estar relacionada também à transição vítrea da PA por sua característica amorfa, enquanto na região a 300 °C, o pico endotérmico se relaciona à decomposição do material. No caso da BPA, ao compará-lo com o perfil obtido para SerAlg (Figura 32), observa-se bastante semelhança, especialmente até a temperatura de 500 °C. São observadas pequenas perdas de massa relacionadas à evaporação (~ 80 °C) e à degradação (~ 215 °C) ou decomposição (300 °C) dos componentes da partícula (sericina, alginato e PA). E esses fenômenos estão diretamente relacionados a alguns dos eventos endotérmicos da curva de DTA. A 100 °C há um evento mais acentuado em BPA do que em SerAlg, em função da fusão da PA. A este se seguem dois eventos (~ 220 e 420 °C), associados à degradação de sericina, alginato e PA.

Observando as curvas das formulações KPA-1, KPA-2 e KPA-3, as duas primeiras são bastante semelhantes entre si, enquanto a KPA-3 se assemelha mais aos perfis obtidos para as formulações sem agente reticulante (Figura 32). As perdas de massa mais significativas para todas as formulações ocorrem entre 200 e 350 °C, em função da degradação/decomposição do fármaco, da PA e da blenda de sericina/alginato. As curvas de DTA apresentam os picos endotérmicos de fusão do fármaco e da PA (~ 100 °C) e de degradação dos componentes das formulações (~ 230 e 290 °C). No caso específico da KPA-3, outras perdas de massa estão associadas a eventos exotérmicos acima de 600 °C, sendo relacionados à decomposição do material que compõem a blenda e formação de subprodutos, semelhante ao observado para SerAlg e as formulações sem PA. Possivelmente a maior quantidade de PA não foi capaz de reticular de forma efetiva a blenda de sericina e alginato, atuando apenas como componente da blenda, sem alterar sua estrutura de ligações. Assim, a sericina sofreu recristalização e houve a decomposição do material carbonizado derivado do alginato. Isso pôde ser observado também na morfologia da superfície das partículas da Figura 46, em que aquela com mais PA é mais semelhante às que não tem o agente reticulante.

4.1.8 Análise geral da produção de partículas de cetoprofeno incorporado à blenda de sericina e alginato e reticuladas por proantocianidina

A produção de partículas utilizando como matriz proteica a sericina e o alginato para incorporação de cetoprofeno atingiu parte dos objetivos pretendidos. No entanto,

verificou-se a possibilidade de utilizar um agente reticulante covalente para aprimorar os resultados obtidos. Assim, diferentes reagentes foram utilizados e, a partir disso, determinou-se a proantocianidina como a melhor opção. Ela é um metabólito natural, extraída de sementes de uvas e que tem apresentado bons resultados ao ser utilizada como agente reticulante covalente.

No presente trabalho, a PA demonstrou compatibilidade tanto com a blenda de sericina e alginato, quanto com o fármaco cetoprofeno. Além disso, na concentração adequada, permitiu a obtenção de formulações com característica de liberação retardada e sustentada, possibilitando melhor eficácia terapêutica. As partículas foram caracterizadas e demonstraram a efetiva incorporação do fármaco em sua forma natural, sem sofrer qualquer tipo de mudança estrutural. A melhor formulação obtida foi a KPA-1 (2,5% (m/V) de sericina, 2,0% (m/V) de alginato, 4,0% (m/V) de cetoprofeno e 0,5% (m/V) de PA).

4.1.9 Avaliação dos mecanismos de liberação do cetoprofeno: modelagem cinética

4.1.9.1 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de cetoprofeno.

Os modelos apresentados na Seção 2.3 – Farmacocinética foram ajustados aos dados das curvas de dissolução das formulações K1 – K7 e aos dados das formulações produzidas com KPA-1 - KPA-3. Os parâmetros obtidos e os coeficientes R^2_{aj} e AIC, utilizados para comparação das curvas, são apresentados na Tabela 12 e na Tabela 13, respectivamente, com destaque em negrito para os maiores R^2_{aj} e os menores AIC, indicando o melhor ajuste.

Tabela 12 – Parâmetros obtidos a partir da modelagem cinética, R^2_{aj} e AIC para as formulações K1 – K7.

Modelo	Parâmetro	Formulações						
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
Ordem-zero	K_0	0,888	0,883	0,818	0,804	0,648	0,620	0,871
	R^2_{aj}	0,865	0,877	0,945	0,928	0,789	0,901	0,901
	AIC	53,15	52,24	44,08	46,09	67,83	59,19	50,08
Primeira-ordem	K_1	0,015	0,014	0,013	0,012	0,014	0,011	0,014
	R^2_{aj}	0,750	0,679	0,742	0,688	0,896	0,806	0,756
	AIC	54,63	57,00	53,89	55,65	56,06	61,46	54,11
Weibull	a	1631,06	3960,79	1473,91	2641,21	423,63	1614,47	1310,41
	b	1,849	2,063	1,747	1,883	1,455	1,702	1,770
	T_d	54,63	57,00	53,89	55,65	56,06	61,46	54,11
	R^2_{aj}	0,992	0,998	0,993	0,998	0,987	0,998	0,996
	AIC	30,84	19,77	28,84	18,92	41,05	24,47	24,99
Higuchi	K_H	7,22	7,06	6,52	6,32	6,87	6,32	7,03
	R^2_{aj}	0,408	0,342	0,362	0,306	0,644	0,503	0,400
	AIC	61,98	63,67	61,74	63,10	66,81	70,24	61,85
Korsmeyer-Peppas	K_{KP}	1,531	1,111	0,870	0,663	2,724	1,206	1,298
	n	1,478	1,609	1,419	1,534	1,338	1,267	1,438
	R^2_{aj}	0,848	0,853	0,935	0,922	0,841	0,900	0,888
	AIC	53,74	53,99	46,05	47,82	62,54	58,87	51,10
Hopfenberg; m = 2	k_2	0,0062	0,0060	0,0053	0,0051	0,0056	0,0045	0,0059
	R^2_{aj}	0,885	0,840	0,893	0,848	0,954	0,934	0,898
	AIC	49,52	52,28	47,75	50,59	50,65	53,16	48,24
Hopfenberg; m = 3	k_3	0,0044	0,0042	0,0038	0,0036	0,0040	0,0033	0,0042
	R^2_{aj}	0,849	0,792	0,848	0,798	0,945	0,900	0,858
	AIC	51,26	54,00	50,17	52,55	51,53	56,29	50,39

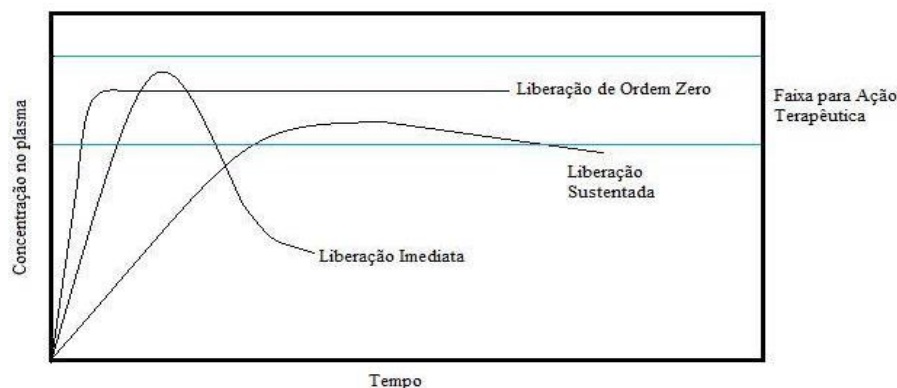
Tabela 13 – Parâmetros obtidos da modelagem cinética para as formulações com PA.

Modelo	Parâmetro	Formulações		
		KPA-1	KPA-2	KPA-3
Ordem-zero	K_0	0,338	0,642	0,498
	R^2_{aj}	0,781	0,805	0,758
	AIC	96,58	66,83	79,13
Primeira-ordem	K_1	0,009	0,013	0,012
	R^2_{aj}	0,986	0,935	0,956
	AIC	56,77	51,52	55,93
Weibull	a	227,37	271,65	246,85
	b	1,149	1,332	1,268
	T_d	112,49	67,19	77,05
	R^2_{aj}	0,998	0,996	0,992
	AIC	35,98	28,61	41,66
Higuchi	K_H	5,34	6,81	6,31
	R^2_{aj}	0,847	0,690	0,758
	AIC	84,33	64,92	72,17
Korsmeyer-Peppas	K_{KP}	0,839	0,708	0,660
	n	0,921	1,076	1,064
	R^2_{aj}	0,968	0,972	0,966
	AIC	32,82	28,13	35,34
Hopfenberg; m = 2	k_2	0,0033	0,0055	0,0049
	R^2_{aj}	0,989	0,978	0,979
	AIC	56,75	43,64	50,52
Hopfenberg; m = 3	k_3	0,0024	0,0039	0,0034
	R^2_{aj}	0,992	0,974	0,976
	AIC	51,39	44,58	51,14

4.1.9.2 Análise dos resultados de ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de cetoprofeno

Os modelos de ordem zero e primeira ordem costumam ser usados para obter informações sobre a cinética da dissolução, enquanto os demais modelos apresentados na Tabela 12 e na Tabela 13 fornecem detalhes sobre os mecanismos envolvidos nessa dissolução (CHIME; ONUNKWO; ONYISHI, 2013). Comparando os dois primeiros modelos, as formulações obtidas no planejamento experimental (K1 – K7) aparentam seguir uma cinética de ordem zero para liberação do fármaco, comumente associada a sistemas de liberação controlada e perfil de concentração no plasma constante, similar ao apresentado na Figura 48.

Figura 48 – Perfis de concentração no plasma para formas de liberação sustentada, comparadas às formas de liberação de ordem zero e de liberação imediata.



Fonte: Adaptado de Jabeen *et al.* (2017).

Já as formulações com PA se aproximam mais da cinética de primeira ordem, a qual, apesar de estar associada a formas de liberação em que o fármaco está pronto para ser dissolvido, demonstra bons ajustes a formas de liberação sustentada, responsáveis por perfis de concentração no plasma como o apresentado na Figura 48 (ROBINSON; ERIKSEN, 1966). Assim, era de se esperar que apresentasse um bom ajuste aos dados de liberação das formulações contendo PA. Nesse caso, a taxa de liberação é diretamente proporcional à quantidade de fármaco restante na forma farmacêutica (MURTAZA *et al.*, 2015).

Em relação aos demais modelos, pode-se observar que, em geral, os melhores ajustes foram obtidos para o modelo empírico de Weibull e para o de Korsmeyer-Peppas, independente da formulação. Devido ao seu caráter empírico, o modelo de Weibull não apresenta qualquer fundamento cinético, mas fornece informações sobre a curva de dissolução em termos de parâmetros aplicáveis e é bastante usado para comparar perfis de liberação a partir de sistemas matriciais (RAMTEKE, 2014). Para os resultados apresentados, todas as formulações apresentaram valores de $b > 1,0$, o que caracteriza curvas sigmoidais. A partir dos parâmetros a e b , pode-se obter o parâmetro T_d ($a = (T_d)^b$), que é mais informativo e indica o tempo para liberar 63,2% do fármaco presente na formulação (PATEL *et al.*, 2008). Os valores de T_d obtidos para as formulações K1 – K7 são bastante semelhantes, confirmando a pouca variação observada no planejamento experimental. No entanto, pode-se ainda observar uma tendência comparando-se o T_d das formulações K1 – K4. Quando se aumenta a quantidade de alginato ou diminui a quantidade de fármaco, ocorre um aumento do tempo para liberar 63,2% de fármaco,

demonstrando o oposto ao obtido nos resultados da Tabela 5, para liberação de 85% de fármaco. Comparando com os valores de T_d das formulações com PA, confirma-se o aumento do tempo de liberação dessas formulações após a adição do agente reticulante. E, dentre elas, a formulação KPA-1 é a que apresenta o maior tempo para liberação de 63,2% do fármaco, confirmando o que foi observado nos perfis da Figura 41. Em geral, essa formulação é também a que apresenta os menores valores de constantes de taxas de liberação para os modelos analisados, corroborando com sua liberação mais lenta.

Apesar do modelo de Weibull não apresentar qualquer fundamento cinético, Papadopoulos *et al.* (2006) determinaram que o parâmetro de forma b pode permitir inferir informações sobre o mecanismo envolvido na dissolução. Assim, para valores de $b > 1,0$, a liberação do fármaco está associada a um mecanismo de liberação complexo, o qual pode envolver mais de um mecanismo, como por exemplo, difusão, erosão, inchamento e relaxação das cadeias poliméricas, além da própria interação entre o fármaco e a matriz (CHOIRI; AINUROFIQ, 2018). Como o modelo de Higuchi apresentou os piores ajustes, pode-se afirmar que a difusão não é um dos mecanismos determinantes nesse sistema. No entanto, tanto o modelo de Hopfenberg quanto o de Korsmeyer-Peppas apresentaram bons ajustes.

O modelo de Hopfenberg foi desenvolvido considerando sistemas erosivos, com diferentes geometrias. Os dados obtidos indicam melhor ajuste para sistemas cilíndricos no caso de K1 – K7 e bons ajustes tanto para formas cilíndricas quanto esféricas nas formulações com PA, o que significa que a liberação não é influenciada por resistências difusionais dependentes do tempo, nem internas nem externas à matriz (KATZHENDLER *et al.*, 1997), confirmando o ajuste não satisfatório obtido para o modelo de Higuchi.

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas permite obter o mecanismo envolvido através do valor do parâmetro n . Valores de $n > 0,85$ estão associados ao transporte de Super Caso II, que está relacionado ao inchamento e relaxação da matriz polimérica para liberação do fármaco (COSTA; LOBO, 2001; SINHA; UBAIDULLA; NAYAK, 2015). Sendo assim, assume-se que a liberação de cetoprofeno a partir da matriz de sericina e alginato, tanto com agente reticulante quanto sem, segue os mecanismos de erosão, inchamento e relaxação das cadeias.

Por relaxação da matriz, entende-se o enfraquecimento das forças de atração entre as cadeias poliméricas, o qual pode ser resultado da desprotonação dos grupos laterais dos polímeros que compõem a blenda. No caso da sericina, que é uma proteína, a desprotonação de grupos amina ocorre em valores de pH acima de seu ponto isoelétrico, que é igual a 3,9 (KODAMA, 1926). Para o alginato, a desprotonação das carboxilas ocorre em valores de pH acima dos valores de pKa de suas unidades monoméricas (3,38 para grupos M e 3,65 para grupos G) (CACURO; WALDMAN, 2018). Tendo sido utilizado o tampão fosfato com pH de 6,8 nos ensaios de dissolução, há um favorecimento desse processo, com a interação entre os polímeros sendo enfraquecida e eles sendo encontrados na forma relaxada, favorecendo a liberação do fármaco (GHOSAL; RAY, 2011).

4.1.10 Avaliação do processo de reticulação térmica: ensaios de liberação *in vitro*

Visando aprimorar as características de uma matriz polimérica, pode-se fazer uso da técnica de reticulação. Além da reticulação por via química, semelhante à utilizada nas etapas anteriores com a adição da PA, também é possível proceder pela via física, na qual se enquadram o uso de radiações gama ou ultravioleta, ou ainda a reticulação térmica (SIONKOWSKA *et al.*, 2010). Na reticulação térmica é possível obter a decomposição de grupos laterais termicamente lábeis, induzindo a formação da reticulação entre as cadeias, as quais costumam se ligar de forma mais estável do que no caso da reticulação química (JIN *et al.*, 2018). Gimenes; Liu; Feng (2007) verificaram que a reticulação térmica de membranas compostas por sericina e PVA contribuiu para aumentar o grau de reticulação, apesar de ter produzido membranas mais quebradiças.

Sendo assim, as melhores formulações de cetoprofeno obtidas tanto com o agente reticulante PA (KPA-1) quanto sem ele (K3) foram submetidas ao processo de reticulação térmica. Da Silva *et al.* (2016) verificaram uma redução da solubilidade de partículas compostas pela blenda de sericina e alginato, após secagem a 100 °C. Assim, optou-se por essa temperatura para a etapa de reticulação térmica, visando prolongar a liberação do fármaco.

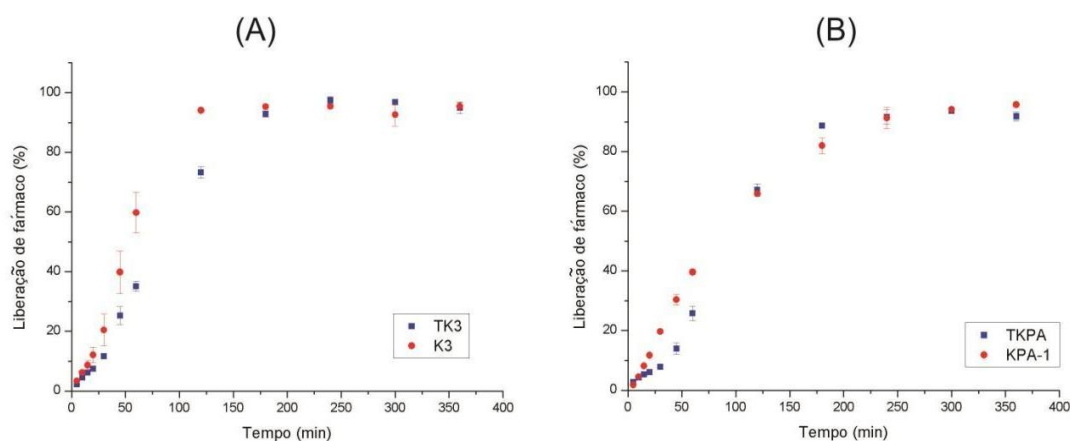
Por se tratar de uma etapa de secagem em temperatura controlada, a reticulação térmica não é capaz de influenciar os parâmetros de eficiência de incorporação e carregamento de fármaco, uma vez que não há a adição ou destruição de qualquer composto nessa etapa. Sendo assim, utilizou-se apenas o ensaio de dissolução para avaliar o

comportamento dessas formulações diante da etapa de reticulação. Como as formulações K3 e KPA-1 passaram por etapas de dissolução diferentes, aqui foram reproduzidas as dissoluções semelhantes às etapas anteriores: para TK3 ela foi realizada direto em tampão pH 6,8 e para TKPA ela foi realizada em etapas subsequentes ácida e tampão pH 6,8. Na Tabela 14 são apresentadas as liberações em meio ácido para as formulações reticuladas com PA (KPA-1 e TKPA). Na Figura 49 são apresentadas as liberações em meio tampão em função do tempo para as formulações K3 e KPA-1 e suas respectivas formulações submetidas à reticulação térmica, TK3 e TKPA.

Tabela 14 – Liberação de fármaco em meio ácido das formulações KPA-1 e TKPA.

Formulação	Liberação em meio ácido (%)
KPA-1	$7,38 \pm 0,25$
TKPA	$12,58 \pm 1,02$

Figura 49 - Curvas de dissolução *in vitro* em tampão pH 6,8 das formulações (A) K3 e TK3, (B) KPA-1 e TKPA.



O primeiro fato que se observa é a mudança da característica gastrorresistente da formulação reticulada quimicamente pela PA. Enquanto na KPA-1 a liberação em meio ácido foi de $7,38 \pm 0,25\%$, ou seja, menor que 10% e, portanto, equivalente a uma liberação retardada, na TKPA essa liberação foi de $12,58 \pm 1,02\%$, evidenciando um resultado pior após a reticulação térmica. Além disso, no que se refere à liberação em meio entérico simulado, a formulação TKPA apresentou perfil de dissolução um pouco diferente de KPA-1, atingindo o equilíbrio da liberação em um tempo menor do que a formulação que não passou pela reticulação térmica. Isso pode ter ocorrido porque uma maior parte do fármaco já havia sido liberada na etapa ácida. Já em relação às formulações K3 e TK3, observa-se

que a reticulação térmica contribuiu para aumentar o tempo de liberação de 180 min em K3 para cerca de 300 min em TK3.

Os resultados observados estão diretamente ligados à etapa de secagem no processo de reticulação térmica. Nessa etapa, remove-se a água que poderia estar ligada através de ligações de hidrogênio a grupos carbonila, carboxila, hidroxila e aminas do cetoprofeno, da PA, da sericina e do alginato. Ao ocorrer a desidratação, esses grupos ficaram disponíveis para formar ligações entre si, alterando a estrutura da rede tridimensional polimérica. A PA é formada por diversos grupos hidroxila (Figura 36) e, assim, é possível que após a remoção da água, radicais livres tenham sido gerados e, consequentemente, tenham formado ligações entre si. Ao entrar em contato com o meio ácido (íons H^+), essas ligações intermoleculares mais fracas do que aquelas que existiam na presença da água foram quebradas e permitiram a saída do fármaco mais precocemente (HE *et al.*, 2008). Outra possibilidade seria a de que, ao passar pelo processo de secagem, a PA tivesse passado pela transição vítrea, fenômeno característico de substâncias amorfas que passam a ser menos rígidas e mais elásticas após essa transição. No entanto, dados da literatura evidenciam que esse processo não ocorre na faixa de 25 °C a 100 °C, demonstrando que ele não atuou modificando a estrutura das partículas nesse sentido (GRASEL *et al.*, 2019).

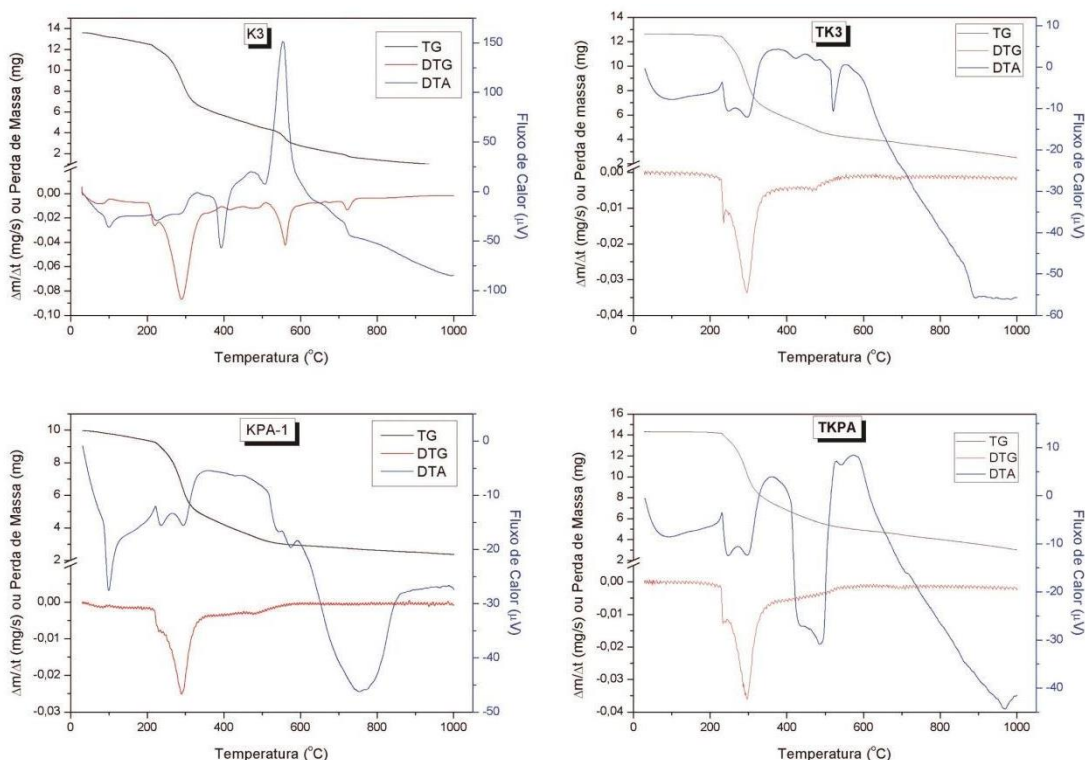
No caso das formulações sem o agente reticulante, ocorreu somente a desidratação da sericina, alginato e cetoprofeno. Assim, os componentes da blenda, ao se desidratarem, se ligaram de forma mais efetiva através de seus radicais livres, fazendo com que o aprisionamento do fármaco fosse mais efetivo, atrasando sua liberação.

4.1.11 Caracterização das partículas de cetoprofeno obtidas por reticulação térmica

4.1.11.1 Análises térmicas

A fim de avaliar o efeito da reticulação térmica sobre as partículas, foram realizadas análises de TG/DTG e DTA sobre as formulações TK3 e TKPA, apresentadas na Figura 50, além das curvas de K3 e KPA-1, para efeitos de comparação.

Figura 50 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para as formulações TK3 e TKPA e comparação com as curvas de K3 e KPA-1.



Pode-se observar na Figura 50 que a etapa de reticulação térmica foi efetiva na remoção de água, uma vez que na faixa até 100 °C não há nenhuma perda de massa em TK3 e TKPA. No entanto, nessa temperatura ainda há a ocorrência de um pico amplo endotérmico nas duas formulações, possivelmente referente à fusão do fármaco. Isso significa que mesmo que durante a secagem o fármaco tenha sofrido qualquer tipo de fusão, ele recristalizou em sua forma original e manteve sua temperatura de fusão original observada na Figura 32. Além disso, as curvas de TG/DTG se aproximaram bastante após a reticulação térmica, com eventos significativos entre 200 e 350 °C, referentes à decomposição e degradação dos componentes da blenda. Esses eventos se refletem nas curvas de DTA, caracterizados por picos endotérmicos nessa mesma faixa de temperatura e similares ao que havia sido observado em KPA-1.

Isso significa que tanto a reticulação química (covalente) quanto a física (térmica) permitiram obter resultados semelhantes no que se refere ao comportamento das partículas diante do aumento de temperatura. As partículas ficaram mais estáveis, especialmente em temperaturas acima de 400 °C, sem a ocorrência de eventos exotérmicos significativos e geração de subprodutos como material carbonizado.

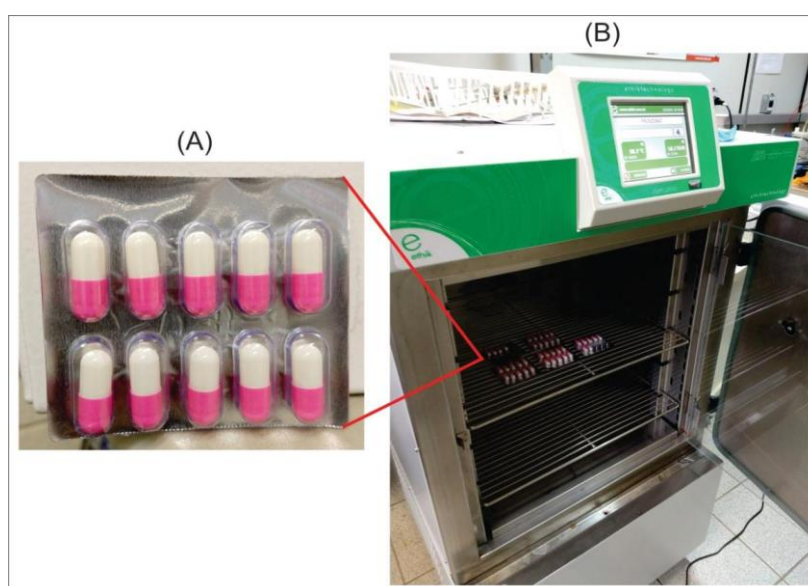
4.1.12 Ensaios de estabilidade das formulações de cetoprofeno

Diante de todos os resultados obtidos para o cetoprofeno, foram realizados estudos de estabilidade com as melhores formulações obtidas. Sendo assim, partículas das formulações K3 e KPA-1 foram submetidas a esse estudo, além das formulações TK3 e TKPA, a fim de verificar a influência da temperatura e umidade naquelas que haviam sido submetidas à reticulação térmica. Como respostas para esse estudo, avaliaram-se a eficiência de incorporação e o carregamento do fármaco das formulações K3 e KPA-1, além de ensaios de dissolução *in vitro* para todas as formulações envolvidas. Mais uma vez, partículas que possuíam o agente reticulante PA foram submetidas à dissolução *in vitro* completa (ácido + tampão fosfato pH 6,8), enquanto partículas sem a PA foram levadas à dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) direto.

4.1.12.1 Estudo de estabilidade acelerado

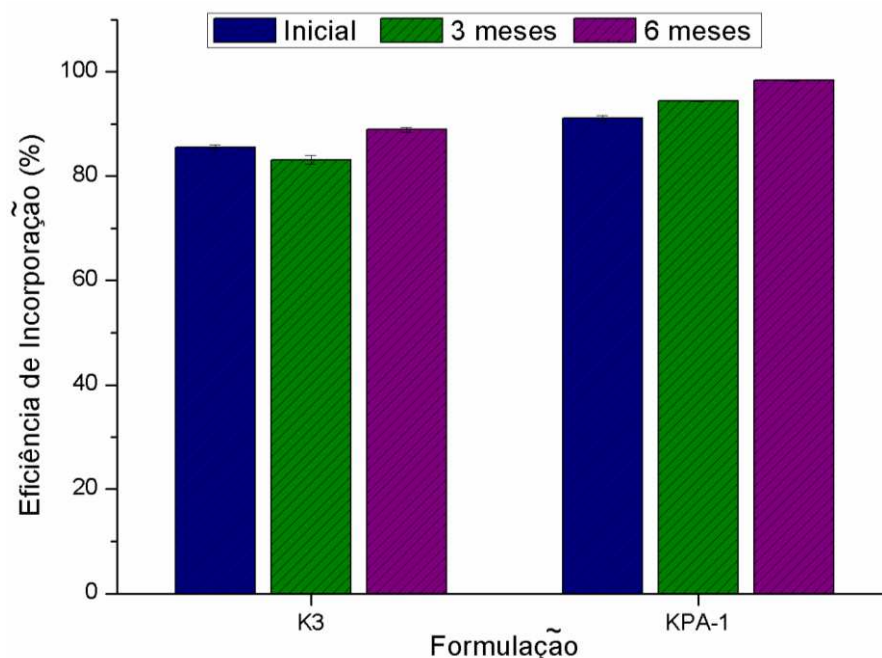
No estudo de estabilidade acelerado o objetivo é avaliar o comportamento de uma forma farmacêutica diante de condições forçadas de armazenamento, nesse caso temperatura de 40 ± 2 °C e umidade relativa de $75 \pm 5\%$. Na Figura 51 (A) está exemplificado o modo como essas partículas foram armazenadas em cápsulas gelatinosas duras tamanho 0, as quais foram armazenadas em blísteres de alumínio. Os blísteres com cada uma das formulações, K3, KPA-1, TK3 e TKPA, foram adicionados à câmara climática conforme a Figura 51 (B).

Figura 51 – (A) Demonstração dos blísteres e (B) disposição destes na câmara climática para ensaio de estabilidade acelerado.



Na Figura 52 são apresentadas as eficiências de incorporação obtidas para as formulações K3 e KPA-1 no início, após 3 meses e após 6 meses de ensaio.

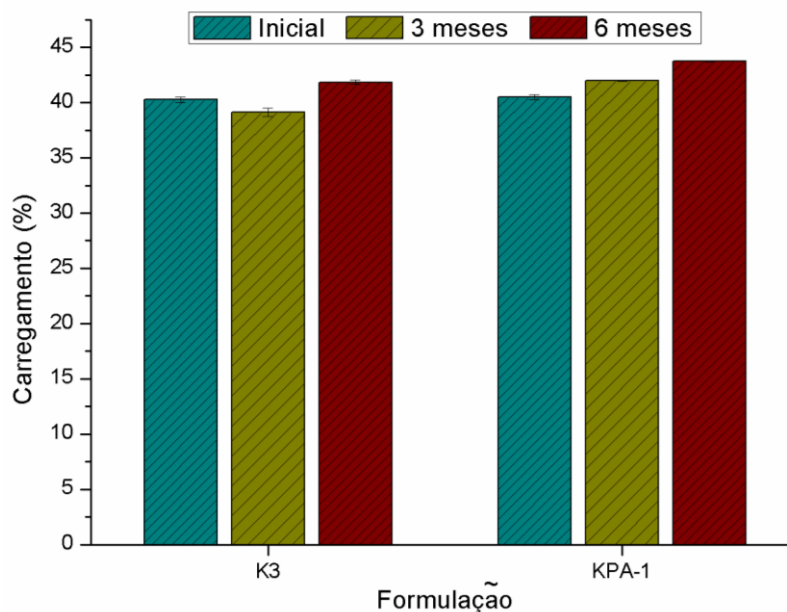
Figura 52 – Eficiências de incorporação obtidas no início, após 3 e após 6 meses para as formulações K3 e KPA-1, a partir do ensaio de estabilidade acelerado.



Os resultados de eficiência de incorporação obtidos ao longo do estudo de estabilidade acelerado foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey. Estatisticamente, com 95% de confiança, tanto as eficiências de K3 quanto de KPA-1 se mantiveram iguais após 3 e após 6 meses de experimento. Isso significa que as condições forçadas de armazenamento não foram capazes de degradar o fármaco ou a matriz polimérica em nenhum dos casos avaliados, indicando a estabilidade das formas farmacêuticas desenvolvidas no que se refere à incorporação.

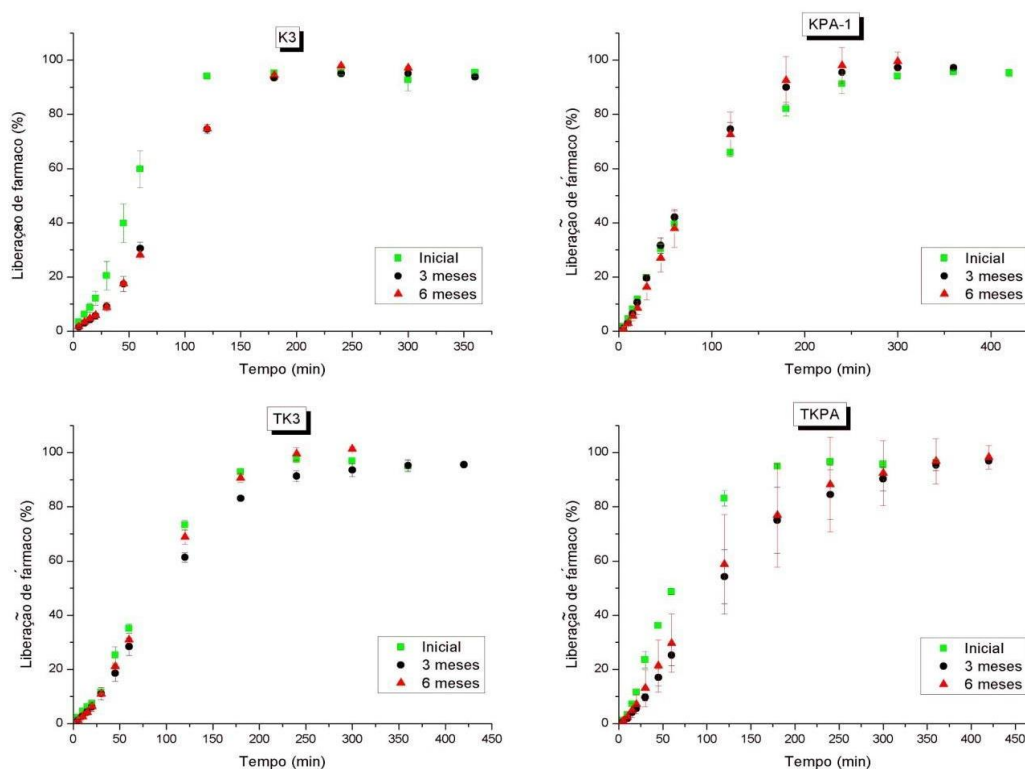
Na Figura 54 são apresentados os carregamentos dessas mesmas formulações. Aplicando-se o teste de Tukey ao Carregamento, verifica-se que, as condições iniciais foram mantidas, com 95% de confiança. Ou seja, estatisticamente, mesmo após o período de 6 meses em condições forçadas de armazenamento, as formas farmacêuticas preservaram suas características de carregamento iniciais. Diante desses dois resultados, pode-se concluir que os produtos desenvolvidos se comportam adequadamente para acondicionamento nas faixas utilizadas de temperatura e umidade relativa.

Figura 53 – Carregamento de fármaco das formulações K3 e KPA-1 no início, após 3 meses e após 6 meses de ensaio de estabilidade acelerado.



Foram realizados também os ensaios de dissolução *in vitro* das formulações K3 e KPA-1, além de TK3 e TKPA, como mencionado anteriormente. Na Figura 54 são apresentadas as curvas obtidas para cada uma das formulações, em intervalos de 3 meses.

Figura 54– Curvas de dissolução obtidas para o ensaio de estabilidade acelerado para as formulações K3, KPA-1, TK3 e TKPA, nos períodos inicial, 3 e 6 meses.



Pode-se observar que as formulações K3 e TKPA apresentaram as maiores diferenças em relação ao comportamento de liberação inicial e após 3 e 6 meses de ensaio. Em ambas, após o armazenamento a 40 °C e 75% UR, a liberação de fármaco tornou-se mais lenta. No caso de K3, a exposição à maior temperatura pode ter possibilitado o rearranjo da estrutura polimérica tridimensional, tornando o aprisionamento do fármaco mais eficiente e o aproximando do comportamento observado em TK3, a qual havia sido submetida à reticulação térmica. No caso de TKPA, o resultado observado pode ter sido influenciado pela umidade relativa empregada no ensaio. Cápsulas gelatinosas são desenvolvidas para uso em condições ambientais normais, ou seja, na faixa de 30 – 50% de umidade relativa. A exposição à elevada temperatura (acima de 35 °C) e à elevada umidade podem contribuir para torná-las mais frágeis fazendo com que as partículas de TKPA, inicialmente livres de água, absorvam parte dessa umidade (OLIVEIRA, 2005). Assim, seu comportamento se aproxima do observado para KPA-1, a qual não foi reticulada termicamente. Além disso, como essa absorção de umidade não é um processo homogêneo e controlado, as barras de erro das medidas após 3 e 6 meses se tornam mais expressivas.

Diante desses resultados, conclui-se que as formulações KPA-1 e TK3 foram as que mais mantiveram suas propriedades de liberação inicial, mesmo após as condições forçadas de armazenamento. Com isso, pode-se afirmar que essas duas são capazes de cumprir quesitos essenciais para a aplicação farmacêutica, como a qualidade, eficácia e a segurança.

4.1.12.2 Estudo de estabilidade de longa duração

O estudo de estabilidade de longa duração permite avaliar a forma farmacêutica em condições normais de armazenamento, à temperatura de 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa, durante o período de 12 meses. As formulações K3, KPA-1, TK3 e TKPA também foram submetidas a esse estudo e nas Figuras 55 e 56 são apresentados, respectivamente, as eficiências de incorporação e carregamentos obtidos a cada intervalo de 3 meses para as formulações K3 e KPA-1.

Figura 55 – Eficiências de incorporação das formulações K3 e KPA-1 obtidas no estudo de estabilidade de longa duração de amostras analisadas em intervalos de 3 meses.

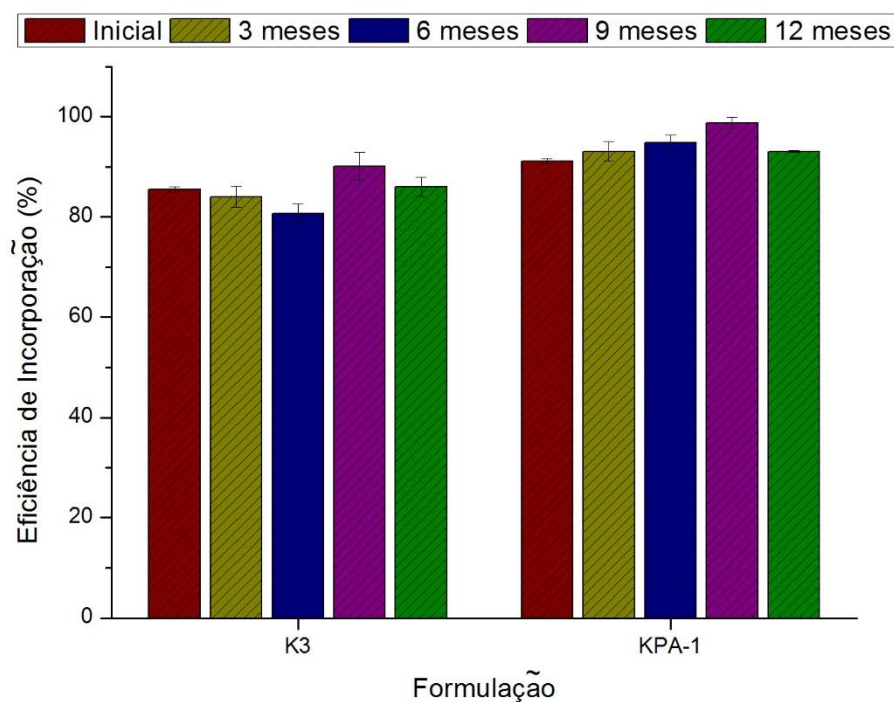
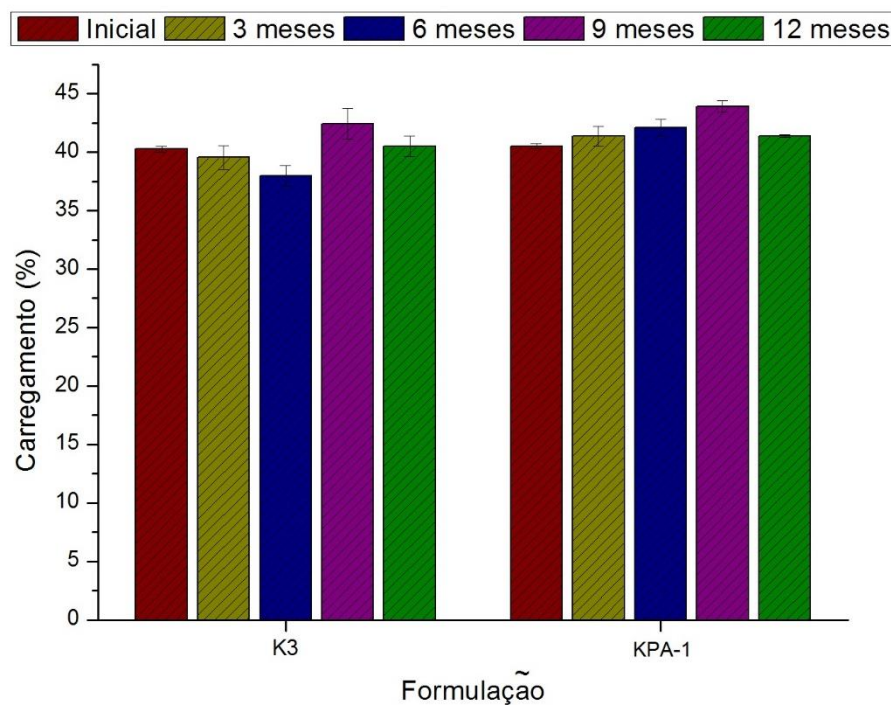


Figura 56 – Carregamentos das formulações K3 e KPA-1 obtidos no estudo de estabilidade de longa duração de amostras analisadas em intervalos de 3 meses.

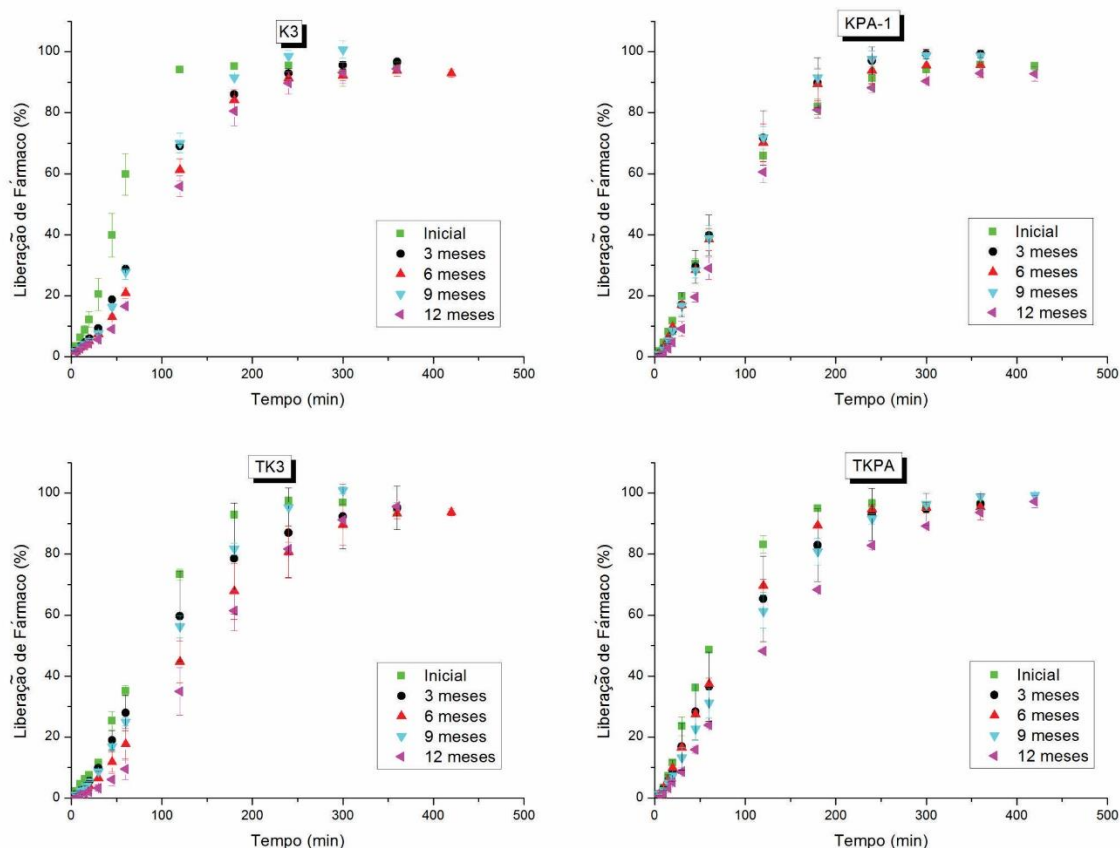


Os dados de eficiência e carregamento obtidos ao longo dos 12 meses de ensaio foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey. Estatisticamente, com 95%

de intervalo de confiança, é possível afirmar que as formas farmacêuticas desenvolvidas mantiveram suas características de incorporação, em condições normais de armazenamento. Assim, conclui-se que a temperatura e umidade não degradaram o fármaco ou sua matriz carregadora, mesmo após longo período armazenados nessas condições, o que indica que os produtos desenvolvidos podem ser mantidos acondicionados nas faixas de temperatura e umidade relativa utilizadas.

Os ensaios de dissolução *in vitro* foram realizados para as formulações K3 e KPA-1, além de suas respectivas formulações submetidas à reticulação térmica, TK3 e TKPA. Na Figura 57 observam-se as curvas obtidas para todas as formulações, nos intervalos de 3 meses ao longo do tempo total de 12 meses de ensaio.

Figura 57 – Curvas de dissolução *in vitro* obtidas em tampão pH 6,8 para as formulações K3, KPA-1, TK3 e TKPA ao longo do ensaio de estabilidade de longa duração, em intervalos de 3 meses.



Pode-se observar que apenas a formulação KPA-1 manteve comportamento similar às características iniciais de liberação, mesmo após o armazenamento durante 12 meses nas condições de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR. No caso da formulação K3, foi observado resultado

semelhante ao obtido no ensaio de estabilidade acelerado. Após o armazenamento, houve prolongação da liberação em relação ao obtido inicialmente, com essa característica se mantendo ao longo dos 12 meses de ensaio. A temperatura e a elevada umidade relativa permitiram um rearranjo da estrutura polimérica, melhorando o aprisionamento do fármaco e aumentando seu tempo de liberação.

As formulações TK3 e TKPA também tiveram prolongação da liberação, quando comparadas às curvas de dissolução obtidas no início. Nesse caso, a absorção de umidade por partículas que haviam sido submetidas à reticulação térmica, tornou seu comportamento mais próximo das formulações que não foram submetidas a esse processo (K3 e KPA-1). Porém, essa absorção de umidade não foi favorável às formulações TK3 e TKPA, fazendo com que, ao longo do estudo, elas aderissem às cápsulas gelatinosas e causando, em alguns casos, até mesmo a ruptura dessas cápsulas. Para exemplificar, na Figura 58 são apresentadas imagens obtidas ao longo dos 12 meses de ensaio, para cada intervalo de 3 meses, demonstrando o impacto da umidade sobre a formulação TK3. Uma alternativa poderia ter sido utilizar embalagens impermeáveis que impedissem a passagem de umidade.

Figura 58 – Imagens de partículas da formulação TK3 obtidas das amostras analisadas em 3, 6, 9 e 12 meses durante o ensaio de estabilidade de longa duração.



Diante dessa análise, e com base também nos resultados do ensaio de estabilidade acelerado, confirma-se a formulação KPA-1 como sendo a melhor formulação de cetoprofeno obtida neste estudo.

4.2 Desenvolvimento de formulações com naproxeno

4.2.1 Avaliação de diferentes composições da matriz polimérica para incorporação do naproxeno

4.2.1.1 Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco

Diferente do cetoprofeno, para o caso do naproxeno optou-se por realizar uma avaliação preliminar da composição da blenda, com e sem agente reticulante covalente. Só então, a partir dos resultados obtidos nessa etapa, procedeu-se ao planejamento experimental, visando otimizar a composição das partículas. Para isso, inicialmente foram desenvolvidas formulações de naproxeno incorporado à matriz de alginato puro, à matriz composta pela blenda de sericina e alginato e à matriz composta pela blenda e reticulada covalentemente pelo PVA e pelo DSP, descritos anteriormente, ou ainda pelo polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico sintético com boas propriedades de biocompatibilidade e amplamente utilizado em aplicações farmacêuticas (SAFARI; ZARNEGAR, 2014), tendo sido reportado como reticulante do alginato (WANG *et al.*, 2007) e da sericina (MOTTA *et al.*, 2011). Na Tabela 15 são apresentadas as formulações obtidas e suas composições.

Tabela 15 – Formulações de naproxeno obtidas a partir do estudo da composição da matriz polimérica.

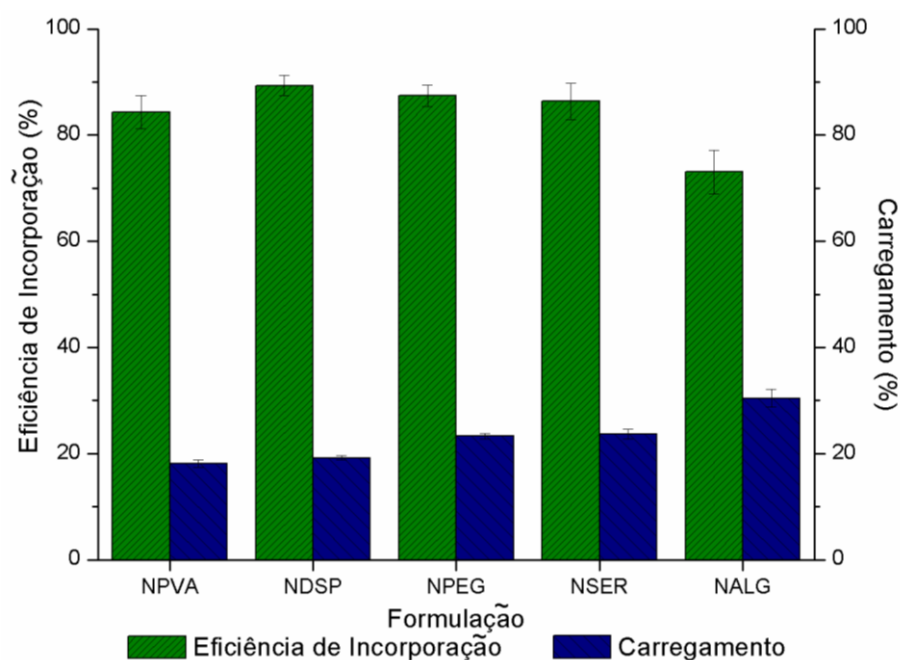
Formulação	Agente Reticulante		SER (%, m/V)	ALG (%, m/V)	NPX (%, m/V)
	Identificação	Concentração (%, m/V)			
NPVA	PVA	2,0	2,5	2,8	2,0
NDSP	DSP	2,0	2,5	2,8	2,0
NPEG	PEG	2,0	2,5	2,8	2,0
NSER	-	-	2,5	2,8	2,0
NALG	-	-	-	2,8	2,0

*SER: Sericina, ALG: Alginato, NPX: Naproxeno

No caso do naproxeno, a PA não foi empregada com sucesso por apresentar grande interferência na medida de absorbância no comprimento de onda desse fármaco (332 nm), impedindo sua determinação real (WANG *et al.*, 2015). As concentrações empregadas no estudo acima se basearam nos melhores resultados obtidos por Vidart *et al.* (2018), que avaliaram a incorporação de diclofenaco de sódio à blenda de sericina e alginato e obtiveram os melhores resultados para a formulação com 2,8% (m/V) de alginato e 2,0% (m/V) de fármaco.

Para avaliar as formulações da Tabela 15, foram determinadas a eficiência de incorporação e o carregamento de cada uma, apresentados na Figura 59.

Figura 59 – Eficiências de incorporação e carregamentos obtidos para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.



Pode-se observar que a eficiência de incorporação atingiu valores na faixa de $73,07 \pm 4,13\%$ a $89,33 \pm 1,90\%$. Estatisticamente, aplicando-se o teste de Tukey, as eficiências de NPVA, NDSP, NPEG e NSER são equivalentes. A formulação NALG foi a que obteve a menor eficiência e também a única que apresentou diferença estatística das demais, evidenciando o papel fundamental da sericina em aprimorar a incorporação do naproxeno. Nenhum dos agentes reticulantes contribuiu para aumentar esse parâmetro, possivelmente porque os fortes grupos polares laterais da sericina já se ligaram ao alginato de forma efetiva, evitando a perda de fármaco durante a produção de partículas. Na formulação composta somente por alginato, isso não ocorre, fazendo com que menos

fármaco seja incorporado (ZHANG, 2002). Resultado similar foi obtido por Čalija *et al.* (2011), que avaliaram a incorporação de naproxeno em micropartículas de quitosana e alginato, obtendo eficiências na faixa de $75,19 \pm 2,11\%$ – $84,45 \pm 2,16\%$, similar ao do presente trabalho.

O carregamento apresentou resultados na faixa de $18,14 \pm 0,67\%$ a $30,44 \pm 1,72\%$. Ao aplicar-se o teste de comparação de médias de Tukey, obteve-se que os pares NPVA/NDSP e NPEG/NSER são estatisticamente equivalentes, com 95% de confiança. A NALG, com o maior carregamento, apresentou-se estatisticamente diferente de todas as demais. Observa-se uma tendência desse parâmetro aumentar, conforme se aumenta a fração de fármaco na partícula, em consonância com o que já havia sido observado para o cetoprofeno e também por outros autores, como Katsikogianni; Avgoustakis (2006), que avaliaram incorporação de três fármacos em nanopartículas de PLGA-mPEG e Rouco *et al.* (2018), que avaliaram a incorporação do antibiótico rifabutina em carregadores lipídicos nanoestruturados.

4.2.2 Ensaios de liberação *in vitro*

Como a matriz foi mais uma vez modificada, também foi realizado ensaio de dissolução *in vitro* em meio ácido e em meio tampão fosfato (pH 7,4 para o naproxeno), para verificar sua gastrorresistência e prolongação da liberação. Na Tabela 16 estão apresentadas as liberações obtidas no meio ácido para cada uma das formulações.

Tabela 16 – Resultados de liberação em meio ácido para formulações com naproxeno.

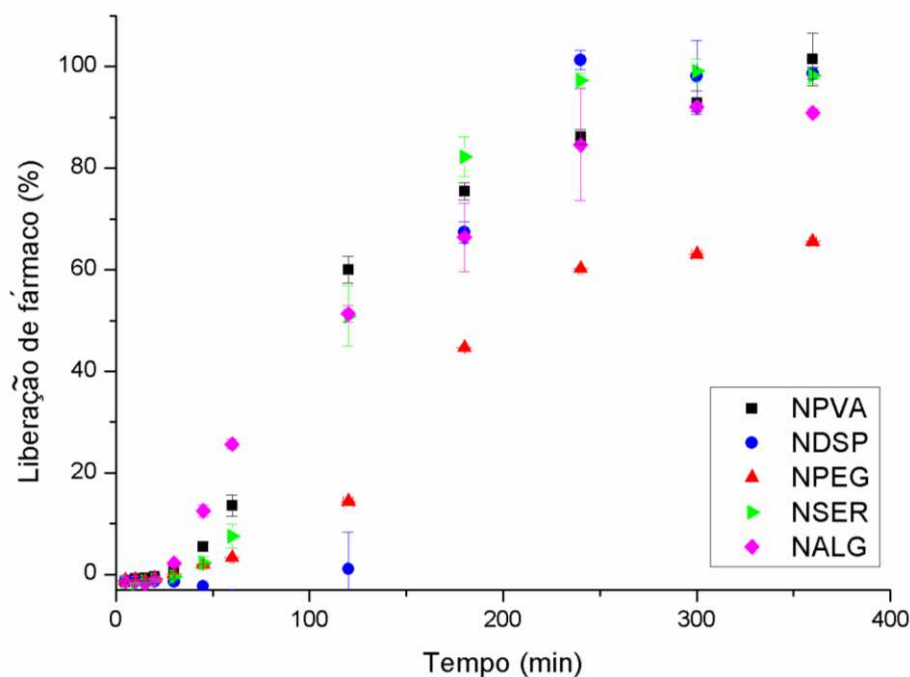
Formulação	Liberação em meio ácido (%)
NPVA	$6,82 \pm 1,38$
NDSP	$11,06 \pm 1,84$
NPEG	$7,47 \pm 0,46$
NSER	$8,13 \pm 1,38$
NALG	$8,45 \pm 1,30$

De acordo com a Farmacopeia Americana (XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018), uma formulação é considerada gastrorresistente se a liberação em meio ácido, após 2 h de ensaio, for menor que 10%. De acordo com os resultados da Tabela 16 a única formulação que não satisfaz essa condição foi NDSP, a qual utilizou o

fosfato de sódio dibásico como agente reticulante. Assim como já havia ocorrido para o cetoprofeno, o DSP também não foi capaz de reticular fortemente a blenda de sericina e alginato para aprisionar o naproxeno de forma efetiva no meio ácido. Possivelmente, ao entrar em contato com esse meio, o DSP reagiu preferencialmente com os íons H^+ , formando fosfato monossódico e liberando íons Na^+ , semelhante a um sistema tampão fosfato. Com isso, a matriz se tornou enfraquecida, permitindo a liberação do fármaco mais facilmente.

Na Figura 60 são apresentadas as curvas de dissolução *in vitro* obtidas para as formulações da Tabela 15 para liberação em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 60 – Curvas de dissolução obtidas para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.



Observa-se que a formulação NPEG atingiu o equilíbrio após aproximadamente 63% da liberação. Esse resultado foi obtido porque a própria partícula em branco referente a essa formulação, composta por sericina/alginato/PEG, já apresentou um valor de absorbância significativo no comprimento de onda utilizado, impedindo a determinação real do fármaco.

A NPVA apresentou liberação em ~360 min, no entanto, atingiu valores de liberação acima de 100%. Isso pode estar ligado à interferência de leitura no espectrofotômetro UV-vis, como visualizado para a PA, ou pode também indicar perda de

matéria-prima durante a produção de partículas de NPVA, fazendo com que a eficiência de incorporação dessa formulação fosse subestimada e, consequentemente, a quantidade de partículas utilizadas no ensaio de dissolução fosse superestimada.

A NDSP apresentou liberação próxima à zero até completar 120 min e, então, apresentou uma rápida liberação, estabilizando em 240 min. Isso pode ter ocorrido, pois o DSP não apresentou afinidade pela solução tampão, como aconteceu para a solução ácida. Assim, só passou a liberar o fármaco após o intumescimento da partícula. Esse comportamento não é interessante, porque mantém o fármaco preso por mais tempo, atrasando sua ação terapêutica. Além disso, essa foi a única formulação não gastrorresistente dentre aquelas avaliadas aqui, indicando que o agente reticulante DSP não é favorável.

A NALG também foi capaz de prolongar a liberação (~300 min), porém seu equilíbrio foi atingido após liberação de 90% do fármaco incorporado. Com isso, nota-se a influência do alginato em prolongar a liberação, como também havia ocorrido para o cetoprofeno. No entanto, o melhor perfil de dissolução acaba sendo considerado o de NSER, que atingiu o equilíbrio após 300 – 360 min, com cerca de 98% de liberação de fármaco.

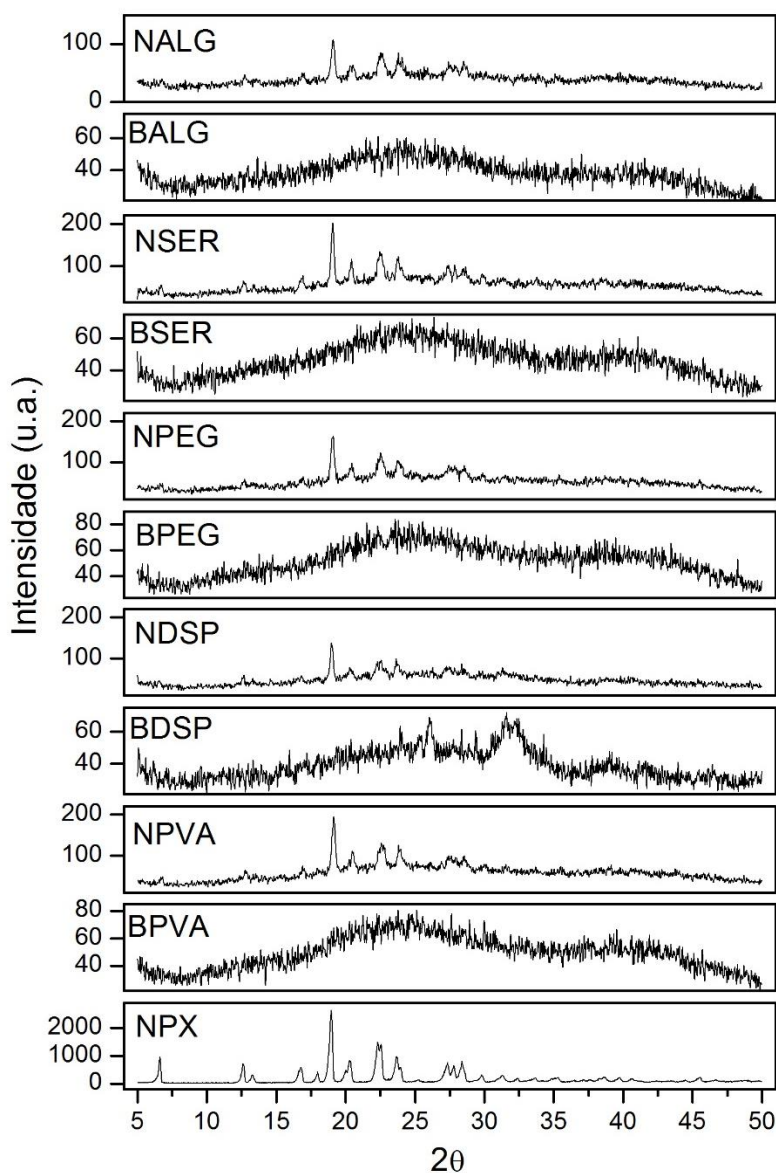
Portanto, a formulação NSER, com elevada eficiência de incorporação e elevado carregamento de fármaco, e característica de liberação retardada e prolongada, pode ser considerada o melhor resultado obtido nessa etapa. Em comparação à NPVA, NDSP e NPEG, a formulação NSER tem a vantagem de dispensar o uso de mais um reagente para atingir os resultados esperados, o que pode ter efeitos, principalmente, econômicos. Os resultados obtidos no presente trabalho foram melhores do que os reportados por Čalijs, B *et al.* (2013) que avaliaram a incorporação de naproxeno em micropartículas de alginato/oligoquitosana/Eudragit®L100-55 e obtiveram tempo de equilíbrio de 2 h para liberação em tampão fosfato pH 7,4. Dyakonov *et al.* (2012) apresentaram resultado similar ao do presente trabalho, atingindo o equilíbrio em 350 min a partir da blenda de sericina/gelatina/glicerina. No entanto, atingiu-se um patamar de apenas 80% de liberação. Deste modo, compreende-se a importância da blenda de sericina/alginato para incorporação do fármaco em questão.

4.2.3 Caracterização das partículas de naproxeno utilizando diferentes matrizes poliméricas

4.2.3.1 Cristalinidade

Na Figura 61 são apresentados os difratogramas das partículas com fármaco (identificadas pela inicial N), das partículas equivalentes livres de fármaco (identificadas pela inicial B) e do fármaco puro (NPX). Também são apresentados os difratogramas considerando as intensidades dos picos obtidos.

Figura 61 – Difratogramas obtidos por DRX para cetoprofeno puro (NPX), partículas com fármaco (NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG) e partículas sem fármaco (BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG).



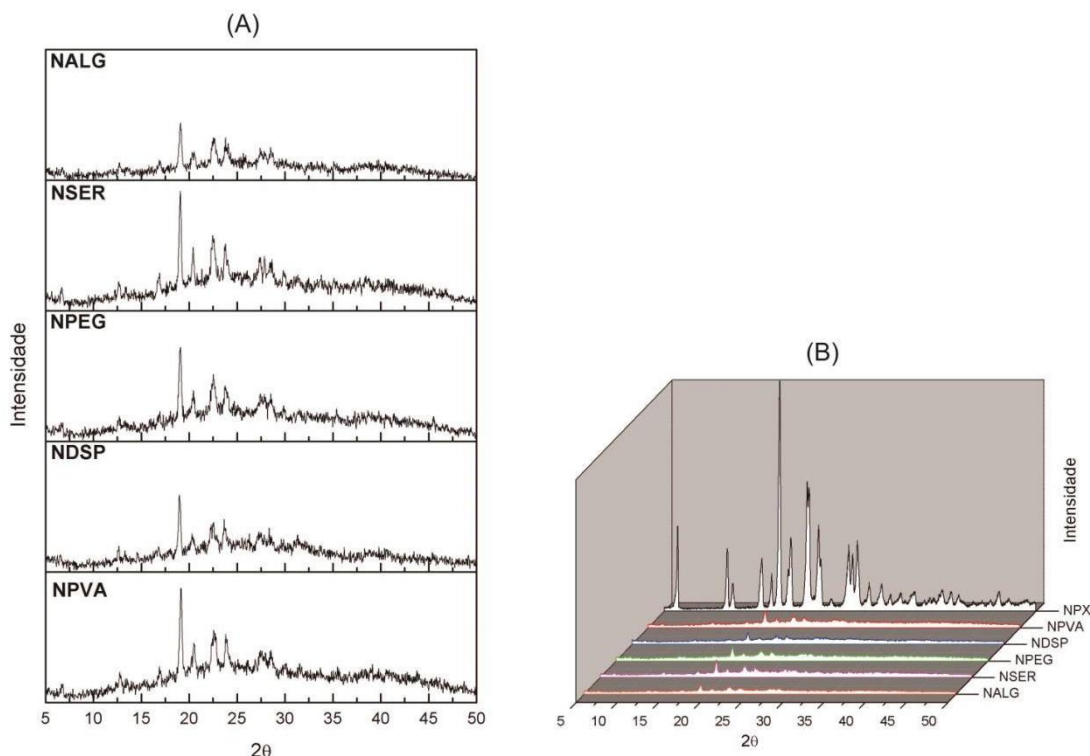
O difratograma do naproxeno (NPX) evidencia sua natureza fortemente cristalina, com picos bem definidos e distintos ($2\theta = 6,62^\circ, 12,65^\circ, 16,76^\circ, 18,97^\circ, 20,33^\circ, 22,58^\circ, 23,68^\circ$ e $28,35^\circ$) (AKBARI *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2017). Já as formulações sem fármaco (identificadas pela letra inicial B) mantêm a característica amorfa já observada para a mistura física de sericina e alginato e para sua blenda (Figura 25), com bandas cristalinas representativas de seus componentes, próximas a 24° e a 40° . Essas bandas podem ser decorrência da interposição das bandas da sericina (em 20° , pela conformação de folhas- β cristalinas, e próximas a $10^\circ, 28^\circ$ e 43°) e do alginato (em $13,5^\circ, 22^\circ$ e 39° relativos às suas subunidades), conforme mencionado anteriormente.

A BDSP, especificamente, apresenta um perfil um pouco mais cristalino do que as demais, apresentando picos acentuados em 25° e 30° . Isso ocorreu pela presença do DSP cristalino interagindo com a blenda amorfa de sericina e alginato (BASTIDAS *et al.*, 2013). O PEG puro também costuma apresentar uma estrutura mais cristalina, com diversos picos representativos (TAN *et al.*, 2016). Assim, o perfil visualizado na Figura F indica que o PEG reticulou a blenda de sericina e alginato, sendo compatível com ela e adquirindo estrutura predominantemente amorfa. O PVA apresenta, em geral, estrutura semicristalina com pico acentuado em $19,8^\circ$ (NASAR; KHAN; KHALIL, 2009). Na BPVA, possivelmente, o pico interagiu com aqueles da sericina e alginato durante o processo de reticulação da blenda, tornando-se também parte da estrutura amorfa da partícula.

Na Figura 62 são apresentados os difratogramas das formulações com fármaco, com ênfase na intensidade de seus picos, e também comparada com o do fármaco puro.

Pode-se observar na Figura 62 (B) que os picos do fármaco tiveram suas intensidades reduzidas após a incorporação a todas as formulações desenvolvidas, evidenciando que parte do naproxeno se apresenta numa forma mais amorfa, em função da mistura física ou dissolução na blenda. Comparando-se os difratogramas das cinco formulações (Figura 62 (A)), é possível notar que em NALG houve a maior redução dos picos do fármaco, enquanto a menor redução foi observada para a formulação NSER. Isso significa que NSER foi a formulação que permitiu que o fármaco mantivesse suas características de cristalinidade mais próximas das originais. Já em NALG houve uma maior dissolução do naproxeno na matriz polimérica amorfa, evidenciando mais uma vez a importância da sericina ao compor a matriz e aprisionar de forma eficaz o fármaco.

Figura 62 – Difratogramas com ênfase na intensidade dos picos para NPX e as formulações com fármaco (NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG).



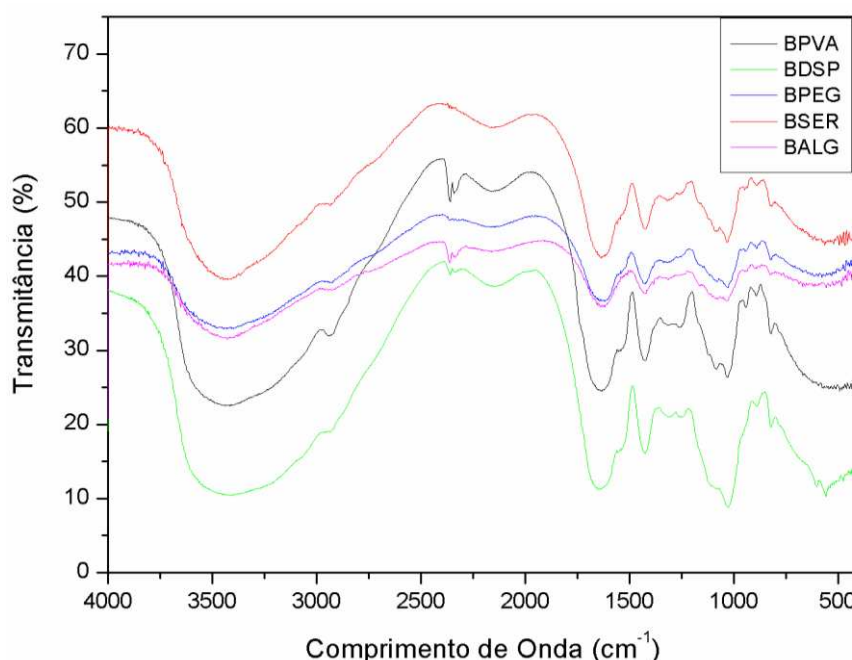
4.2.3.2 Grupos funcionais

Para avaliação dos grupos funcionais das amostras desenvolvidas, inicialmente foram obtidos os espectros das partículas sem fármaco (BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG), apresentados na Figura 63. É possível a partir desses espectros verificar a influência da adição de cada elemento na composição da blenda.

Em comum, todas as amostras apresentam uma banda ampla próxima a 3430 cm^{-1} referente ao estiramento O – H de hidroxilas, em ligações inter e intramoleculares (KONDO, 1997). Além disso, nas partículas em que há sericina, essa banda se sobrepõe às bandas referentes às amidas A e B desse composto ($3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$, referente ao alongamento N – H) (CASTRILLÓN *et al.*, 2018). Também estão presentes bandas próximas a 2930 cm^{-1} , referentes à vibração do estiramento C – H de grupos alquila, e em 1640 e 1425 cm^{-1} , referentes às vibrações de estiramento assimétrica e simétrica de carboxilas (COATES, 2011; SADIQ; CHOUBEY; BAJPAI, 2018). O pico próximo a 1030 cm^{-1} seguido da banda em cerca de 1080 cm^{-1} está diretamente relacionado à ocorrência da reticulação (SAARAI *et al.*, 2013), sendo que essa banda é atribuída à ligação entre grupos carboxílicos da blenda e grupos hidroxila dos próprios componentes da blenda ou dos

agentes reticulantes (MOHSEN *et al.*, 2017). No que se refere à estrutura secundária da sericina, bandas em 1655, 1630 e 1645 cm^{-1} equivalem às estruturas α -hélice, folhas- β e bobinas aleatórias, respectivamente (TERAMOTO; KAMEDA; TAMADA, 2008). Na Figura 63, as formulações BPVA, BDSP, BPEG e BSER apresentam bandas na faixa de 1635 – 1650 cm^{-1} , indicando que há uma tendência de estruturas de folhas- β organizadas (insolúveis) se transformarem em estruturas de bobinas aleatórias (solúveis) na blenda, o que pode facilitar o intumescimento da matriz e, conseqüentemente, a dissolução do fármaco.

Figura 63 – Espectros de FT-IR obtidos para as formulações BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG.

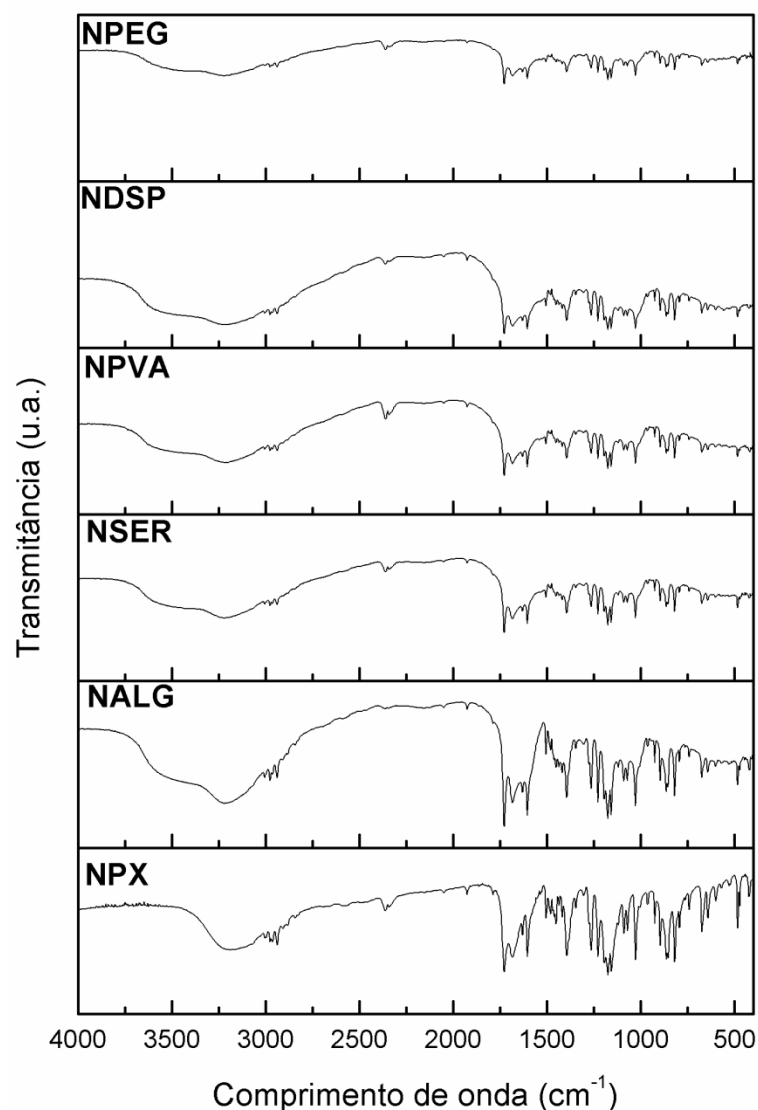


Algumas diferenças podem ser notadas entre as amostras da Figura 63, quando se adicionam os agentes reticulantes. Na região das amidas I (1600 – 1700 cm^{-1}), II (1504 – 1582 cm^{-1}) e III (1200 – 1350 cm^{-1}) da sericina ocorre uma mudança na amostra de BPVA (MANDAL; GHOSH; KUNDU, 2011). Enquanto nas demais amostras há uma banda próxima a 1315 cm^{-1} , em BPVA essa banda ocorre em 1540 cm^{-1} , indicando que nesse caso a reticulação ocorreu predominantemente pela amida III, ao invés da amida II como ocorreu com as demais. Na BDSP há a ocorrência de uma banda em 1119 cm^{-1} , a qual não aparece nos demais espectros e faz referência ao grupo PO_4^{3-} (BERZINA-CIMDINA; BORODAJENKO, 2012). Na BPEG não é possível identificar grupos específicos de sua

composição, uma vez que seus grupos funcionais são bastante similares aos encontrados para a blenda.

Na Figura 64 são apresentados os espectros de FT-IR obtidos para o fármaco puro e para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG, tendo sido empregada a mesma escala para todos os perfis, evidenciando as diferenças de intensidades da banda em cada formulação.

Figura 64 – Espectros obtidos por FT-IR para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.



O espectro do naproxeno (NPX) apresenta um elevado número de bandas, em função dos diversos grupos funcionais existentes em sua molécula. Porém, algumas bandas mais representativas podem ser destacadas. Em 3188 cm⁻¹ a banda é atribuída às vibrações

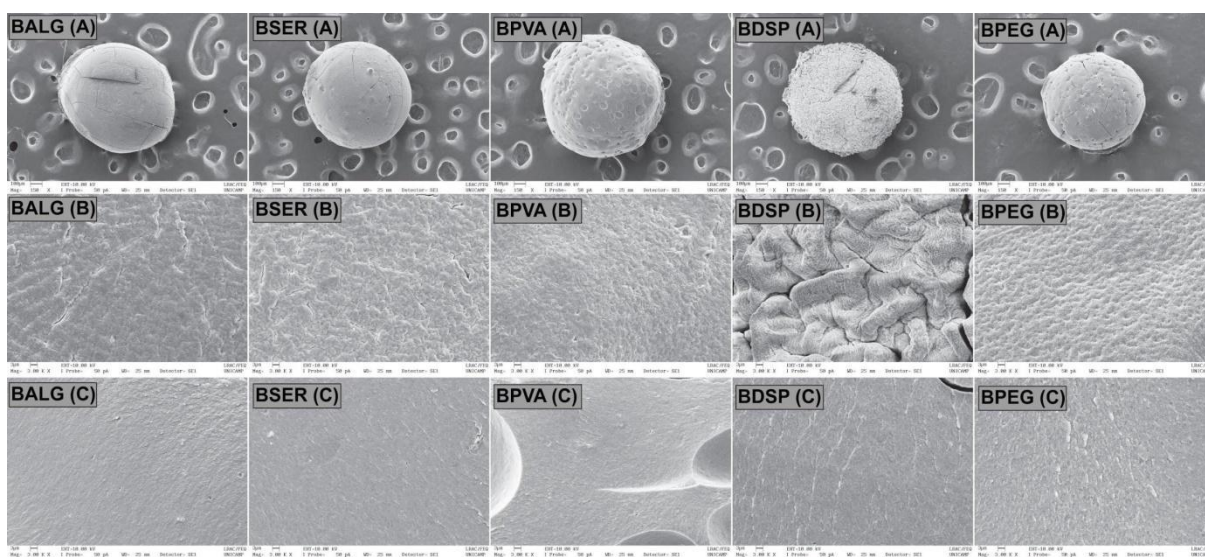
de estiramento do grupo OH; em 2963 e 2938 cm^{-1} se referem ao estiramento – CH_3 assimétrico e simétrico, respectivamente; em 1728 e 1682 cm^{-1} são as bandas equivalentes ao estiramento C = O do grupo carboxílico; na faixa de 1630 – 1453 cm^{-1} as diversas bandas equivalem ao estiramento C – C de grupos aromáticos; em 1395 cm^{-1} equivale à ligação CH_3 ; em 1029 e 864 cm^{-1} se refere à absorção de C – O – C e em 1176 cm^{-1} à absorção de C – O –, ambos da função éter (DEL ARCO *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2004).

Nas formulações da Figura 64, observa-se que os picos equivalentes aos grupos funcionais do fármaco permanecem sem grandes alterações. Isso significa que o naproxeno foi incorporado pelas matrizes poliméricas sem interagir com seus componentes, ou seja, manteve sua estrutura original, apesar de ter demonstrado que parte do fármaco sofreu dissolução na matriz de acordo com a análise de DRX.

4.2.3.3 Análise morfológica

Na Figura 65 são apresentadas as micrografias obtidas por MEV para as formulações sem fármaco (identificadas pela inicial B), a fim de verificar a influência de cada composição. Ressalta-se que foram obtidas micrografias tanto da superfície externa quanto do corte transversal das partículas dessas formulações.

Figura 65 – Micrografias obtidas para as formulações BPVA, BDSP, BPEG, BSER e BALG da superfície externa em ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal em ampliação de 3000x.



Na ampliação de 150x (Figura 63 (A)) é possível observar que as partículas apresentam formas semelhantes, porém com algumas diferenças em sua morfologia,

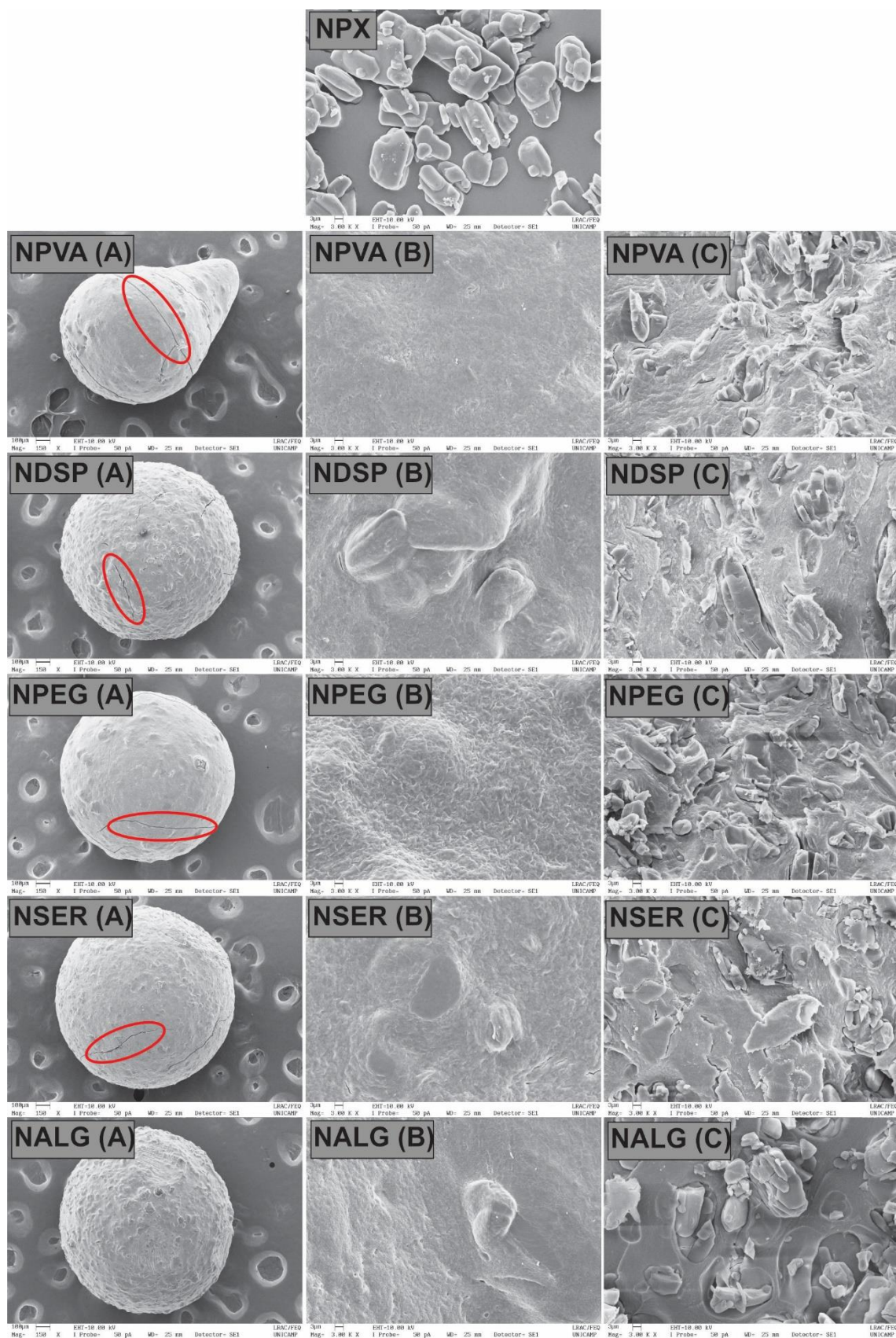
principalmente quando há a adição de agentes reticulantes. A BPVA, por exemplo, apresenta algumas depressões em sua superfície, resultado de diversos vazios que foram observados em seu interior. Isso caracteriza uma partícula altamente porosa e é resultado da presença do PVA, que sozinho é capaz de formar uma estrutura tridimensional de gel com elevada porosidade como observado por Neo *et al.* (2014) que observaram esse fenômeno ao estudar a produção de géis compostos por PVA e seda.

A BDSP foi a que apresentou a maior diferença e particularidade em sua superfície, com a presença de uma estrutura altamente rugosa e lamelar, não observada em seu interior e nem em nenhuma das partículas da Figura 63. Isso é resultado das ligações que acontecem entre o DSP e a blenda de sericina e alginato. Inicialmente, quando o DSP se liga à blenda, há a formação de pré-polímeros de baixa massa molar. Conforme o processo de reticulação vai acontecendo, a massa dessas estruturas vai aumentando, permitindo a formação das partículas de dentro para fora. Alguns dos pré-polímeros formados inicialmente não são capazes de reticular completamente, se depositando na superfície e tornando-a mais rugosa (MURPHY; WUDL, 2010).

A BPEG, a BSER e a BALG apresentam morfologias bastante semelhantes, com o aparecimento de algumas rachaduras e, no caso da BPEG, o surgimento de diversos pequenos furos na superfície, possivelmente pela ocorrência da reticulação covalente. Na ampliação de 3000x (Figura 65 (B)), com exceção de BDSP que apresenta uma estrutura rugosa, todas as demais são similares, com uma superfície levemente rugosa e lamelar. Internamente, a 3000x (Figura 65 (C)), a superfície de todas as partículas se tornou mais homogênea do que o que foi observado externamente.

Na Figura 66 são apresentadas as micrografias obtidas para o naproxeno puro e para as formulações contendo esse fármaco (NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG). Foram obtidas micrografias com ampliação de 3000x das superfícies externa e interna das partículas.

Figura 66 – Micrografias obtidas para o fármaco puro (NPX) a 3000x, e para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG da superfície externa com ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal com ampliação de 3000x.



Na ampliação de 150x é possível observar que as partículas NDSP, NPEG, NSER e NALG apresentam formas similares, enquanto a NPVA apresenta um formato mais alongado. Esse comportamento não foi unânime para as partículas de NPVA, tendo sido obtidas tanto partículas mais esféricas quanto partículas mais alongadas. Optou-se por apresentar na Figura 66 a forma mais alongada da partícula NPVA para explicar o fenômeno que pode ocorrer quando se adiciona o PVA como agente reticulante. Nesse caso, sua adição gera uma solução com maior viscosidade, o que dificulta o gotejamento, contribuindo para a não esfericidade das partículas. Essa propriedade do PVA é bem conhecida e, inclusive, é aproveitada na indústria farmacêutica visando aumentar a viscosidade de produtos oftálmicos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Na ampliação de 3000x das superfícies externas, é possível observar mudanças na morfologia causadas pela presença do fármaco interno às partículas. Além disso, as superfícies se tornaram mais homogêneas após a incorporação do naproxeno. No caso da NDSP, sua superfície alterou significativamente em relação à BDSP, após a adição do fármaco, indicando que ele contribuiu para melhorar o processo de reticulação dessas partículas.

Internamente, na ampliação de 3000x (Figura 66 (C)), é possível visualizar os cristais de fármaco semelhantes ao observado para o NPX. Isso confirma o que foi observado na análise de FT-IR de que o naproxeno foi incorporado mantendo sua estrutura original. A menor quantidade de cristais de fármaco é observada em NALG, justamente a formulação que teve a cristalinidade mais reduzida, conforme a análise de DRX, indicando que parte do naproxeno foi misturada à matriz polimérica. Além disso, essa formulação é a única que não apresenta fissuras em sua superfície (identificadas em vermelho nas demais formulações da Figura), o que pode ter contribuído para a prolongação da liberação de fármaco, confirmando o importante papel do alginato sobre essa característica.

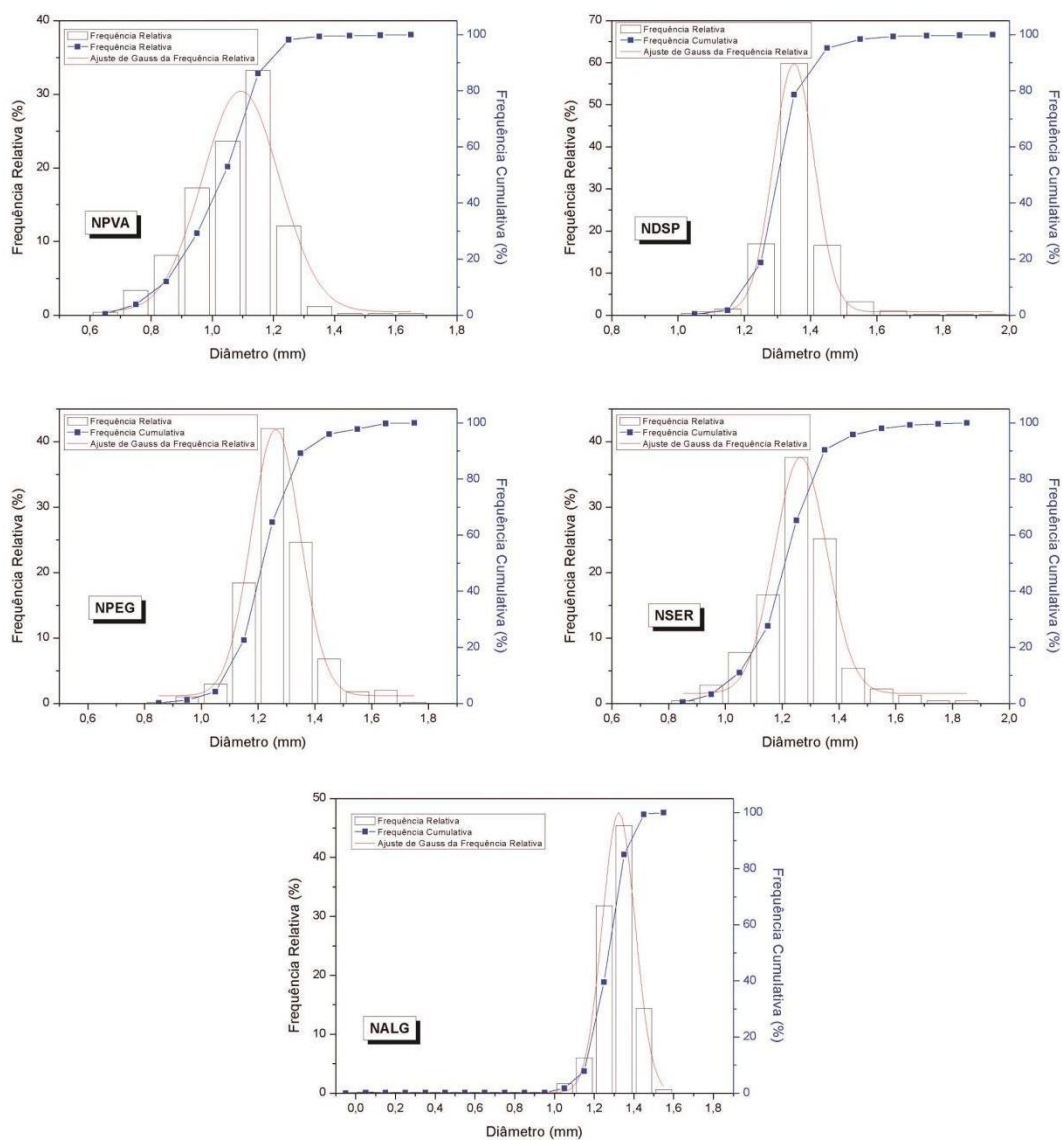
4.2.3.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanhos

Os diâmetros médios de cada formulação e os valores de R^2_{aj} obtidos do ajuste de Gauss à frequência relativa da distribuição estão mostrados na Tabela 17, enquanto na Figura 67 são apresentadas as distribuições de tamanhos das formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.

Tabela 17 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.

Formulação	Diâmetro médio (mm)	R^2_{aj}
NPVA	$1,07 \pm 0,13$	0,902
NDSP	$1,36 \pm 0,09$	0,997
NPEG	$1,28 \pm 0,12$	0,994
NSER	$1,26 \pm 0,14$	0,977
NALG	$1,32 \pm 0,10$	0,999

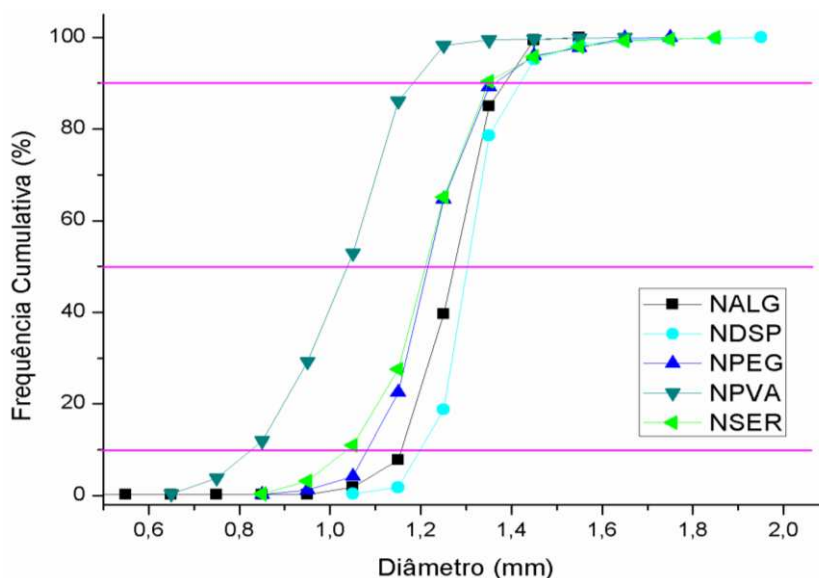
Figura 67 – Distribuição de tamanhos obtida para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.



As partículas de naproxeno utilizando diferentes matrizes poliméricas apresentaram diâmetros na faixa de $1,07 \pm 0,13$ a $1,36 \pm 0,09$ mm, tamanho adequado à aplicação em sistemas multiparticulados (SHEKUNOV *et al.*, 2007). Aplicando-se o teste estatístico de Tukey, com 95% de confiança, todos os diâmetros médios se mostraram equivalentes, indicando que a adição de agentes reticulantes não interferiu no tamanho das partículas. Pode-se observar, no entanto, que o menor diâmetro médio foi obtido para NPVA, porém o fato de ter apresentado partículas tanto alongadas quanto esféricas dificulta a determinação exata de seu tamanho. Além disso, como já era de se esperar, essa é a formulação com o menor valor para o parâmetro R^2_{aj} , uma vez que suas partículas não apresentaram uma homogeneidade nos tamanhos e formas. As demais formulações apresentaram valores de R^2_{aj} bastante satisfatórios, acima de 0,97.

Foram determinados os valores de *Span* da distribuição (Eq. 16) a partir dos perfis de frequência cumulativa da Figura 67. Na Figura 68 as linhas em rosa destacam as bases para determinação de D10, D50 e D90.

Figura 68 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.



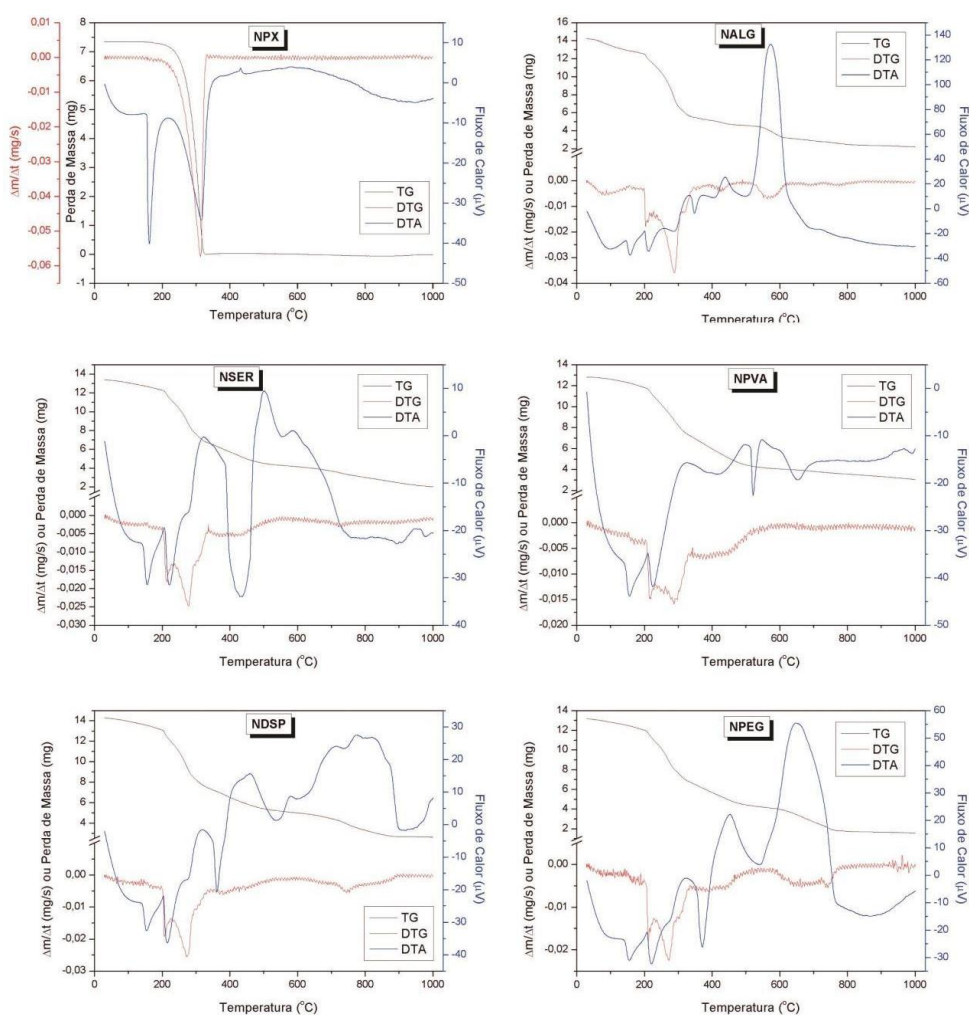
O *Span* representa o quão distante os valores de D10 e D90 estão, normalizados pelo ponto médio (D50). As formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG apresentaram os seguintes valores de *Span*: 0,337, 0,169, 0,221, 0,256 e 0,173. O maior valor de *Span* foi obtido para a formulação NPVA, a qual já havia demonstrado formatos mais alongados e baixa homogeneidade nas partículas, principalmente pela elevada

viscosidade dessa solução antes do gotejamento. A NALG foi a que apresentou o menor *Span*, confirmando a contribuição do alginato em atingir maior homogeneidade das partículas.

4.2.3.5 Análises térmicas

As análises térmicas de TG/DTG e DTA do fármaco puro e das formulações desenvolvidas geraram os perfis apresentados na Figura 69.

Figura 69 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações NALG, NSER, NPVA, NDSP e NPEG.



Para melhor visualização, o eixo y equivalente às curvas de TG/DTG do naproxeno (NPX) foi dividido em dois eixos. Pode-se observar que o fármaco é estável até 200 °C, apresentando um único estágio de perda de massa entre 200 – 330 °C, equivalente à sua degradação. Observando a curva de DTA, dois eventos endotérmicos são observados, o primeiro equivalente à fusão do fármaco a 160 °C e o segundo referente à degradação

observada anteriormente, a 315 °C, perfil esse já esperado, conforme a literatura (AKDUMAN; ÖZGÜNEY; KUMBASAR, 2016). A fusão do fármaco é observada em todas as formulações da Figura 69, na mesma temperatura do fármaco puro, confirmando a compatibilidade entre ele e as diferentes matrizes aqui empregadas.

Analisando-se as curvas de TG/DTG das cinco formulações desenvolvidas, observa-se bastante semelhança entre todas elas, com perdas de massa abaixo de 100 °C referentes à eliminação de água e perdas mais significativas acontecendo na faixa de 200 – 330 °C, em dois estágios. Essa perda de massa está relacionada à degradação do naproxeno, observada anteriormente, mas também à ação da temperatura sobre as diferentes matrizes poliméricas utilizadas nas formulações da Figura 69.

De acordo com a Figura 32, o alginato havia apresentado decomposição em 256 °C devido à destruição e degradação de ligações glicosídicas esperadas na faixa de 170 – 370 °C, com posterior formação de Na_2CO_3 e material carbonizado, que se decompõe de forma lenta na faixa de 600 – 750 °C (PATEL *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2004). Essa decomposição estava relacionada a picos exotérmicos observados na curva de DTA e que refletem diretamente nos resultados observados para NALG. Nesse caso, são observadas as perdas de massa referentes à degradação do fármaco e do alginato, relacionadas a eventos endotérmicos até 300 °C, seguidas de diversos eventos exotérmicos até cerca de 650 °C.

A sericina havia apresentado diversos estágios de perda de massa na faixa de 200 – 600 °C, sendo esperada a perda especialmente na faixa de 250 – 300 °C pela degradação dos grupos laterais dos aminoácidos e clivagem das ligações peptídicas (ZHANG *et al.*, 2012). Essas perdas estavam relacionadas a eventos exotérmicos na curva de DTA, a qual apresentou também picos exotérmicos referentes à recristalização de estruturas de bobinas aleatórias em folhas- β . Os resultados de sericina e alginato refletem nas curvas de NSER, nas quais se observam perdas de massa referentes à degradação do fármaco e da matriz composta pela blenda, associadas a picos endotérmicos na faixa de 200 – 450 °C, seguidos de picos exotérmicos acima dessa temperatura.

O PVA costuma apresentar degradação na faixa de 180 – 375 °C equivalente à decomposição de cadeias laterais e entre 375 – 600 °C devido à decomposição da cadeia principal (SHAKSHOOKI *et al.*, 2014). Como a primeira faixa de degradação coincide com aquela observada também para a sericina e o alginato, na NPVA os dois estágios de perda de massa dessa região não são completamente independentes, como acontece para as

demais formulações. Na curva de DTA observa-se que não há a ocorrência dos picos exotérmicos nas elevadas temperaturas como havia sido observado em NSER, possivelmente em função da decomposição do PVA nessa faixa, que gera picos endotérmicos.

O DSP apresenta degradação na faixa de 190 – 230 °C pela transformação de ortofosfatos em pirofosfatos. Na NDSP são observados os fenômenos nessa faixa relacionados à presença do DSP, mas também à blenda de sericina e alginato e ao naproxeno. Essa formulação apresentou diversos picos exotérmicos em temperatura acima de 700 °C, associados possivelmente a transformações dos subprodutos gerados na degradação do DSP (BANACH *et al.*, 2009).

Por fim, o PEG costuma apresentar uma única etapa de degradação na faixa de 250 – 400 °C, atribuído à sua decomposição e evaporação dos compostos alcoólicos orgânicos (QIAN *et al.*, 2017). Essa etapa é observada na NPEG e a diferencia de todas as demais formulações da Figura 69, com um pico endotérmico em 370 °C. Os demais picos são semelhantes ao observado para NSER, sendo equivalentes à blenda de sericina e alginato e ao fármaco. Diante desses resultados, observa-se que a perda de massa do fármaco é bem mais significativa quando ele está puro do que quando está incorporado nas matrizes poliméricas, levando à conclusão de que sua estabilidade foi aprimorada. No que se refere à adição dos agentes reticulantes, pouca diferença é observada, com a estabilidade térmica sendo mantida em todos os casos, possibilitando que todas sejam efetivamente empregadas para incorporação do naproxeno.

4.2.4 Análise geral da produção de partículas de naproxeno incorporado em diferentes matrizes poliméricas

Diante de todos os resultados obtidos para incorporação de naproxeno em diferentes matrizes poliméricas, observa-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando apenas a blenda de sericina e alginato como matriz para incorporar esse fármaco. Diferente do que havia sido observado para o cetoprofeno, aqui o agente reticulante covalente não alterou os resultados obtidos, tendo sido encontrados valores de eficiência de incorporação e carregamento equivalentes para amostras com ou sem o agente reticulante. Possivelmente, o grupo éter do naproxeno tem mais afinidade pela blenda, se ligando a ela de forma suficiente para adquirir as características de incorporação e liberação desejadas. No caso do cetoprofeno, o grupo cetona presente pode não ter se ligado de forma efetiva,

requerendo a adição do agente reticulante. Além disso, nesse caso, a sericina demonstrou sua importância, ao aprimorar a incorporação quando comparada à matriz composta somente por alginato.

Ao utilizar a blenda de sericina e alginato, foi obtida formulação gastrorresistente e de liberação prolongada, sob a ação de um mecanismo complexo de liberação, o qual envolve a erosão e o intumescimento da matriz para dissolução do naproxeno. As técnicas analíticas também demonstraram poucas alterações quando da presença ou ausência de agentes reticulantes, comprovando a incorporação do fármaco em sua estrutura e morfologia originais, com alguma dissolução nas matrizes reduzindo sua cristalinidade. A fim de otimizar a composição das partículas obtidas, foi proposto o desenvolvimento de um planejamento experimental ²² similar ao empregado para o cetoprofeno, já compreendendo que a blenda é suficiente para atingir os resultados pretendidos.

4.2.5 Planejamento experimental: eficiência de incorporação, carregamento e dissolução *in vitro*

Assim como foi proposto para o cetoprofeno, para o naproxeno também se desenvolveu um planejamento fatorial completo ²², com os ensaios sendo realizados de forma aleatória de acordo com o proposto pelo programa Statistica[®], utilizando como variáveis independentes as quantidades iniciais adicionadas de alginato e fármaco e mantendo a concentração inicial de sericina em 2,5% (m/V). Na Tabela 18 são apresentadas as formulações desenvolvidas, com as composições de sericina, alginato e naproxeno, além dos resultados para as variáveis dependentes, eficiência de incorporação, capacidade de carregamento de fármaco e tempo para liberação de 85% do fármaco (t_{85}). Os resultados dos pontos centrais (N5, N6 e N7) foram agrupados em “Centrais”. Na Tabela 18, N4* se refere a uma formulação similar a N4, porém composta somente por alginato e fármaco.

Tabela 18 – Formulações de naproxeno obtidas do planejamento experimental e resultados das variáveis dependentes.

Formulação	SER	ALG	NPX	Eficiência de Incorporação (%)	Carregamento (%)	t ₈₅ (min)
N1	2,5	2,0	2,0	79,27 ± 0,83 ^{a,b}	24,39 ± 0,25 ^a	114,14 ± 1,31 ^a
N2	2,5	2,8	2,0	73,31 ± 1,42 ^{a,b}	20,08 ± 0,39 ^a	170,61 ± 7,10 ^b
N3	2,5	2,0	4,0	73,24 ± 7,78 ^{a,b}	34,47 ± 3,66 ^b	151,75 ± 5,75 ^b
N4	2,5	2,8	4,0	77,67 ± 1,53 ^{a,b}	33,41 ± 0,66 ^b	173,69 ± 10,78 ^b
Centrais	2,5	2,4	3,0	81,08 ± 1,98 ^a	30,79 ± 0,75 ^b	157,42 ± 14,62 ^b
N4*	-	2,8	4,0	71,28 ± 1,07 ^b	41,93 ± 0,63 ^c	117,19 ± 0,31 ^a

Legenda: SER: concentração de sericina, ALG: concentração de alginato, NPX: concentração de naproxeno, todos em % (m/V). Os sobrescritos a, b, c se referem à análise de similaridade estatística realizada por meio do teste de Tukey.

Da Tabela 18, observa-se que as eficiências de incorporação obtidas no planejamento experimental variaram na faixa de 73,24 ± 7,78% a 81,08 ± 1,98%. Conforme mencionado anteriormente, a eficiência se refere à quantidade de fármaco que foi realmente incorporada em relação à quantidade inicialmente adicionada, servindo como parâmetro para avaliar a eficiência do método de preparação das partículas. Também sobre esses resultados foi aplicado o teste estatístico de comparação de médias de Tukey, sendo que sobrescritos iguais na Tabela 18 correspondem a valores estatisticamente equivalentes, com 95% de confiança. Pode-se observar que todas as formulações desenvolvidas no planejamento experimental apresentaram resultados estatisticamente similares, ou seja, independente da composição da formulação é possível atingir valores semelhantes de eficiência de incorporação. Os resultados obtidos no presente trabalho foram melhores do que os reportados por Solak (2011) que investigou a incorporação de naproxeno em matrizes compostas somente por alginato ou por alginato/PVA reticuladas com glutaraldeído, obtendo eficiências de incorporação na faixa de 56 – 72%, ou seja, naquele caso maior quantidade de fármaco foi perdida durante a produção das partículas.

Ao se comparar os resultados da Tabela 18 com o que havia sido obtido para NSER (86,39 ± 3,43%), estatisticamente foram obtidas similaridades com N1, N4 e Centrais. A diferença estatística entre os resultados de NSER e N2, as quais apresentam a mesma composição inicial, pode ser resultado da diferença nos lotes de sericina. A cada etapa experimental, foi realizada uma nova extração a partir dos casulos do bicho-da-seda. Sabe-se que essa etapa de extração afeta diretamente as propriedades da sericina, podendo levar a

variações na massa molar e até na concentração de aminoácidos, o que explica a variabilidade das sericinas extraídas em diferentes etapas (KUNZ *et al.*, 2016).

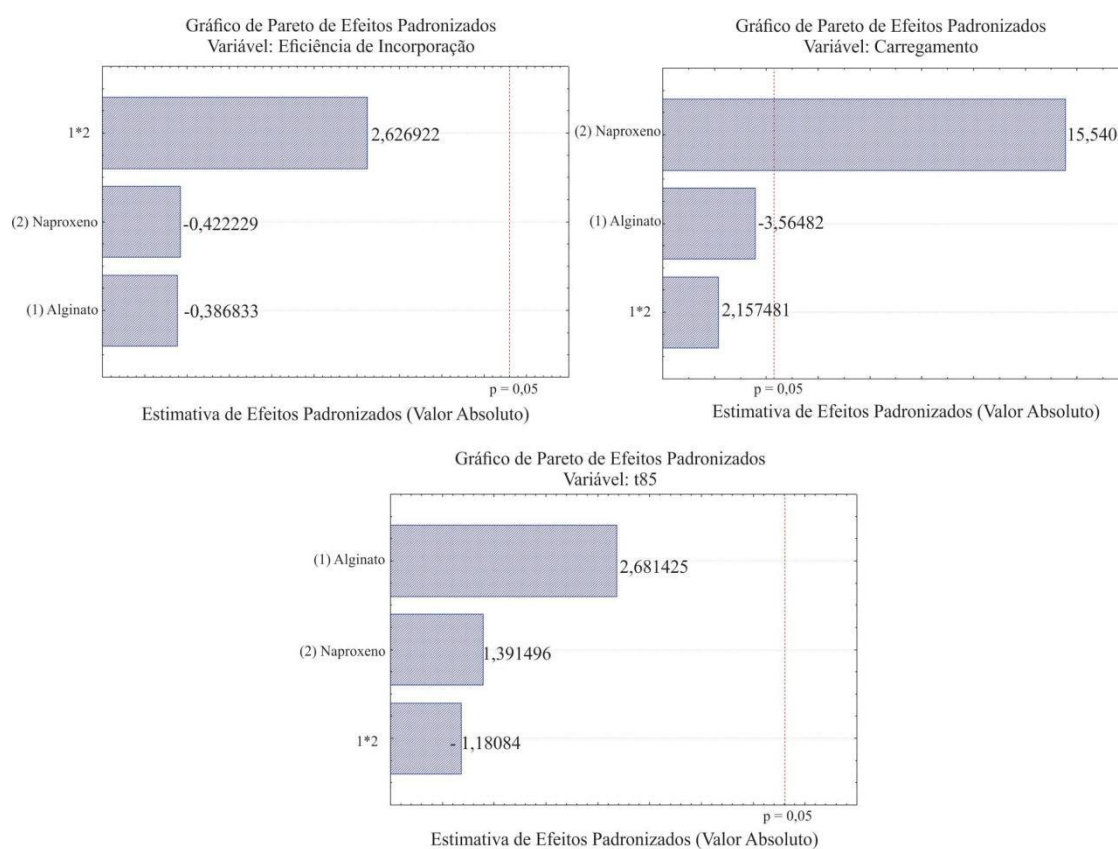
A capacidade de carregamento de fármacos, indicativa da quantidade de fármaco presente em uma massa conhecida de partículas, variou na faixa de $20,08 \pm 0,39\%$ a $34,47 \pm 3,66\%$. Estatisticamente, se mostraram equivalentes os carregamentos das formulações N1 e N2, e N3, N4 e Centrais, ou seja, esse parâmetro foi diretamente afetado pela quantidade de fármaco adicionada inicialmente. Os maiores carregamentos foram obtidos para formulações com maiores quantidades de naproxeno. Esses valores estão de acordo com o obtido por Čalija *et al.* (2013), que avaliaram o carregamento de naproxeno em partículas de alginato, de alginato/oligoquitosana e de alginato/oligoquitosana/Eudragit® L100-55, obtendo valores na faixa de $18,4 \pm 3,1\%$ a $31,4 \pm 1,1\%$, também influenciados pela fração de fármaco na partícula. O carregamento de NSER demonstrou similaridade estatística com o resultado de N2, indicando que esse é um parâmetro influenciado apenas pela composição das partículas, diferente da eficiência de incorporação.

Na etapa de avaliação de diferentes composições da matriz polimérica para incorporação do naproxeno, foi desenvolvida a formulação NALG (2,8% m/V de alginato e 2,0% m/V de naproxeno), de composição equivalente à formulação N2 da Tabela 18. No entanto, os melhores resultados do planejamento experimental em termos de eficiência e carregamento foram demonstrados para a formulação N4. Assim, optou-se por desenvolver uma formulação utilizando como base somente o alginato, mas com composição de alginato e fármaco equivalentes a N4, chamada N4*, cujos resultados também estão apresentados na Tabela 18. Seu carregamento se mostrou estatisticamente diferente de todos os valores do planejamento experimental, o que já era esperado em função da maior fração de fármaco nessa formulação. Já o valor de eficiência se mostrou estatisticamente diferente apenas de “Centrais”, demonstrando a menor influência da sericina sobre esse parâmetro quando se aumenta a quantidade de fármaco adicionada, diferente do que havia sido observado em NALG. Na realidade, o efeito da sericina nesse caso é observado no tempo de liberação de 85% do fármaco (t_{85}), já que a formulação N4* apresenta uma das liberações mais rápidas e estatisticamente similar apenas a N1, enquanto N4 é a que apresenta liberação mais prolongada, diferente do efeito observado no planejamento experimental do cetoprofeno. Esse resultado também foi observado por Bezerra (2018) para o fármaco furosemida, o qual apresenta uma função éter como o naproxeno. Possivelmente,

essa função éter tem maior atração pela sericina do que a função cetona do cetoprofeno, que tem maior atração pelo alginato, permitindo a prolongação da liberação do fármaco.

As variáveis dependentes da Tabela 18 também foram submetidas a uma análise dos efeitos das variáveis independentes. Com isso, foram obtidos os gráficos de Pareto apresentados na Figura 70, com intervalo de confiança de 95% e cálculo do erro puro pela repetição no ponto central.

Figura 70 – Gráficos de Pareto obtidos a partir da análise dos efeitos das variáveis alginato e naproxeno sobre a eficiência de incorporação, carregamento e t_{85} .



Conforme já mencionado, efeitos que apresentam a barra azul ultrapassando a linha do p -valor = 0,05 (para 95% de confiança) podem ser considerados significativos. De acordo com os resultados da Figura 68 apenas o naproxeno exerceu influência significativa sobre o carregamento. As demais variáveis dependentes não sofreram influência significativa de nenhuma das variáveis independentes avaliadas (alginato e fármaco). Esse resultado foi similar ao obtido para o cetoprofeno, e mais uma vez a tabela ANOVA e as equações do modelo foram omitidas devido à sua baixa significância. A explicação para esse resultado também está na limitação da faixa empregada para as quantidades de

alginate e naproxeno adicionadas, as quais não permitem extrapolação e, portanto, impossibilita um estudo estatístico mais detalhado.

Apesar de apenas o fármaco ter demonstrado significância estatística sobre o resultado de carregamento, é possível observar uma tendência para obter os valores desejados para cada variável-resposta, a partir dos resultados da Tabela 18. Para obter as maiores eficiências de incorporação, por exemplo, observa-se que se deve analisar o fármaco e o alginato em conjunto. Em relação à eficiência, todos os valores foram similares, independente das quantidades de fármaco e de alginato. Para obter elevado carregamento, deve-se empregar maiores quantidades de naproxeno, independente da quantidade de alginato adicionada. Já em relação à variável tempo para liberação de 85% de fármaco, quando se deseja prolongar a liberação deve-se empregar as maiores quantidades de alginato, independente da quantidade de fármaco. Assim, analisando-se todo o conjunto dos resultados do planejamento experimental, a melhor formulação obtida foi N4 composta por 2,5% (m/V) de sericina, 2,8% (m/V) de alginato e 4,0% (m/V) de naproxeno. Nesse caso, elevados valores de eficiência e carregamento foram obtidos, com maior prolongação da liberação.

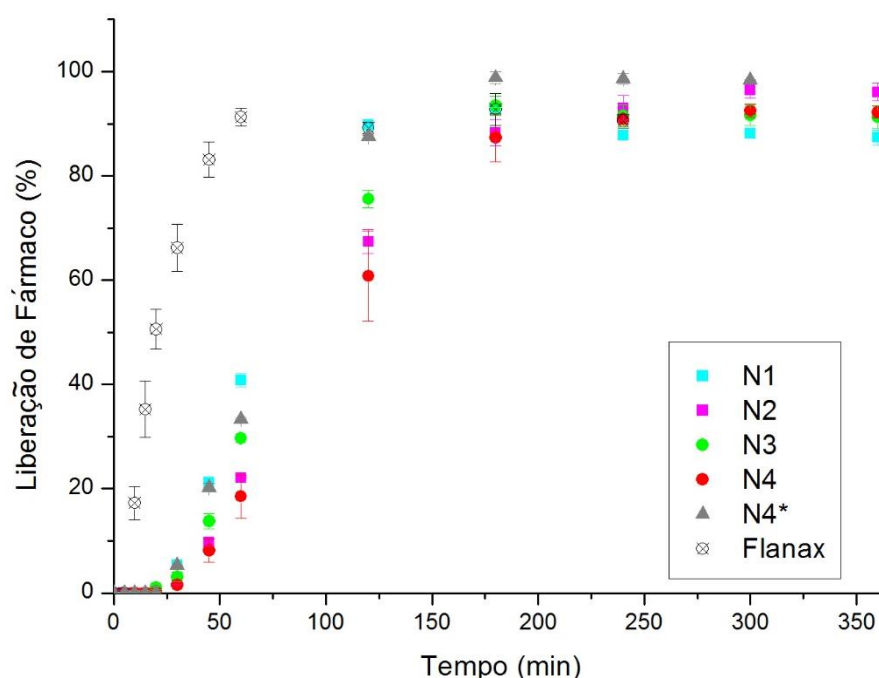
4.2.6 Ensaios de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* do naproxeno para liberação controlada, de acordo com a Farmacopeia Americana (XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018), devem ser realizados diretamente em tampão fosfato (pH = 7,4), simulando o meio entérico. Como mencionado anteriormente, o caráter gastrorresistente da blenda de sericina e alginato foi comprovado por Vidart *et al.* (2018) e, ainda, confirmado na etapa anterior de avaliação das diferentes composições da matriz polimérica para incorporação do naproxeno. Sendo assim, nessa etapa de planejamento experimental, realizou-se diretamente somente a etapa tampão, obtendo-se as curvas apresentadas na Figura 71, para as formulações N1 – N4 do planejamento experimental, para a formulação N4* e, para efeitos de comparação, a obtida para o medicamento referência Flanax® 275 mg, que promete efeito por até 12 horas. Ressalta-se que no Brasil não há a comercialização de uma forma de liberação modificada do naproxeno e, por isso, realizou-se o ensaio com o medicamento disponível de liberação imediata.

Pode-se observar que as formulações N1, N3 e N4* atingiram o equilíbrio em 180 min, enquanto as formulações N2 e N4 tiveram a maior prolongação da liberação, atingindo

o equilíbrio em cerca de 300 min. Observa-se a influência da sericina em prolongar a liberação do naproxeno ao se comparar N4 e N4*, possivelmente pela maior afinidade entre a proteína e o fármaco em questão. Ao comparar as formulações do planejamento experimental, verifica-se a influência da quantidade de alginato sobre o tempo de liberação. Assim, as maiores quantidades de alginato proporcionaram os maiores tempos de liberação para N2 e N4. Esse resultado é similar ao obtido anteriormente para o cetoprofeno (KPA-1) e para o diclofenaco de sódio (VIDART *et al.*, 2018), incorporados na mesma blenda polimérica. Também foram obtidos resultados similares por Dyakonov *et al.* (2012) ao incorporar naproxeno em filmes de fibroína/gelatina/glicerina ou em micropartículas de fibroína, com resultados de liberação controlada e sustentada, respectivamente, e equilíbrio atingido em cerca de 300 min.

Figura 71 – Curvas de dissolução obtidas para as formulações K1 – K4 do planejamento experimental, para a formulação N4* e para o medicamento referência Flanax®, todas em meio tampão pH 7,4.



Constata-se que todas as formulações desenvolvidas apresentaram um tempo de liberação maior do que aquele obtido para o medicamento referência (~ 60 min), como já era de se esperar, por se tratar de um medicamento de liberação imediata. No entanto, o que se deve ressaltar é a ação desse medicamento, garantida em até 12 horas. Portanto, a obtenção de prolongação com as formulações à base de sericina e alginato pode garantir

uma eficácia terapêutica ainda melhor, sem gerar picos na corrente sanguínea, além do já comprovado caráter gastrorresistente que pode reduzir a ocorrência de efeitos colaterais.

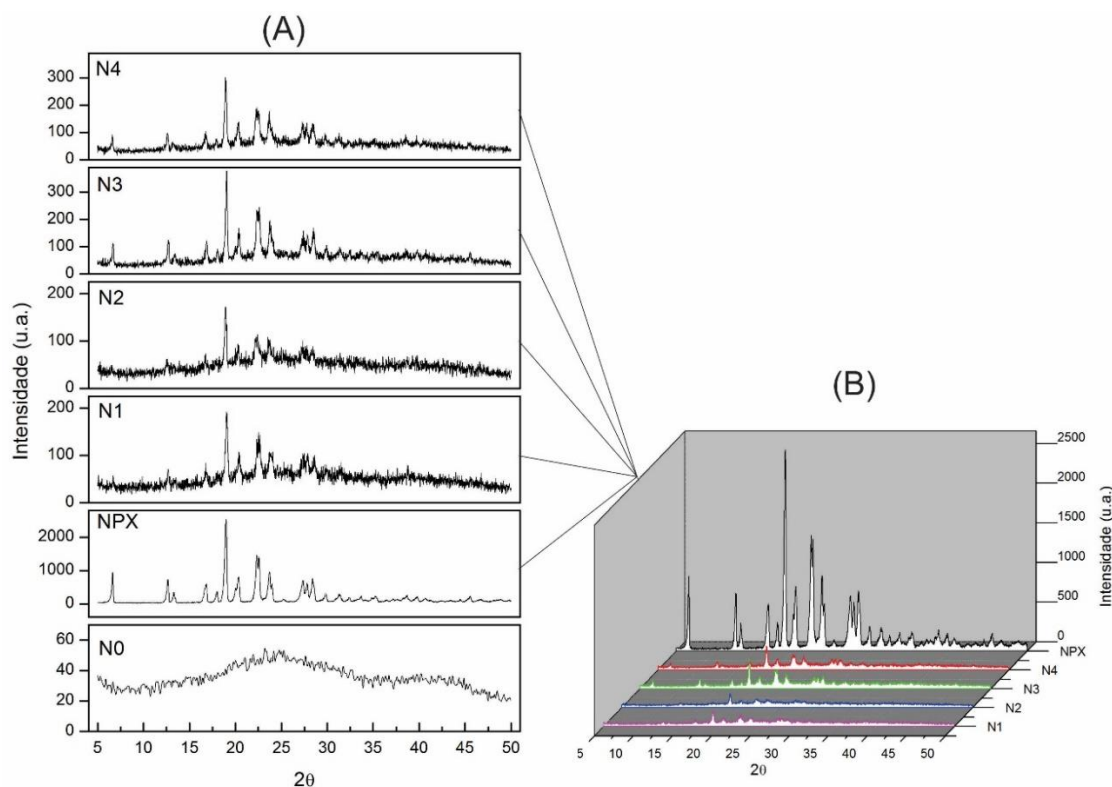
Nesse caso, não foi calculado o fator de similaridade (f_2) por não se tratar do desenvolvimento de formas farmacêuticas similares ao medicamento referência. Portanto, o resultado do valor de $f_2 < 50$ já é o esperado, classificando todas as formas como diferentes do Flanax[®] e levando à conclusão de que foi obtida uma nova forma farmacêutica de liberação retardada e prolongada.

4.2.7 Caracterização das partículas de naproxeno obtidas pelo planejamento experimental

4.2.7.1 Cristalinidade

Na Figura 72 são apresentados os difratogramas obtidos por DRX para as formulações N1 – N4, para o fármaco puro (NPX) e para uma formulação sem fármaco (N0). As demais formulações não foram apresentadas devido à semelhança com os demais resultados obtidos.

Figura 72 – (A) Difratogramas obtidos por DRX para as formulações N1 – N4, para o fármaco puro (NPX) e para a blenda de sericina e alginato (N0) e (B) difratogramas com ênfase à intensidade dos picos das formulações N1 – N4 e do fármaco (NPX).



O difratograma de N0, composta somente pela blenda de sericina e alginato, se assemelha muito aos demais difratogramas apresentados nessa tese para essa formulação, com uma característica predominantemente amorfa e bandas cristalinas representativas de seus componentes, próximas a $2\theta = 24^\circ$ e 40° . Essas duas bandas são resultado da interposição das bandas da sericina, em 20° (conformação de folhas- β cristalinas) e em 10° , 28° e 43° , e do alginato, em $13,5^\circ$, 22° e 39° , relativos às suas subunidades, conforme citado anteriormente.

O difratograma do naproxeno apresentou diversos picos distintos, característicos de sua natureza altamente cristalina, em $2\theta = 6,6^\circ$, $12,6^\circ$, $16,8^\circ$, 19° , $20,3^\circ$, $22,4^\circ$, $23,7^\circ$ e $28,4^\circ$ (AKBARI *et al.*, 2016). Quando se analisam as formulações, observa-se que as formulações N1 e N2 apresentam difratogramas bastante semelhantes entre si, assim como N3 e N4. Isso significa que a quantidade de fármaco adicionada influenciou os resultados da análise de DRX. Todas as formulações apresentaram os picos significativos do fármaco, porém, N1 e N2, com as menores quantidades de fármaco do planejamento experimental, apresentaram uma maior mudança para um perfil amorfo do que N3 e N4, quando comparadas ao naproxeno puro (NPX). Como já havia sido notado anteriormente, parte do fármaco sofre dissolução ou mistura física com a matriz polimérica, sendo esse fenômeno mais acentuado para formulações com menos fármaco e, mais ainda, para a formulação N2, que apresenta maior quantidade de alginato do que N1. Esse fato é evidenciado especialmente para o pico em $2\theta = 6,6^\circ$.

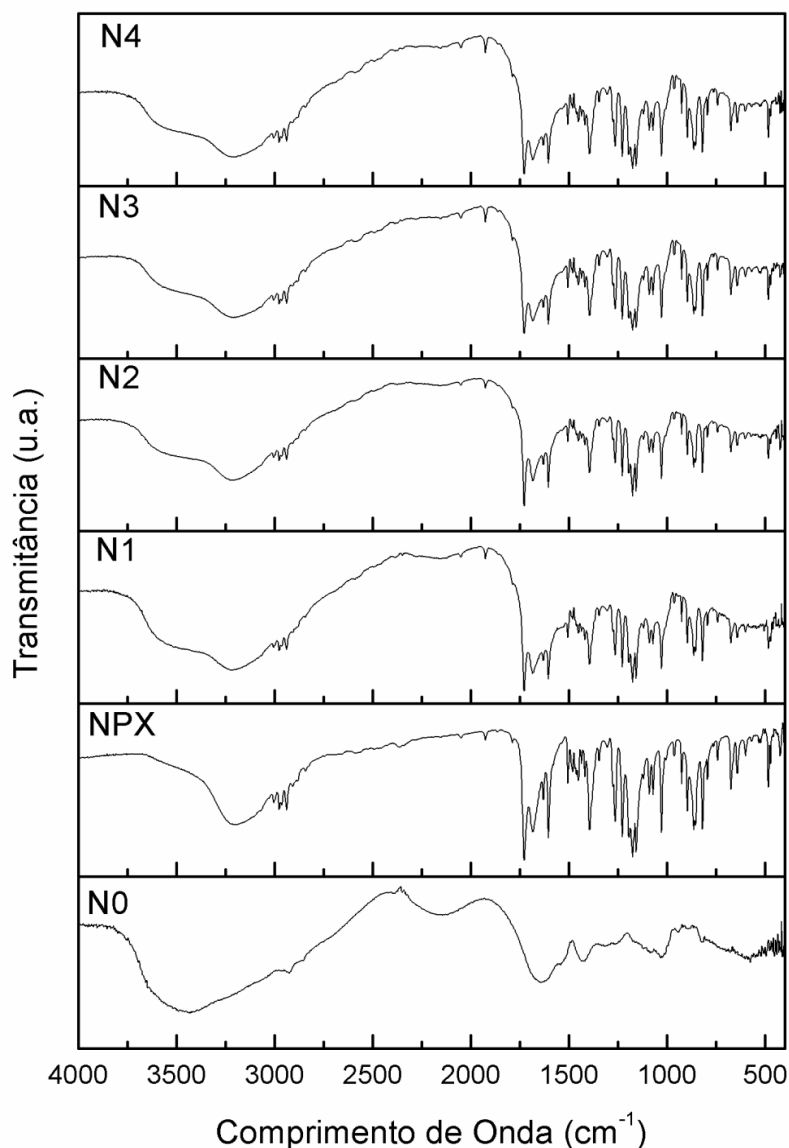
Comparando as intensidades dos picos cristalinos do naproxeno (Figura 72 (B)), mais uma vez os picos se tornaram bastante reduzidos nas formulações, em função da dissolução do fármaco na blenda, sugerindo que os cristalitos de fármaco se reduzem na matriz polimérica. Porém, as maiores reduções são observadas para as formulações N1 e N2, nas quais há um aumento da proporção de polímero para fármaco, resultado similar ao observado por Patnaik *et al.* (2018), que avaliaram a incorporação de naproxeno em matriz de PVP (polivinilpirrolidona).

4.2.7.2 Grupos funcionais

Para avaliar os grupos funcionais, foi realizada análise de FT-IR também sobre a formulação sem fármaco, sobre o naproxeno puro e sobre as formulações N1 – N4, uma

vez que as demais formulações do planejamento experimental ficaram bastante próximas às aqui apresentadas. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 73.

Figura 73 – Espectros obtidos por FT-IR para as formulações N1 – N4, para o naproxeno puro (NPX) e para a blenda de sericina e alginato (N0).



A formulação N0 apresenta as diversas bandas referentes aos grupos funcionais da sericina e do alginato. Em 3434 cm^{-1} há a forte banda referente ao estiramento O – H de hidroxilas, a qual coincide com a banda na faixa de $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$, referente ao alongamento N – H das amidas A e B da sericina, podendo ainda ser originária da presença de umidade. Em 2921 cm^{-1} encontra-se uma banda do estiramento C – H de grupos alquila e em 1640 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico e simétrico das carboxilas. Em relação à estrutura secundária da sericina, há a ocorrência do pico em 1640

cm^{-1} , indicativo de estruturas de bobinas aleatórias e solúveis (TERAMOTO; KAMEDA; TAMADA, 2008). A reticulação do alginato se confirma pela presença do pico em 1032 cm^{-1} , seguido de outro em 1078 cm^{-1} .

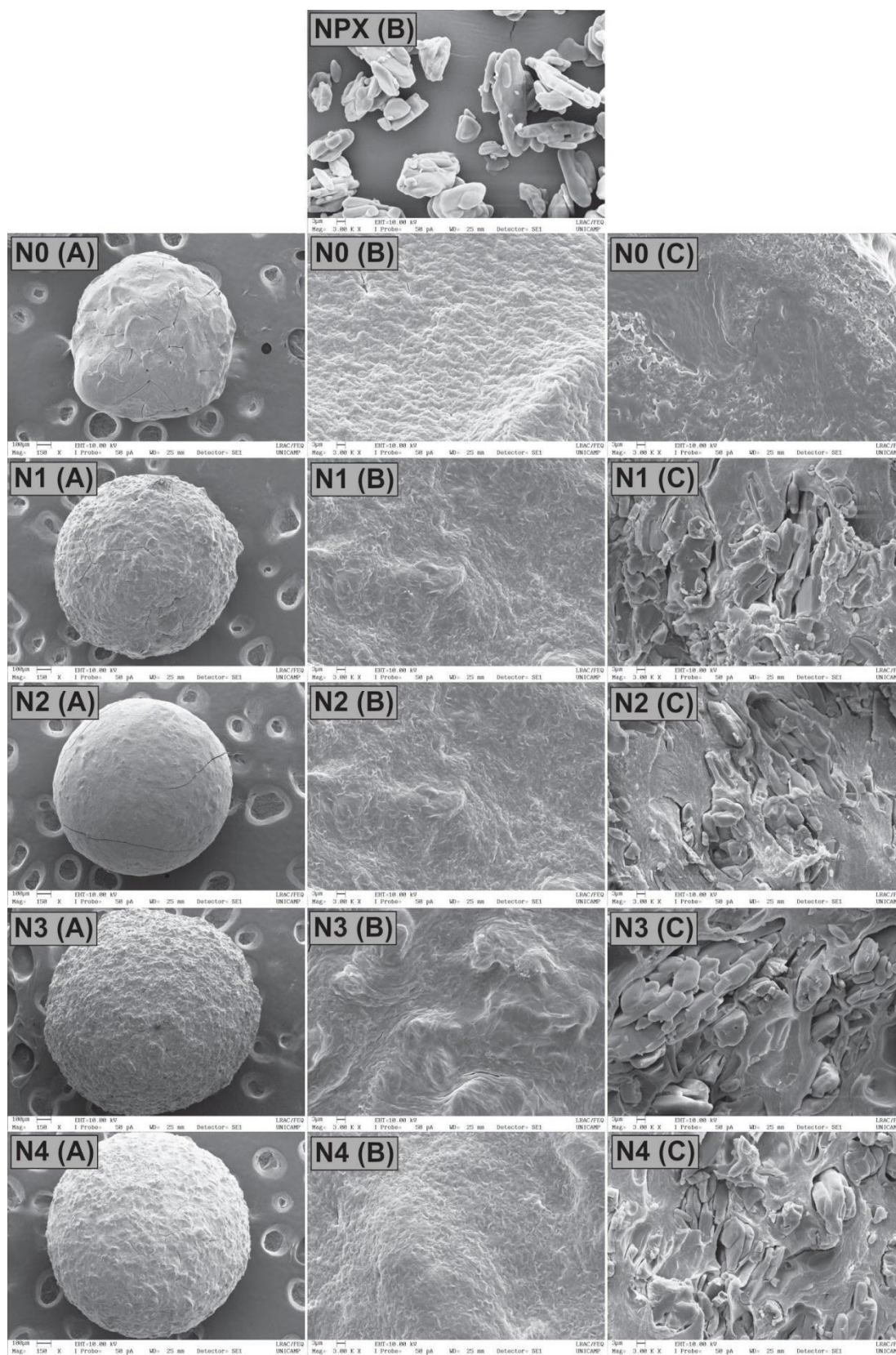
Analisando então o espectro do naproxeno (NPX), diversos picos referentes aos diferentes grupos funcionais presentes em sua estrutura podem ser identificados. Em 3208 cm^{-1} a banda ampla se refere ao estiramento O – H, e em 2975 cm^{-1} e 2938 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico e simétrico – CH_3 . O estiramento C = O do grupo carboxílico é representado pelas bandas em 1728 cm^{-1} e 1684 cm^{-1} e na faixa de $1630 - 1453 \text{ cm}^{-1}$ são observadas diversas bandas referentes ao estiramento C – C dos grupos aromáticos. A função éter é representada por bandas em 1029 e 864 cm^{-1} , do estiramento C – O – C, e em 1176 cm^{-1} do estiramento C – O –.

Nas formulações N1 – N4, todos os picos identificados para o fármaco puro puderam ser novamente visualizados, com ampliação da banda referente às hidroxilas em função da superposição das bandas do fármaco e da blenda polimérica. Isso confirma que o fármaco foi incorporado em sua forma original, apesar de parte dele ter se misturado à blenda, conforme resultado da análise de DRX. Uma das principais mudanças que se observa é na região das amidas II ($1504 - 1582 \text{ cm}^{-1}$) e III ($1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$) (CASTRILLÓN *et al.*, 2018), em que as bandas que haviam aparecido em N0 não aparecem no espectro de nenhuma das formulações, indicando participação desses grupos funcionais na incorporação do fármaco. Das bandas identificadas em N0, apenas aquela em 1420 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico das carboxilas, se repete nas formulações N1 – N4, mostrando que esse grupo não participa do aprisionamento do naproxeno.

4.2.7.3 Análise morfológica

Na Figura 74 são apresentadas as micrografias obtidas por MEV para a blenda de sericina e alginato, para o fármaco naproxeno puro e para as formulações N1 – N4. Não foram apresentadas as demais formulações em função da semelhança com as anteriores.

Figura 74 – Micrografias obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), o naproxeno (NPX) e as formulações N1 – N4, da superfície externa em ampliação de (A) 150x e (B) 3000x e (C) do corte da seção transversal em ampliação de 3000x.



Analisando as micrografias identificadas pela letra (A), com ampliação de 150x, nota-se que N0 é a que apresenta superfície mais homogênea e com alguns pequenos furos, possivelmente em função do próprio processo de reticulação e formação da blenda. As demais apresentam maior rugosidade justamente pela presença do fármaco no interior dessas partículas, sendo essa rugosidade mais evidente nas formulações N1 e N3, com as menores quantidades de alginato. É possível concluir que o aumento desse componente contribui para conter esse fármaco no interior da partícula, dificultando sua dissolução conforme já havia sido observado nos ensaios de dissolução *in vitro* de N2 e N4.

Na ampliação de 3000x (Figura 74 (B)), observa-se que a partícula N0 apresenta uma superfície um pouco mais rugosa, com a formação de estruturas em camadas. Ao adicionar o fármaco, em N1 – N4 confirma-se que ele não está presente na superfície e que ele contribui para tornar a superfície mais homogênea na maior ampliação. Isso evidencia que a maior rugosidade a 150x é decorrente apenas da presença dos cristais de fármaco. Em N1 e N3, confirmando o que se observou anteriormente, é possível observar deformações na superfície pela presença do fármaco internamente.

Ao se observar as superfícies internas das partículas (Figura 74 (C)), a formulação N0 apresenta maior homogeneidade do que havia sido observado externamente, possivelmente porque no interior das partículas atingiu-se um grau de reticulação mais elevado, quando comparado à superfície externa. Nas partículas N1 – N4 observa-se a presença dos cristais de naproxeno semelhante ao observado na micrografia do fármaco puro (NPX), levando à conclusão de que ele foi incorporado em sua forma original e corroborando os resultados das análises de DRX e FT-IR.

4.2.7.4 Diâmetro de partículas e distribuição de tamanho

A partir da técnica de microscopia ótica foram obtidas micrografias das partículas com ampliação de 10x. Determinou-se o diâmetro médio de 500 partículas de cada formulação e as distribuições de tamanhos, sendo o modelo de Gauss ajustado aos dados da frequência relativa da distribuição. Na Figura 75 são apresentados os perfis de distribuição e na Tabela 19 se apresentam os diâmetros médios e os valores de R^2_{aj} obtidos do ajuste de Gauss.

Figura 75 – Distribuições de tamanhos obtidas para as formulações N1 – N7.

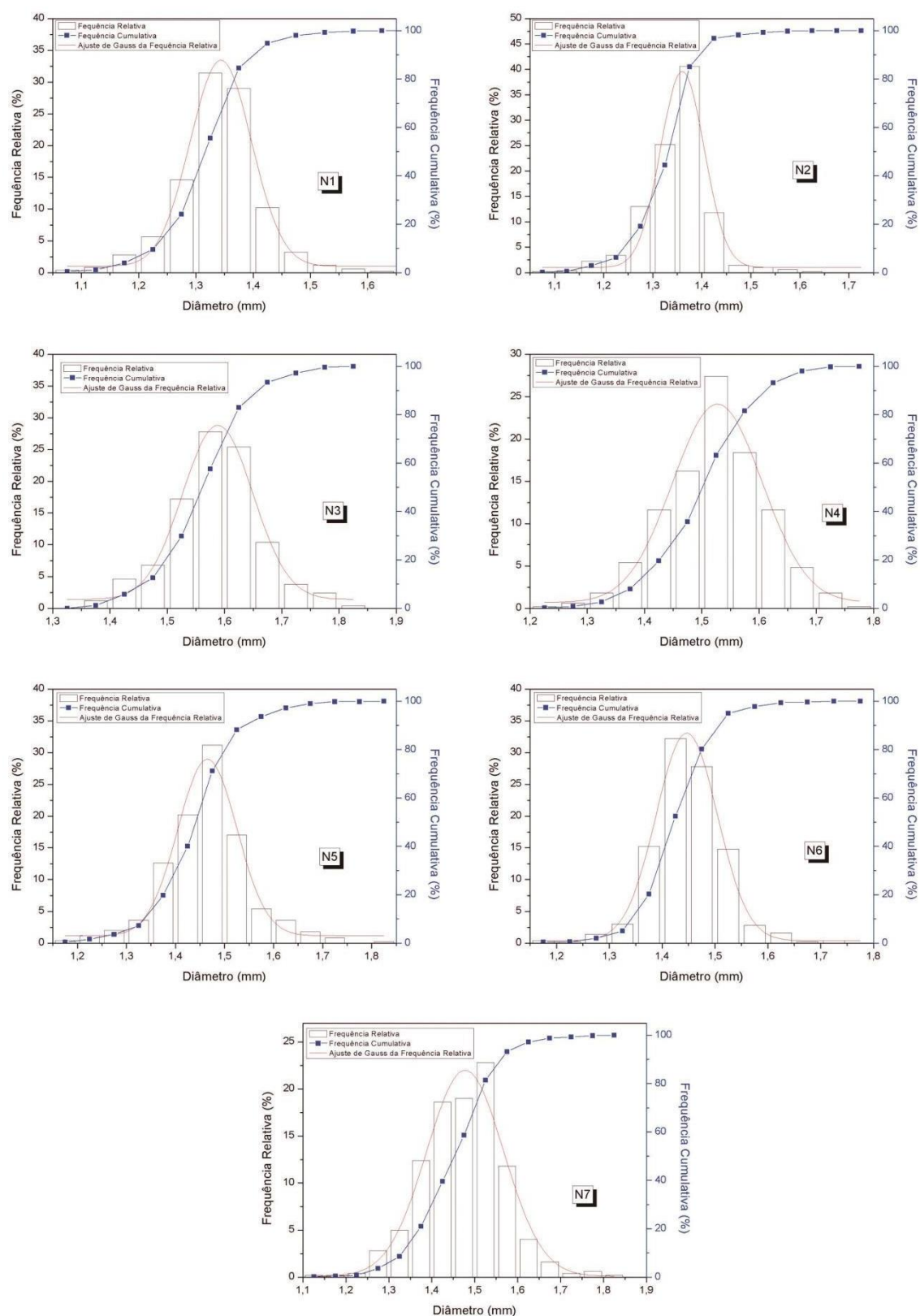


Tabela 19 – Diâmetro médio das partículas e R^2_{aj} do ajuste de Gauss para as formulações N1 – N7.

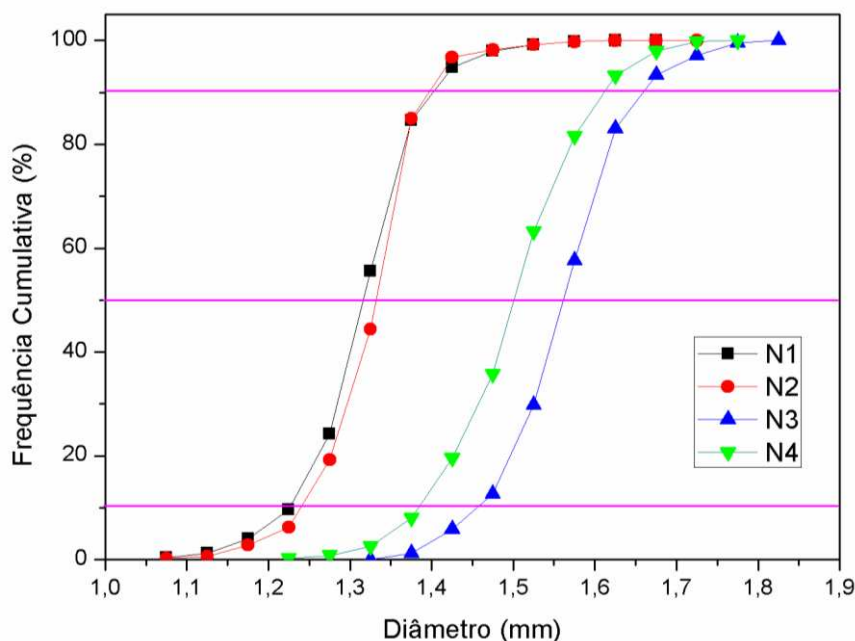
Formulação	Diâmetro Médio (mm)	R^2_{aj}
N1	$1,34 \pm 0,07^a$	0,990
N2	$1,35 \pm 0,07^a$	0,948
N3	$1,58 \pm 0,08^b$	0,983
N4	$1,53 \pm 0,09^{a,b}$	0,955
N5	$1,47 \pm 0,09^{a,b}$	0,965
N6	$1,45 \pm 0,07^{a,b}$	0,992
N7	$1,47 \pm 0,09^{a,b}$	0,961

As partículas de naproxeno apresentaram diâmetro médio na faixa de $1,34 \pm 0,07$ – $1,58 \pm 0,08$ mm, tamanho que é adequado para aplicação em sistemas multiparticulados. Pelo teste estatístico de comparação de médias de Tukey, com 95% de confiança, apenas a formulação N3 apresentou tamanho diferente das formulações N1 e N2. Os demais conjuntos de valores (N1 e N2 com o restante e N3 com o restante) apresentaram semelhança estatística (indicada pelos sobrescritos iguais na Tabela 19). Como já constatado nas micrografias da análise de MEV, os valores de diâmetro foram influenciados pela quantidade de fármaco adicionado inicialmente, com os maiores diâmetros obtidos para as formulações N3 e N4. Não há nenhuma relação entre os tamanhos obtidos e o tempo de liberação do fármaco nesse caso, já que em N2 e N4 foram observados os maiores tempos de liberação.

Em relação ao ajuste de Gauss, pode-se observar que os ajustes menos adequados foram obtidos para formulações com maiores quantidades de alginato, possivelmente porque esse contribui para aumentar a viscosidade da solução e tornar as partículas menos esféricas e menos homogêneas. Apesar disso, os ajustes de Gauss de todas as formulações apresentaram bons ajustes, com valores de R^2_{aj} que ultrapassaram 0,9.

A partir dos perfis de frequência relativa da Figura 75, foram obtidos os parâmetros D10, D50 e D90 e, com eles, calculou-se o valor do *Span* (Eq. 16) das formulações N1 – N4, através dos perfis da Figura 76.

Figura 76 – Frequência cumulativa da distribuição de tamanhos das formulações N1 – N4.



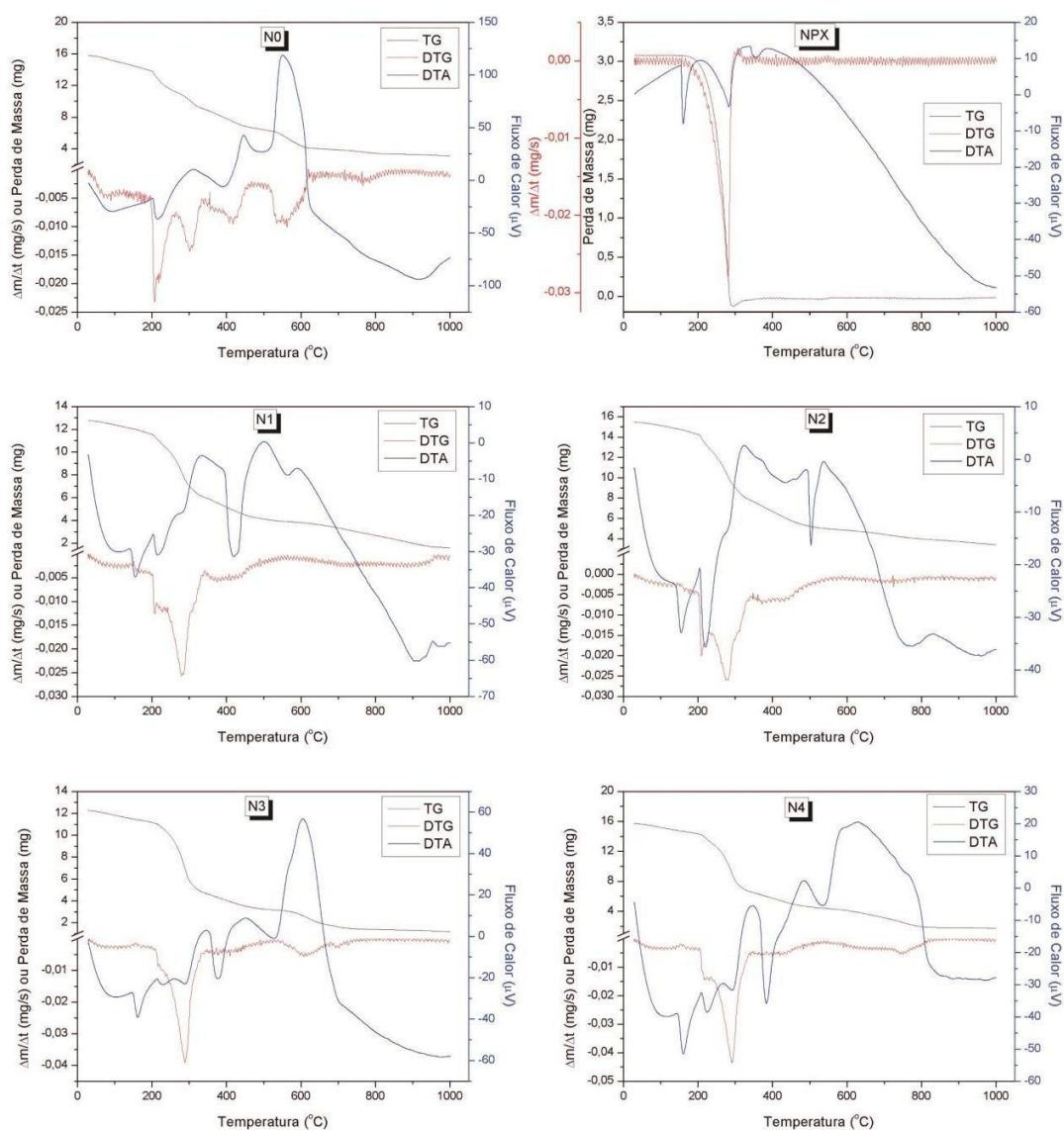
As formulações N1, N2, N3 e N4 apresentaram os seguintes valores de *Span*, nessa ordem: 0,141, 0,120, 0,131, 0,157. Observa-se que não há nenhuma tendência em relação às quantidades iniciais de alginato e naproxeno e a distribuição de tamanho. O maior *Span* é obtido para N4, seguido de N1, N3 e N2, respectivamente. No entanto, como já era de se esperar, N4 apresenta o maior valor para tal parâmetro em função da maior viscosidade da solução a ser gotejada, que contribui para a coalescência das partículas e, consequentemente, amplia a distribuição de tamanhos.

4.2.7.5 Análises térmicas

As análises térmicas de TG/DTG e DTA das formulações N1 – N4, do naproxeno puro e da blenda de sericina e alginato geraram os perfis apresentados na Figura 77. As curvas de TG/DTG da blenda de sericina e alginato (N0) apresentam uma pequena perda de massa abaixo de 100 °C, relacionada à perda de umidade, e que também é indicada por um pico endotérmico na curva de DTA. Após isso, na faixa de 200 – 600 °C, diversas perdas de massa são observadas em diferentes estágios, sendo as mais acentuadas em 200, 300, 400 e 550 °C. Esses eventos estão relacionados à decomposição da sericina e do alginato, observados na Figura 34. No caso da sericina, há a ocorrência da degradação de seus grupos laterais e clivagem das ligações peptídicas, enquanto no alginato as cadeias carbônicas se decompõem em Na₂CO₃ e material carbonizado, sendo esse último degradado de forma lenta acima de 600 °C. Na curva de DTA, os picos exotérmicos observados nas

elevadas temperaturas se associam às decomposições dos componentes da blenda (quando há perda de massa associada) e, como nenhum pico está associado à não perda de massa, isso significa que quando compõe a blenda, a sericina não recristaliza estruturas de bobinas aleatórias em folhas- β , conforme ocorreu para a sericina pura.

Figura 77 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), para o naproxeno puro (NPX) e para as formulações N1 – N4.

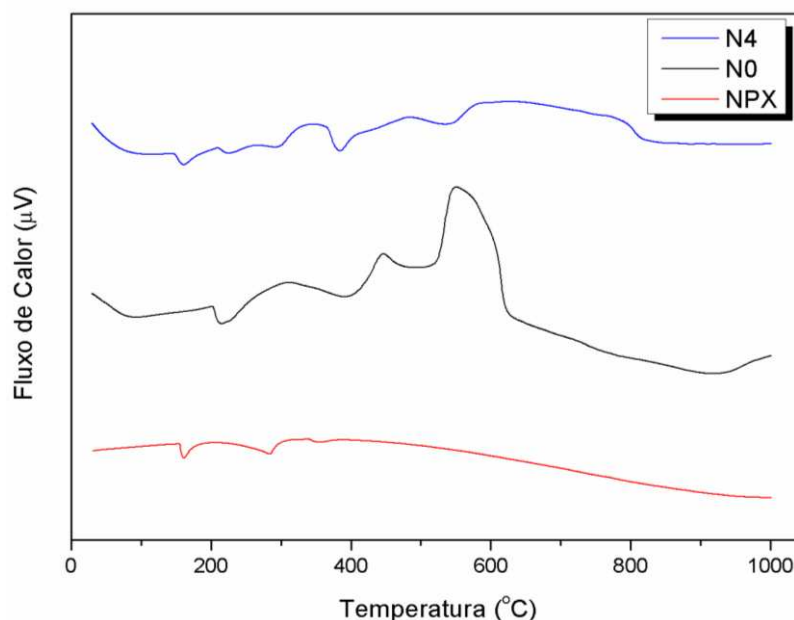


As curvas de TG/DTG do naproxeno (NPX) indicam perda de massa em uma única etapa, entre 180 – 320 °C, com pico em 280 °C. Na curva de DTA, se observam dois picos acentuados: o primeiro em 160 °C, referente à fusão do fármaco, e o segundo em 280 °C, referente à sua degradação e associado à perda de massa observada anteriormente.

Ao analisar as formulações N1 – N4, observam-se comportamentos semelhantes para as curvas de TG/DTG, com pequenas perdas de massa referentes à umidade próximas a 100 °C, seguidas de duas perdas mais significativas, entre 200 – 300 °C. Isso está associado à degradação do fármaco, mas também à decomposição da blenda de sericina e alginato. As demais perdas significativas de N0, a 400 e 550 °C se tornam menos pronunciadas nas formulações e, em alguns casos, até deixam de acontecer, indicando a maior estabilidade. As curvas de DTA de N1 – N4 apresentam algumas semelhanças, com destaque para a fusão do naproxeno próxima a 160 °C e os picos endotérmicos associados à degradação dos componentes dessas formulações abaixo de 300 °C. Apenas em N3 e N4, com as maiores quantidades de fármaco adicionadas, observaram-se os eventos exotérmicos acima de 400 °C em função da degradação dos subprodutos da decomposição da blenda.

Para avaliar a compatibilidade entre a blenda de sericina e alginato e o naproxeno, plotaram-se as curvas de DTA obtidas para N0, NPX e N4 (Figura 78).

Figura 78 – Curvas de DTA obtidas para a blenda de sericina e alginato (N0), para o fármaco puro (NPX) e para a formulação N4.



Pode-se observar que no perfil de N4 há uma sobreposição das curvas individuais obtidas para o fármaco e para a blenda, indicando que essa curva é uma soma dos eventos térmicos observados em NPX e N0. Sendo assim, pode-se assumir que não houve interação significativa do fármaco com a matriz polimérica em que foi incorporado, confirmando sua

compatibilidade. O principal evento térmico associado, a fusão do fármaco em cerca de 160 °C, se repete na formulação N4.

4.2.8 Análise geral da produção de partículas de naproxeno incorporado à blenda de sericina e alginato

Diante de todas as análises apresentadas para o planejamento experimental, visando à otimização da composição de partículas compostas pela blenda de sericina e alginato com naproxeno incorporado, observou-se que poucas variações foram obtidas. Apesar disso, foi possível obter uma tendência para os melhores resultados de eficiência de incorporação, carregamento e tempo de liberação, em função das maiores quantidades de alginato e de fármaco inicialmente adicionados. Foi possível obter uma nova forma farmacêutica com caráter gastrorresistente e tempo de liberação de cerca de 300 min, semelhante ao obtido para o cetoprofeno incorporado à mesma blenda e reticulado covalentemente pela proantocianidina, e para o diclofenaco de sódio incorporado na mesma blenda (VIDART *et al.*, 2018).

As técnicas analíticas aplicadas para caracterização demonstraram que a incorporação do naproxeno ocorreu em sua forma original, sem grandes mudanças em sua estrutura, além de ter apresentado compatibilidade com a matriz polimérica empregada. A melhor formulação obtida foi N4 (2,5% (m/V) de sericina, 2,8% (m/V) de alginato, 4,0% (m/V) de naproxeno).

4.2.9 Avaliação dos mecanismos de liberação do naproxeno: modelagem cinética

4.2.9.1 Ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de naproxeno

Os modelos cinéticos apresentados na Seção 2.3 – Farmacocinética foram ajustados aos dados de liberação da Figura 60 e da Figura 71, gerando os parâmetros para cada modelo e valores de R^2_{aj} e AIC para avaliação dos melhores ajustes, apresentados na Tabela 20 e Tabela 21, respectivamente. Em negrito se destacam os maiores valores de R^2_{aj} e os menores valores de AIC, representativos dos melhores ajustes.

Tabela 20 – Parâmetros dos modelos, R^2_{aj} e AIC obtidos a partir da modelagem cinética, para as formulações NPVA, NDSP, NPEG, NSER e NALG.

Modelo	Parâmetro	Formulações				
		NPVA	NDSP	NPEG	NSER	NALG
Ordem-zero	K_0	0,323	0,325	0,215	0,370	0,338
	R^2_{aj}	0,855	0,500	0,837	0,860	0,933
	AIC	89,40	81,27	69,63	79,48	68,71
Primeira-ordem	K_I	0,006	0,004	0,003	0,006	0,006
	R^2_{aj}	0,778	0,264	0,715	0,629	0,853
	AIC	90,66	85,10	74,90	95,05	74,46
Weibull	a	12849	12588	28753	434683	2150
	b	1,905	1,867	1,833	2,620	1,510
	T_d	144	157	271	142	161
	R^2_{aj}	0,977	0,609	0,942	0,996	0,981
	AIC	68,02	82,05	60,61	42,51	55,93
Higuchi	K_H	4,84	3,40	2,75	4,84	4,54
	R^2_{aj}	0,528	0,097	0,295	0,371	0,524
	AIC	100,35	89,26	85,89	95,05	87,48
Korsmeyer-Peppas	K_{KP}	0,005	1.10^{-9}	0,003	0,001	0,108
	n	2,29	4,79	1,79	2,35	1,27
	R^2_{aj}	0,993	0,933	0,958	0,978	0,916
	AIC	21,11	44,21	47,63	37,81	49,41
Hopfenberg; m = 2	k_2	0,003	0,002	0,001	0,003	0,002
	R^2_{aj}	0,885	0,361	0,785	0,785	0,934
	AIC	84,33	83,55	72,22	82,54	66,89
Hopfenberg; m = 3	k_3	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002
	R^2_{aj}	0,857	0,324	0,763	0,736	0,914
	AIC	86,31	84,12	73,14	84,45	69,42

Tabela 21 – Parâmetros obtidos da modelagem cinética para as formulações do planejamento experimental do naproxeno e valores de R^2_{aj} e de AIC para cada modelo ajustado.

Modelo	Parâmetro	Formulações						
		N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
Ordem-zero	K_0	0,662	0,382	0,525	0,367	0,538	0,478	0,511
	R^2_{aj}	0,755	0,838	0,862	0,839	0,849	0,838	0,853
	AIC	54,41	81,91	59,68	81,03	61,00	59,64	59,81
Primeira- ordem	K_1	0,008	0,007	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007
	R^2_{aj}	0,431	0,741	0,584	0,74	0,590	0,573	0,593
	AIC	60,61	83,51	68,05	83,07	68,26	67,21	67,50
Weibull	a	40236,8	21124,8	24287,7	31417,3	23909,8	29893,1	21545,6
	b	2,410	2,121	2,178	2,134	2,205	2,164	2,140
	T_d	81	109	103	128	97	117	106
	R^2_{aj}	0,989	0,990	0,991	0,985	0,987	0,988	0,987
	AIC	32,16	53,25	37,20	57,09	41,38	38,35	40,30
Higuchi	K_H	4,84	5,15	5,00	4,93	5,16	4,49	4,87
	R^2_{aj}	0,13	0,472	0,248	0,451	0,258	0,217	0,245
	AIC	66,25	92,24	75,18	92,12	75,30	74,57	74,82
Korsmeyer- Peppas	K_{KP}	0,018	0,007	0,015	0,005	0,017	0,007	0,013
	n	1,84	1,94	1,80	1,96	1,80	1,94	1,83
	R^2_{aj}	0,940	0,978	0,958	0,986	0,950	0,981	0,967
	AIC	39,99	30,52	36,17	27,18	56,84	29,68	34,20
Hopfenberg; m = 2	k_2	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
	R^2_{aj}	0,583	0,864	0,744	0,856	0,748	0,719	0,745
	AIC	58,17	77,88	64,17	77,96	64,45	63,84	63,80
Hopfenberg; m = 3	k_3	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
	R^2_{aj}	0,528	0,830	0,691	0,824	0,697	0,670	0,695
	AIC	59,10	79,71	65,63	79,58	65,85	65,09	65,17

4.2.9.2 Análise dos resultados de ajuste dos modelos matemáticos aos dados de liberação das formulações de naproxeno

Observa-se da Tabela 20 que a formulação NDSP, que apresentou o perfil de liberação mais distinto das demais (Figura 60), não foi bem ajustada por praticamente nenhum modelo, com exceção ao de Korsmeyer-Peppas. Possivelmente isso ocorreu porque esse modelo está ligado à relaxação das cadeias ($n > 0,85$) pela transição da matriz polimérica de um estado semirrígido para um estado mais flexível, após o contato com a solução de dissolução (FREIRE *et al.*, 2017). O DSP, como mencionado anteriormente, não tem afinidade pelo meio tampão, impedindo que outros mecanismos atuem nessa

formulação. Assim, como único meio de liberação, a solução penetra as partículas de forma lenta e, conseqüentemente, ocorre a saída do fármaco.

Como mencionado anteriormente, os modelos de ordem zero e primeira ordem são empregados para fornecer informações sobre a cinética da liberação, enquanto os demais modelos aplicados permitem obter informação sobre o mecanismo que envolve essa liberação (CHIME; ONUNKWO; ONYISHI, 2013). Analisando-se os valores de R^2_{aj} e AIC, observa-se que, em geral, independente da formulação, o modelo de ordem zero, característico de sistemas com liberação controlada (Figura 50), descreveu melhor a cinética de liberação do naproxeno. Nesse caso, considera-se que a forma farmacêutica não se desintegra e permite a liberação de forma lenta, liberando a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, até atingir o equilíbrio da dissolução. Trata-se do método de liberação ideal para quando se deseja atingir uma liberação prolongada, sendo um modelo amplamente empregado para descrever a dissolução a partir de diversas formas de liberação modificada (COSTA; LOBO, 2001). Em relação às formulações do planejamento experimental, nota-se que as constantes de liberação de ordem zero, K_0 , apresentam um resultado esperado, com as formulações N2 e N4 apresentando os menores valores de K_0 , corroborando com sua liberação mais lenta, em comparação às demais formulações.

No que se refere aos mecanismos envolvidos na liberação, todas as formulações analisadas, com exceção da NDSP já explicada anteriormente, foram mais bem ajustadas pelos modelos de Korsmeyer-Peppas e de Weibull. A partir de seus parâmetros de $n > 0,85$ e $b > 1,0$, respectivamente, pode-se afirmar que um mecanismo complexo está associado à liberação do naproxeno, incluindo a liberação de Super Caso II, que envolve o intumescimento e relaxação das cadeias poliméricas para liberação do fármaco (GHOSAL; RAY, 2011; PAPADOPOULOU *et al.*, 2006). Além disso, no que se refere especificamente às formulações N2 e N4, que apresentaram a liberação mais prolongada, observou-se um bom ajuste do modelo de Hopfenberg ($m = 2$), o que indica que o prolongamento da liberação do naproxeno foi possível também devido ao mecanismo de erosão da matriz polimérica (CHIME; ONUNKWO; ONYISHI, 2013).

Da Tabela 20, analisando-se o parâmetro T_d do modelo de Weibull, observa-se que o maior valor para esse parâmetro é atingido por NPEG. Porém, como sua curva não atingiu valor adequado no equilíbrio, seu parâmetro não pode ser comparado aos demais. Excluindo essa formulação, NALG obteve o maior T_d dentre as demais, confirmando a

influência do alginato na prolongação da liberação, seguida por NDSP, a qual já havia demonstrado o melhor aprisionamento do fármaco no meio tampão, porém sem característica gastrorresistente. Da Tabela 21, N4 é a formulação que apresenta maior valor de T_d , confirmando sua característica de liberação prolongada diante das demais.

O modelo de Higuchi apresentou o ajuste menos satisfatório para todas as formulações, o que evidencia que a difusão não atua na liberação do fármaco a partir da blenda de sericina e alginato (KALEEMULLAH *et al.*, 2017). A explicação para o ajuste não satisfatório desse modelo para o presente caso e para todos os demais apresentados nessa tese pode estar em determinadas hipóteses assumidas por ele. De acordo com esse modelo, o fármaco está distribuído de forma homogênea dentro da matriz e a matriz não pode intumescer durante a liberação de fármaco. Porém, o que se observa para a blenda em questão é exatamente o contrário: o fármaco não se distribui de forma homogênea, como observado principalmente pelas micrografias obtidas por MEV, e também são partículas sujeitas ao intumescimento ao entrar em contato com o meio de dissolução, fato observado visualmente durante os ensaios e confirmado pelos bons ajustes do modelo de Korsmeyer-Peppas (PATEL *et al.*, 2016).

Esse resultado também foi obtido por outros autores, como Medina *et al.* (2015), que avaliaram a liberação de naproxeno a partir de materiais de sílica mesoporosa. Os melhores ajustes também foram obtidos para os modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull, em detrimento do modelo de Higuchi.

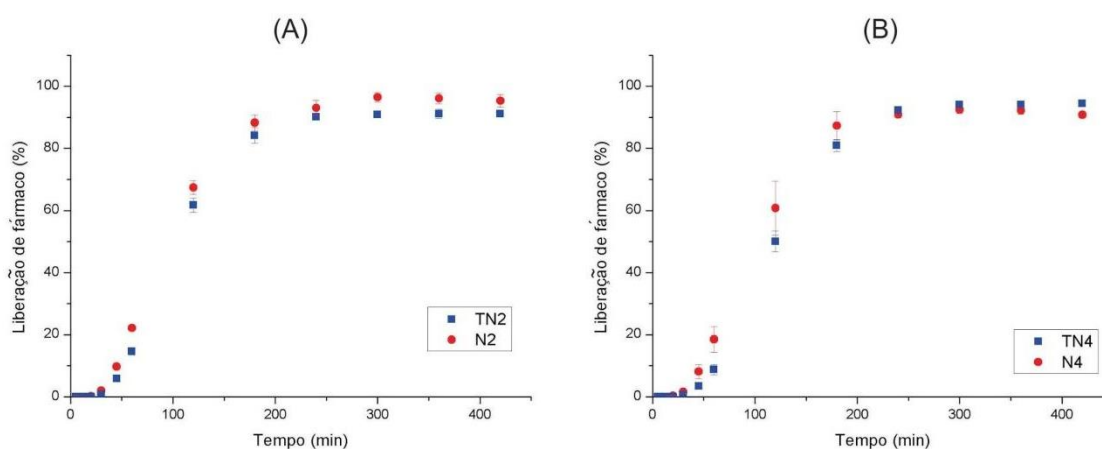
Comparando-se os resultados obtidos com aqueles do fármaco cetoprofeno, observa-se que o naproxeno é liberado de forma mais prolongada do que o anterior, mesmo quando incorporado somente à blenda de sericina e alginato. A justificativa pode estar em suas fórmulas estruturais, as quais apresentam como principal diferença a presença de uma função éter no naproxeno e de uma função cetona no cetoprofeno. Éteres são pouco polares e, em geral, pouco reativos. Já a carbonila da cetona é fortemente reativa e polar, sujeita especialmente a reações de adição nucleofílica. Assim, é possível que o cetoprofeno, ao entrar em contato com a solução tampão, foi rapidamente liberado por sua atração pelo solvente polar (água). No caso do naproxeno, parte de sua estrutura sendo caracterizada como pouco polar, indica menor atração pelo solvente polar, atrasando sua liberação (KOTZ; TREICHEL; TOWNSEND, 2011).

4.2.10 Avaliação do processo de reticulação térmica: ensaios de liberação *in vitro*

Como mencionado anteriormente, o processo de reticulação térmica é uma das técnicas de reticulação existentes para aprimorar as características de uma matriz polimérica. Assim como realizado para o cetoprofeno, as duas melhores formulações de naproxeno, em termos de dissolução *in vitro* (N2 e N4), foram submetidas ao processo de reticulação térmica, ou seja, à secagem controlada em duas etapas sequenciais a 40 °C e a 100 °C, durando 24 h cada uma.

O resultado avaliado nessa fase foi a dissolução *in vitro* em tampão pH 7,4, uma vez que o processo de reticulação térmica não afeta a variável eficiência de incorporação ou carregamento, pois não há a adição ou destruição de qualquer componente das partículas. Na Figura 79 são apresentados os perfis de dissolução das formulações N2 e N4 em comparação com as respectivas formulações submetidas à secagem, TN2 e TN4.

Figura 79 – Curvas de dissolução *in vitro* em tampão pH 7,4 das formulações (A) N2 e TN2, (B) N4 e TN4.



Observa-se, na Figura 79, que o processo de reticulação térmica não contribuiu para retardar a liberação das formulações de naproxeno, como havia ocorrido com o cetoprofeno incorporado somente à blenda de sericina e alginato. Possivelmente, o efeito da secagem foi mais pronunciado no cetoprofeno pela presença do grupo funcional cetona. Esse grupo é mais polar do que o grupo funcional éter do naproxeno. Assim, ele é capaz de atrair para si maior quantidade de água e, portanto, está mais sujeito às mudanças estruturais causadas pela eliminação dessa água durante a reticulação térmica, ficando disponível para formar novas ligações de hidrogênio.

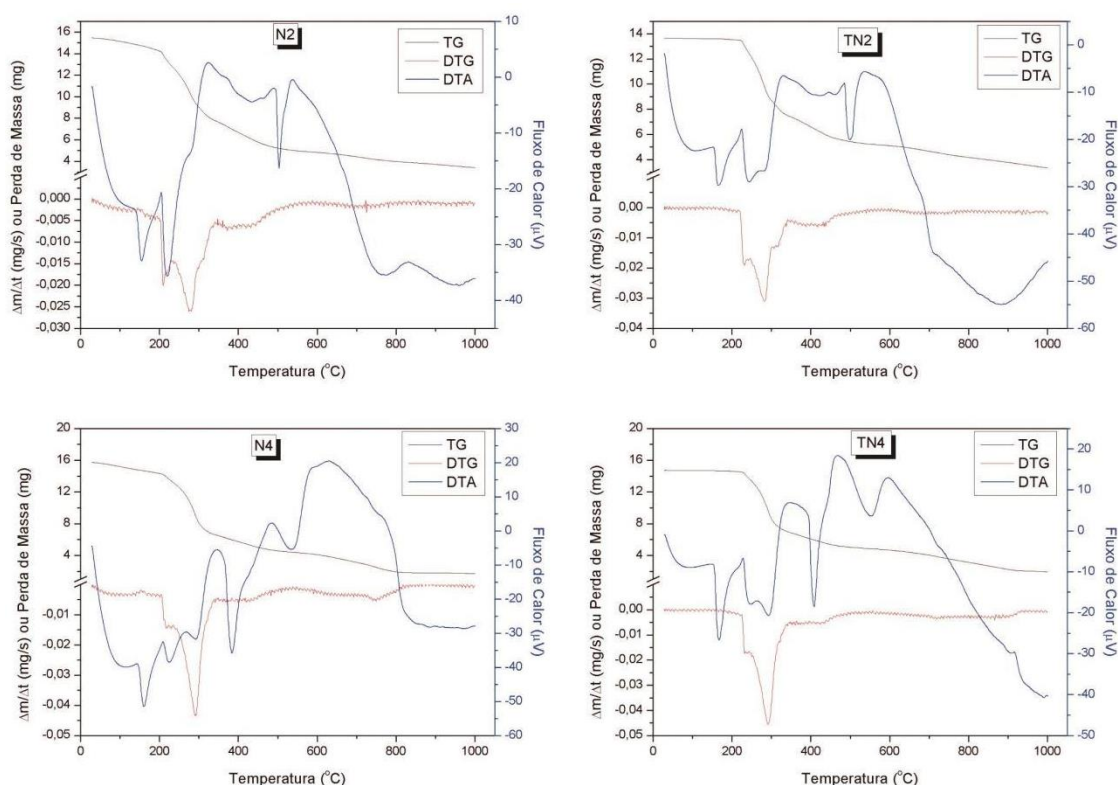
No caso do naproxeno, a função éter forma entre si forças do tipo dipolo-dipolo. Quando na presença de água, é capaz de realizar ligações de hidrogênio com ela, apesar de possuir menor atração por esse solvente. Assim, quando a água é eliminada durante o processo de secagem, o grupo funcional não fica disponível para novas ligações intramoleculares em função das forças já existentes dentro dele, levando a poucas mudanças antes e após a reticulação térmica.

4.2.11 Caracterização das partículas de naproxeno obtidas por reticulação térmica

4.2.11.1 Análises térmicas

Para avaliar o efeito do processo de reticulação térmica sobre as partículas, foram obtidas as curvas de TG/DTG e DTA das formulações TN2 e TN4, apresentadas na Figura 80, em comparação com as curvas que haviam sido obtidas para N2 e N4.

Figura 80 – Curvas de TG/DTG e DTA obtidas para as formulações TN2 e TN4 e comparação com as curvas de N2 e N4.



Como já era de se esperar e já havia sido observado para o cetoprofeno, aqui também a reticulação térmica foi efetiva na remoção da umidade das partículas, já que a perda de massa observada anteriormente abaixo de 100 °C, não aconteceu nas formulações

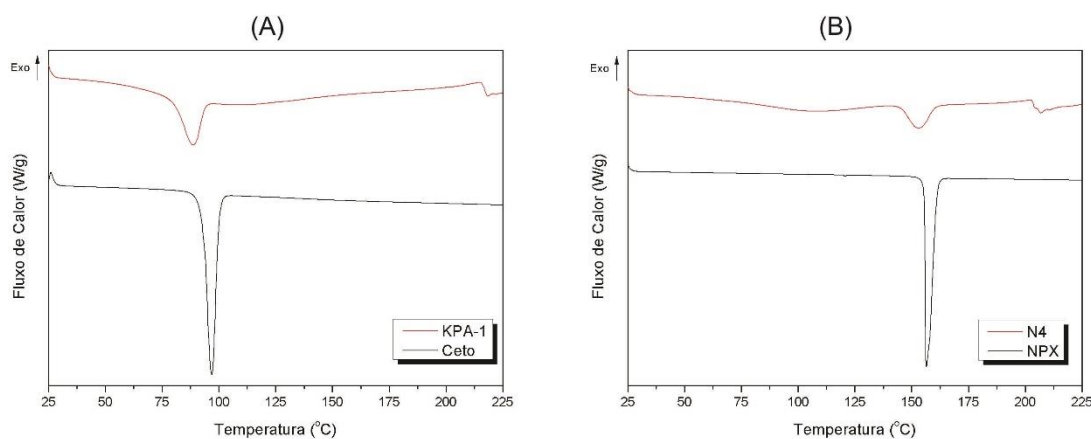
TN2 e TN4. Com exceção dessa etapa, as demais perdas observadas na faixa de 200 – 300 °C, em função da decomposição ou degradação dos componentes das formulações, se repetem, mesmo após a secagem das partículas, evidenciando que sua estrutura não foi significativamente alterada. Os eventos térmicos da curva de DTA também se repetiram, mas em diferentes intensidades, sendo predominantes os eventos endotérmicos em N2 e TN2 e, em N4 e TN4, ocorrendo eventos exotérmicos em temperaturas acima de 450 °C. Isso significa que a reticulação térmica permitiu obter resultados similares no que se refere à estabilidade térmica das partículas.

4.3 Análises complementares das melhores formulações de cetoprofeno e naproxeno

4.3.1 Análises térmicas: calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia *hot-stage* (HSM)

Na Figura 81 é possível observar as curvas de DSC obtidas para os fármacos puros (Ceto e NPX) e para as melhores formulações de cada um deles (KPA-1 e N4).

Figura 81 – Curvas de DSC obtidas para (A) cetoprofeno puro (Ceto) e formulação KPA-1 e (B) naproxeno puro (NPX) e formulação N4.



Uma das informações que a análise de DSC fornece é a temperatura de transição vítrea (T_g), presente em estruturas amorfas que não sofrem fusão, e que caracteriza a transição de um estado vítreo (quebradiço) para um estado emborrachado (mais maleável) (ZAHARUDDIN; NOORDIN; KADIVAR, 2014). Tanto a sericina quanto o alginato apresentam estrutura amorfa, com temperaturas de transição vítrea esperadas próximo a 170 °C e 80,6 °C, respectivamente (NAKAMURA; MAGOSHI; MAGOSHI, 1993; SWAMY; RAMARAJ; SIDDARAMAIAH, 2010). Como observado nas análises de DRX,

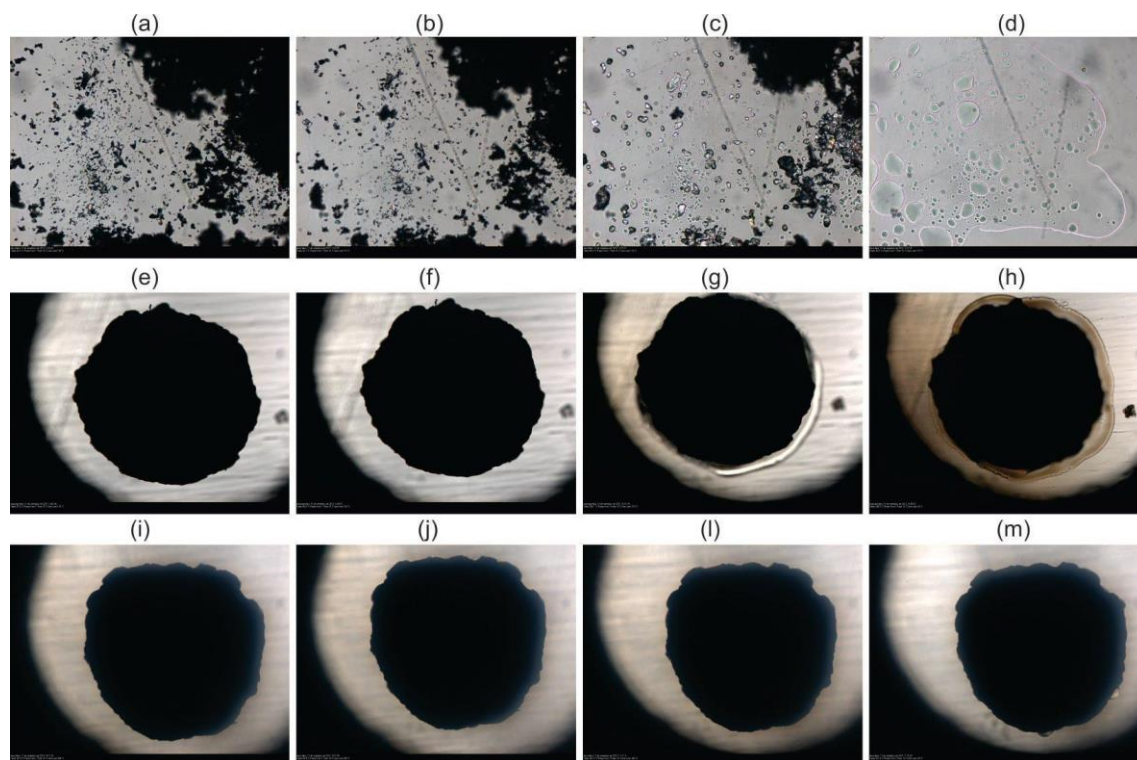
apesar da matriz proteica apresentar um caráter predominantemente amorfo, quando se incorporam os fármacos cetoprofeno e naproxeno, as formulações passam a apresentar característica predominantemente cristalina. Por essa razão, não se detectou o parâmetro T_g em nenhuma das formulações da Figura 81, mesmo nas temperaturas esperadas para os componentes da matriz.

Outra informação obtida da análise de DSC e que também já havia sido obtida nas análises de DTA, é a temperatura de fusão (T_m) das amostras em questão. Da Figura 81, para o cetoprofeno, o evento endotérmico da fusão ocorre a $T_m = 97,02\text{ °C}$ com o início da transição ocorrendo em $T_{onset} = 92,94\text{ °C}$ e o calor de transição de $98,60\text{ J/g}$, enquanto para o naproxeno, o evento endotérmico de fusão é observado em $T_m = 156,48\text{ °C}$, com início da transição em $T_{onset} = 155,43\text{ °C}$ e calor de transição de $143,17\text{ J/g}$. Nas formulações KPA-1 e N4 os valores de T_m dos fármacos se alteram para $88,65\text{ °C}$ e $153,12\text{ °C}$, respectivamente, confirmando que as moléculas de fármaco foram incorporadas majoritariamente em sua forma original de agregados cristalinos, sem apresentar grandes mudanças em sua estrutura para um estado amorfo ou dispersos molecularmente, conforme as análises de DRX já haviam evidenciado.

Além dos eventos da fusão, outros eventos endotérmicos podem ser visualizados nas curvas de DSC das formulações KPA-1 e N4. Uma banda ampla endotérmica em $108,47\text{ °C}$ na curva de N4 é equivalente à perda de água, e o fato de não ter aparecido em KPA-1 pode estar associado à proximidade com o ponto de fusão do fármaco. Além disso, em ambas as formulações há a ocorrência de um pico acima de 200 °C ($218,34\text{ °C}$ para KPA-1 e $206,81\text{ °C}$ para N4), associados às decomposições e degradações dos componentes da matriz polimérica, observadas também nas análises de TG/DTG e DTA. A inexistência de outros picos, diferentes do esperado para os componentes puros, indicam que não há interação química entre o fármaco e a matriz carregadora, confirmando sua compatibilidade.

Para visualizar o comportamento dos fármacos e das formulações diante do aumento da temperatura e confirmar as observações da análise de DSC, foi realizada Microscopia *Hot-Stage* (HSM), através da qual se obtém micrografias das partículas diante do controle da temperatura. Na Figura 82 são apresentadas imagens obtidas para o cetoprofeno e para uma partícula da formulação KPA-1 em corte da seção transversal e uma partícula da formulação KPA-1 inteira, em diferentes temperaturas.

Figura 82: Micrografias obtidas por HSM para (a – d) cetoprofeno puro em ampliação de 20x, para (e – h) o corte da seção transversal de KPA-1 e para (i – m) KPA-1 em ampliação de 10x, nas temperaturas de (a, e, i) 30 °C, (b) 92 °C, (c, f, j) 97 °C, (d) 100 °C, (g, l) 220 °C e (h,m) 250 °C.

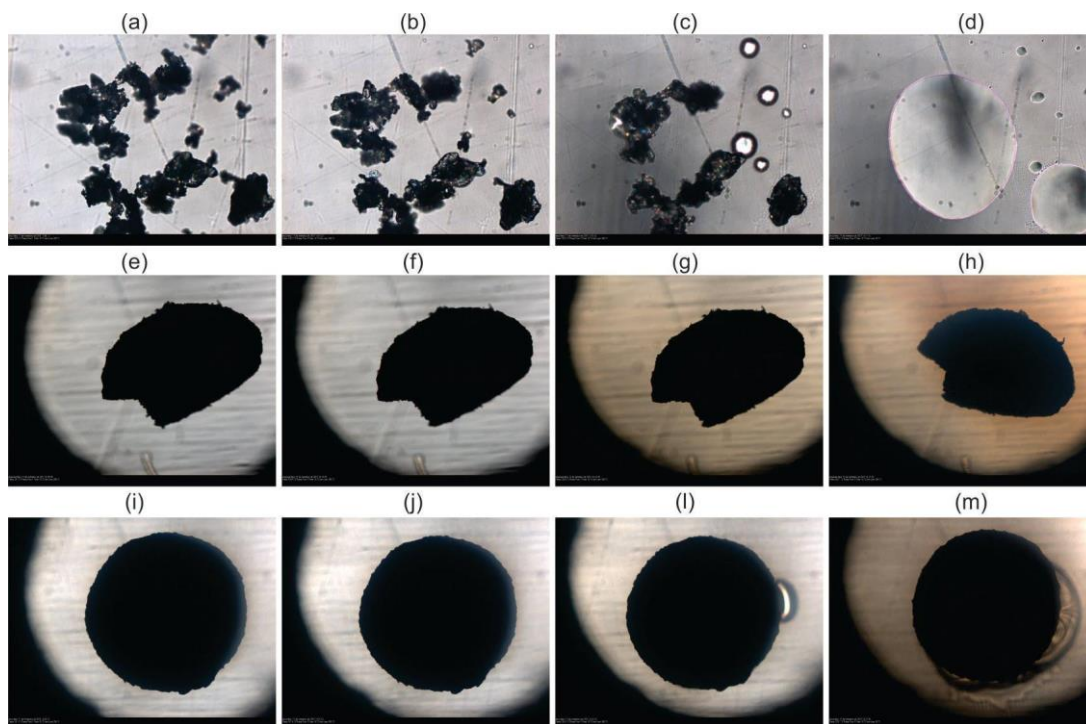


Pode-se observar na Figura 82 (a – d) o comportamento do fármaco puro diante do aumento da temperatura. Inicialmente, na temperatura ambiente (a), é possível observar os cristais de fármaco. Quando se atinge a T_{onset} do cetoprofeno, próximo a 92 °C (b), observa-se o início do processo de fusão, com a maior mudança observada na T_m , em cerca de 97 °C (c). A 100 °C (d) o fármaco já está completamente fundido.

Analisando as partículas em corte e inteiras, não é possível observar o fenômeno de fusão do fármaco próximo a 97 °C (f, j) em nenhuma delas. De acordo com a análise de DSC, esse fenômeno deveria ser visualizado pelo menos no corte da partícula (f), porém a obtenção de imagens não permitiu sua observação. No caso da partícula inteira isso acontece porque o fármaco está aprisionado em seu interior, o que dificulta a visualização dessa transição do cetoprofeno. As demais micrografias (g, h, l, m) foram obtidas acima de 200 °C, e as mudanças observadas se referem à decomposição e degradação dos componentes da matriz polimérica (sericina, alginato e PA).

Na Figura 83 são apresentadas imagens obtidas para o naproxeno e para uma partícula da formulação N4 em corte da seção transversal e uma partícula da formulação N4 inteira, em diferentes temperaturas.

Figura 83: Micrografias obtidas por HSM para (a – d) naproxeno puro em ampliação de 20x, para (e – h) o corte da seção transversal de N4 e para (i – m) N4 em ampliação de 10x, nas temperaturas de (a, e, i) 30 °C, (b) 155 °C, (c, f, j) 158 °C, (d) 160 °C, (g, l) 220 °C e (h,m) 250 °C.



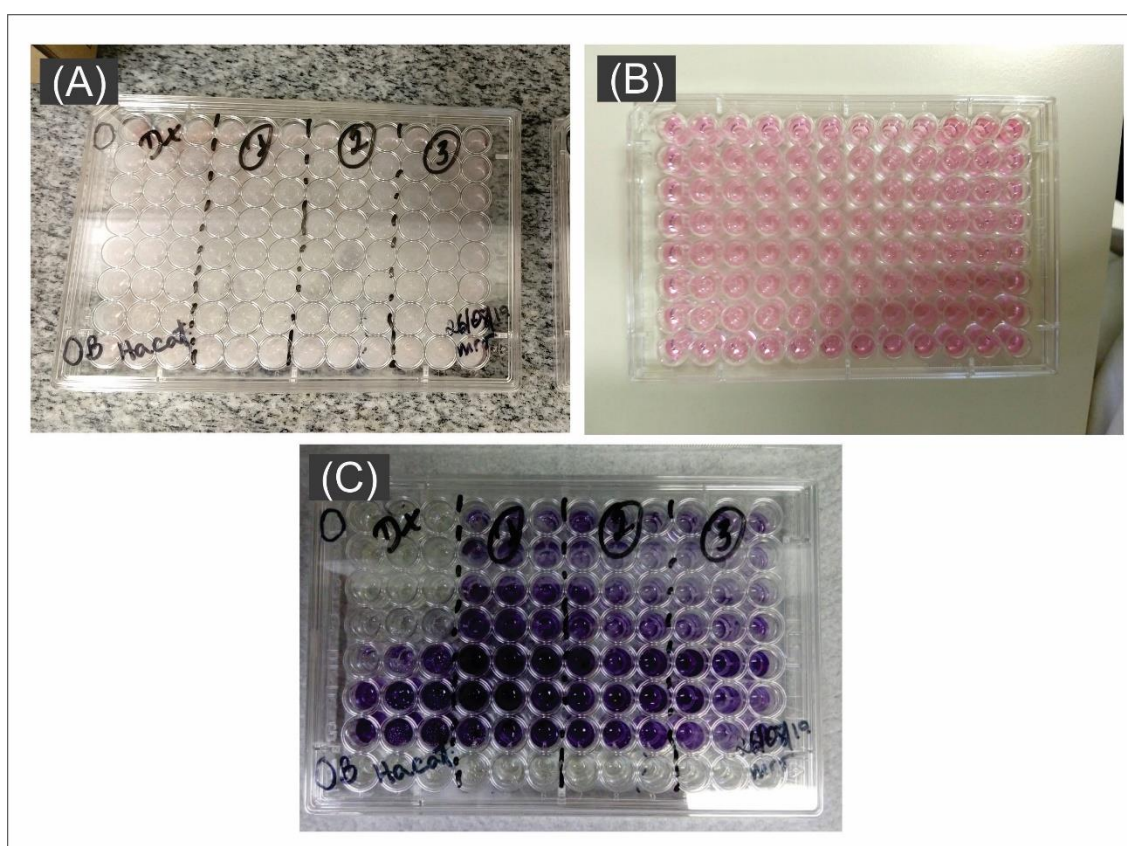
Na Figura 83 (a – d) observa-se o comportamento do fármaco (naproxeno) diante do aumento de temperatura. Na temperatura ambiente (a) são visualizados os cristais de fármaco. Próximo a 155 °C (b) há o início da fusão do fármaco, com maior ênfase próxima a 158 °C (c) e a 160 °C (d) a transição já finalizada, com o fármaco completamente fundido.

O fenômeno de fusão do naproxeno também não pôde ser observado nem no corte da formulação N4 (f) nem na partícula inteira (j), possivelmente pela dificuldade em se obter imagens mais claras do fármaco no interior da partícula e por ele se apresentar aprisionado no interior, respectivamente. Acima de 200 °C (g, h, l, m) as decomposições e degradações dos componentes da matriz só puderam ser visualizados para as partículas inteiras, possivelmente porque os produtos da degradação ficaram escondidos pela partícula analisada, não sendo possível observá-los.

4.3.2 Estudo de citotoxicidade e viabilidade celular

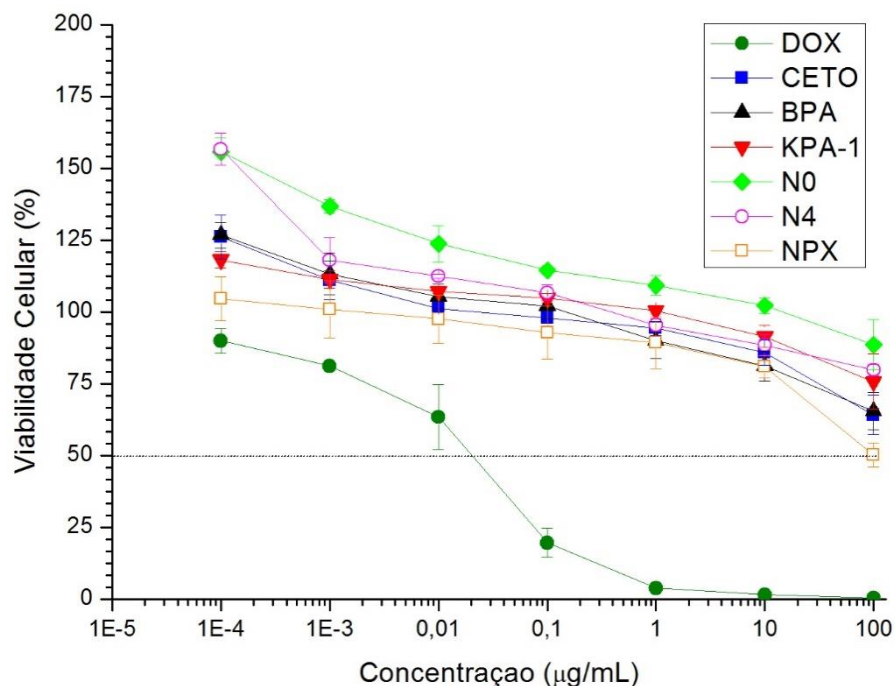
A Figura 84 apresenta as placas para cultura de células, fechadas e abertas, após a etapa de incubação de 72 horas, já com as linhagens de células HaCaT (queratinócito humano transformadas) em contato com as amostras analisadas, além das placas após a adição do MTT com a coloração arroxeadada, característica da conversão do sal tetrazolium em formazan.

Figura 84 – Imagens das placas para cultura de células empregadas no ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade após 72 horas de incubação, sendo (A) placas fechadas, (B) placas abertas para demonstração e (C) placas após a adição do MTT.



Da Figura 84 (C), é possível observar que alguns dos poços não apresentaram a coloração arroxeadada, que seria indicativa da presença de células viáveis. Para confirmar o resultado observado, foi calculada a viabilidade celular para cada amostra. O perfil de viabilidade celular para as diferentes concentrações dos fármacos puros cetoprofeno (CETO) e naproxeno (NPX), de suas respectivas formulações, KPA-1 e N4, e das correspondentes formulações sem fármaco (BPA e N0), além do controle positivo cloridrato de doxorrubicina (DX na Figura 84 (C)), são apresentados na Figura 85.

Figura 85 – Viabilidade celular, obtida a partir do ensaio MTT, de células em contato com o controle positivo cloridrato de doxorubicina (DOX), os fármacos puros cetoprofeno (CETO) e naproxeno (NPX), as formulações KPA-1 e N4 e as respectivas formulações sem fármaco, BPA e N0.



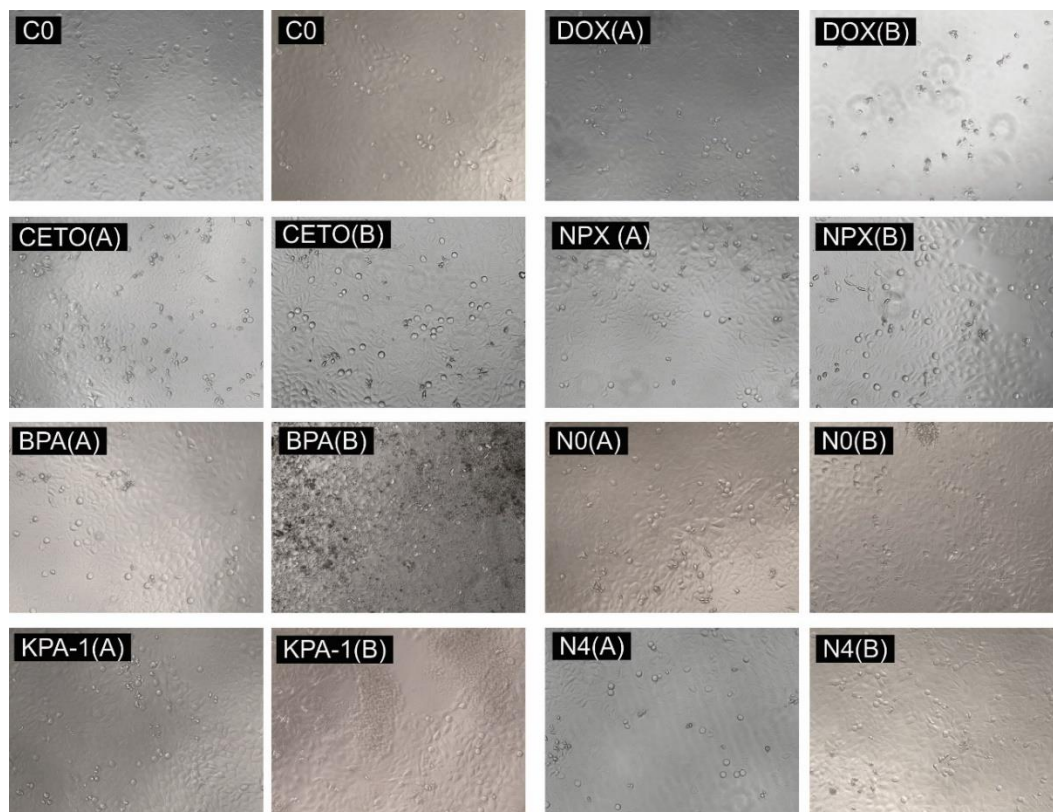
Pode-se observar que a maioria das curvas da Figura 85 apresentaram valores de viabilidade celular acima de 100%, o que significa que a viabilidade celular das células em contato com as amostras foi maior do que a do controle negativo. Isso é algo que pode ocorrer em resultados de ensaio de MTT e pode ser explicado por algumas razões. Esse ensaio depende da redução mitocondrial para conversão do tetrazolium em formazan. Assume-se que essa conversão depende do número de células viáveis, porém é possível que o contato das células com as amostras resulte em aumento da atividade enzimática, sem necessariamente afetar a viabilidade celular. Outra possibilidade é que tenha havido influência das variações naturais do metabolismo, já que o controle negativo é obtido apenas pela incubação de células no meio, ou ainda que o contato com as amostras tenha estimulado a proliferação das células HaCaT. Resultados similares foram reportados por Ossowicz *et al.* (2020) e Poradowski; Obmińska-Mrukowicz (2019) para o cetoprofeno e por Karami *et al.* (2016) para o naproxeno, com valores de viabilidade celular ultrapassando 100%.

A partir dos dados da Figura 85, pode-se determinar o parâmetro IC_{50} , que se refere à concentração da amostra que causa 50% de inibição do crescimento celular, sendo considerada nesse caso citotóxica (NOVOHRADSKY *et al.*, 2014). Pode-se observar que, para o controle positivo cloridrato de doxorrubicina, o valor de IC_{50} foi de $0,037 \pm 0,029 \mu\text{g/mL}$, ou seja, em concentrações acima desse valor, a viabilidade celular encontra-se abaixo de 50% e, portanto, é considerada a ocorrência de citotoxicidade por parte da substância analisada. Para todas as demais amostras analisadas, $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$, indicando que nenhuma delas alterou o perfil de viabilidade celular da linhagem de células HaCaT, confirmando a biocompatibilidade *in vitro* das formas farmacêuticas desenvolvidas no presente trabalho, para células de HaCat, na faixa de concentrações avaliadas.

Resultados similares foram obtidos em estudos anteriores que avaliaram partículas compostas pelos mesmos polímeros avaliados nesse trabalho. Martins *et al.* (2015) avaliaram a citotoxicidade e viabilidade celular de linhagens de células cancerígenas Caco-2 e de células saudáveis VERO, pelo contato com partículas de quitosana/alginato, com ou sem nanopartículas de ouro encapsuladas. Ambas as partículas apresentaram boa biocompatibilidade com ambas as linhagens analisadas, sendo que as partículas com nanopartículas de ouro encapsuladas apresentaram uma pequena toxicidade às linhagens avaliadas. Das; Dey; Kundu (2014) avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de sericina sobre linhagem de células de fibroblastos de ratos, obtendo que não houve inibição significativa do crescimento celular de acordo com o ensaio MTT. Sendo assim, confirma-se o bom resultado obtido nessa tese, de que matrizes de sericina e alginato são biocompatíveis e, portanto, podem ser adequadas ao uso humano, necessitando posteriormente de ensaios *in vivo* para confirmar os resultados obtidos *in vitro*.

A título de ilustração, a partir da placa da Figura 84 (B) foram obtidas também micrografias em ampliação de 50x, em microscópio invertido, para visualizar a presença ou ausência das células após o contato com as amostras. As micrografias obtidas para os fármacos puros cetoprofeno (CETO) e naproxeno (NPX), para suas respectivas formulações, KPA-1 e N4, para suas formulações sem fármaco (BPA e N0), para o controle positivo cloridrato de doxorrubicina e para o controle negativo (células sem adição de nada) são apresentadas na Figura 86.

Figura 86 - Micrografias em ampliação de 50x após a incubação de HACAT em contato com cetoprofeno (CETO), naproxeno (NPX), formulações KPA-1 e N4, formulações sem fármaco (BPA e N0), para o controle positivo cloridrato de doxorrubicina (DOX) e para o controle negativo (C0), nas concentrações (A) 0,0001 $\mu\text{g/mL}$ e (B) 100 $\mu\text{g/mL}$.



Pode-se observar, das micrografias da Figura 86, a presença de células viáveis na maior parte delas, especialmente ao fazer a comparação com o controle negativo (C0). No caso específico de DOX, na maior concentração, Coluna (B), as células estão mortas, o que confirma a ausência de coloração arroxeada em alguns poços da imagem da Figura 84 (C). Além disso, em algumas micrografias das formulações contendo a blenda, observa-se a presença de manchas escuras, referentes à matriz polimérica que não se dissolveu completamente no PBS. Essa pode ser outra razão para a elevada viabilidade celular observada na Figura 85 (> 100%). A presença desses resíduos da matriz pode ter causado interferência na leitura da absorbância, gerando valores maiores do que os observados somente para as células.

4.4 Resumo geral dos resultados obtidos

A etapa de incorporação do cetoprofeno, desenvolvida através de planejamento experimental, indicou que apenas a quantidade de cetoprofeno teve influência significativa

sobre a variável carregamento. Apesar disso, observaram-se as maiores eficiências para menores quantidades de alginato e os maiores carregamentos para menores quantidades de alginato e maiores quantidades de fármaco. A eficiência de incorporação do cetoprofeno variou na faixa de $74,96 \pm 0,55\%$ a $91,19 \pm 0,41\%$ e o carregamento na faixa de $20,54 \pm 0,15\%$ a $40,25 \pm 0,23\%$. Foi produzida uma formulação somente com alginato, que apresentou eficiência de incorporação inferior ($66,07 \pm 0,75\%$), o que demonstra a importância da sericina para incorporação do cetoprofeno.

A liberação *in vitro* do cetoprofeno foi realizada diretamente em tampão fosfato (pH 6,8) e verificou-se que o maior tempo de liberação foi obtido para a formulação somente com alginato, o que indica que esse polímero é o responsável pela prolongação da liberação do cetoprofeno. Em relação às formulações do planejamento, os maiores tempos de liberação ocorreram para as maiores quantidades de fármaco. Baseado nesses dados, pode-se concluir que a formulação K3 (2,5% m/V de sericina, 2,0% m/V de alginato e 4,0% m/V de cetoprofeno) foi a melhor formulação desenvolvida, apresentando-se como uma nova forma farmacêutica ao ser comparada, inclusive, com a forma comercial Profenid® Entérico.

A formulação K3 atingiu o equilíbrio da dissolução em apenas 180 min. Sendo assim, foi proposta a adição de um agente reticulante covalente visando aprimorar a liberação, obtendo o melhor resultado pela adição da PA. A formulação com menor quantidade de PA (KPA-1) indicou os melhores resultados, com eficiência de incorporação de $91,11 \pm 0,53\%$ e carregamento de $40,49 \pm 0,24\%$, além da característica gastrorresistente e o maior tempo de equilíbrio na liberação *in vitro* (~300 min). Portanto, a melhor formulação para incorporação do cetoprofeno foi KPA-1 (2,5% m/V de sericina, 2,0% m/V de alginato, 4,0% m/V de cetoprofeno, 0,5% m/V de PA).

Os modelos matemáticos foram ajustados aos dados de liberação *in vitro*, com a formulação K3 apresentando cinética de ordem zero, em que se atinge uma concentração de fármaco constante no plasma sanguíneo, e a formulação KPA-1 apresentando cinética de primeira ordem, característica de formas de liberação sustentada. Em relação aos mecanismos de liberação, ambas indicaram um mecanismo de liberação complexo, envolvendo mais de um mecanismo, a saber, inchamento e relaxação da matriz, além de erosão.

Com os resultados das melhores formulações de cetoprofeno (K3 e KPA-1), foi realizado ainda o processo de reticulação térmica, avaliado através de ensaios de dissolução *in vitro*. Como resultado, observou-se a alteração da característica gastrorresistente da formulação KPA-1, além do equilíbrio ter sido atingido em um tempo menor após a reticulação térmica. No caso da formulação K3, observou-se um aumento do tempo de liberação após a reticulação térmica. Logo, esse não é um processo interessante para a incorporação do fármaco em questão.

Foram realizadas análises de DRX, FT-IR, MEV, MO e TG/DTG e DTA para caracterizar as formulações obtidas. Amostras da blenda e da blenda reticulada com PA foram caracterizadas por DRX e FT-IR, para comparação com a mistura física dos mesmos componentes. Observou-se redução da cristalinidade após a formação da blenda, com ou sem o agente reticulante, evidenciando a compatibilidade entre os polímeros componentes dessa formulação. Além disso, observou-se que as estruturas secundárias de folhas- β da sericina foram transformadas em bobinas aleatórias, após a formação da blenda, o que é interessante para aplicação farmacêutica, uma vez que essa é uma forma mais solúvel e pode permitir a liberação gradual de fármaco. Em relação às formulações obtidas, foi mantida a característica cristalina do fármaco, porém com intensidade reduzida. Os grupos funcionais do fármaco foram preservados em todas as formulações, indicando que não ocorre uma forte interação desse componente com os polímeros da blenda. A análise de MEV demonstrou a incorporação do fármaco na forma de cristais e evidenciou sua presença no interior das partículas. As partículas de cetoprofeno, incluindo aquelas com PA, tiveram diâmetros médios na faixa de $0,88 \pm 0,10 - 1,47 \pm 0,09$ mm, o que é adequado para aplicação em sistemas multiparticulados. Termicamente, os eventos associados aos componentes das partículas foram observados, como a fusão do fármaco (90 – 130 °C) e a decomposição e degradação dos componentes poliméricos e do cetoprofeno acima de 200 °C. Sendo assim, confirmou-se a compatibilidade e estabilidade do processo de incorporação.

As formulações K3 e KPA-1 e suas respectivas formulações reticuladas termicamente (TK3 e TKPA), também foram submetidas a ensaios de estabilidade acelerado e de longa duração, os quais indicaram que apenas KPA-1 manteve suas propriedades de liberação inicial, confirmando que a reticulação química pode colaborar com a efetividade da incorporação do fármaco, possibilitando atender requisitos para a aplicação farmacêutica, como qualidade, eficácia e segurança.

Em relação às formulações com naproxeno, foi realizada preliminarmente a avaliação da presença ou ausência de agentes reticulantes covalentes, tendo sido avaliados PVA, DSP e PEG, além de uma formulação só com alginato, obtendo-se eficiências de $73,07 \pm 4,13\%$ a $89,33 \pm 1,90\%$, com a menor eficiência obtida para NALG, confirmando a importância da sericina também na incorporação do naproxeno. Foram obtidos carregamentos de $18,14 \pm 0,67\%$ a $30,44 \pm 1,72\%$, diretamente influenciados pela fração de fármaco presente.

No que se refere à dissolução *in vitro*, a formulação NDSP foi a única que não apresentou gastrorresistência. Em meio entérico, a formulação NPVA apresentou valores de liberação acima de 100%, a NPEG atingiu o equilíbrio em 63% e a NALG equilibrou em 90%. Sendo assim, o melhor resultado foi obtido para NSER, com tempo de equilíbrio de 300 – 360 min e 98% de liberação do fármaco.

A partir desses resultados, realizou-se planejamento experimental para otimização da composição de partículas de sericina/alginato/naproxeno, variando-se as quantidades inicialmente adicionadas desses dois últimos componentes. As eficiências de incorporação foram obtidas na faixa de $73,24 \pm 7,78\%$ a $81,08 \pm 1,98\%$ e os carregamentos na faixa de $20,08 \pm 0,39\%$ a $34,47 \pm 3,66\%$. Estatisticamente, somente o carregamento foi influenciado pela quantidade de naproxeno. No entanto, notou-se que as maiores eficiências foram obtidas para conjuntos de menores ou de maiores quantidades de alginato/fármaco. Os maiores carregamentos foram obtidos para maiores quantidades de naproxeno e os maiores tempos de liberação foram obtidos para maiores quantidades de alginato. Assim, a melhor formulação obtida foi N4 (2,5% (m/V) de sericina, 2,8% (m/V) de alginato e 4,0% (m/V) de naproxeno). Uma formulação similar a ela, composta somente por alginato, demonstrou semelhança em termos de incorporação de fármaco, porém com menor tempo de liberação. No caso do naproxeno, a responsável por prolongar a liberação do fármaco foi a sericina.

Em relação à modelagem cinética, tanto para formulações com agentes reticulantes quanto para as do planejamento experimental, observou-se mecanismo de liberação complexo, envolvendo erosão e intumescimento da matriz polimérica. O modelo cinético de ordem zero foi o que melhor se ajustou aos dados, uma vez que esse é mais adequado para descrever sistemas de liberação controlada.

As análises de DRX, FT-IR, MEV, MO e TG/DTG e DTA confirmaram a incorporação do fármaco em todas as formulações. A cristalinidade do naproxeno se manteve, porém, em intensidades reduzidas. Os picos referentes aos grupos funcionais do fármaco foram replicados em todas as formulações, confirmando sua incorporação na forma original, com parte tendo se misturado fisicamente à matriz. As micrografias do MEV também demonstraram a presença dos cristais de fármaco internamente nas partículas. Foram obtidos diâmetros médios na faixa de $1,07 \pm 0,13 - 1,58 \pm 0,08$ mm, tamanhos adequados a sistemas multiparticulados. Termicamente, a fusão do fármaco foi mantida nas formulações (160 °C), além dos fenômenos de decomposição e degradação do fármaco e da matriz polimérica acima de 200 °C.

O processo de reticulação térmica aplicado às formulações N2 e N4, que foram as que apresentaram maior tempo de equilíbrio da dissolução, demonstrou não afetar a dissolução.

As melhores formulações do cetoprofeno e do naproxeno, KPA-1 e N4, respectivamente, foram submetidas a análises complementares de DSC e Microscopia *Hot-Stage*. A partir delas foi possível confirmar a ocorrência da fusão dos fármacos puros, já observada nas análises de DTA. Além disso, verificou-se que as partículas mantêm o fármaco aprisionado mesmo após sua fusão e que apenas após a temperatura de decomposição e degradação de seus componentes é possível visualizar tais fenômenos. Sobre essas mesmas formulações também foi realizado estudo de viabilidade celular e citotoxicidade, o qual indicou que as formas farmacêuticas desenvolvidas não são citotóxicas, apresentando biocompatibilidade e, portanto, sendo adequadas para o uso humano de acordo com testes *in vitro*.

5 CONCLUSÕES

Na presente tese foi proposto o desenvolvimento de partículas a base de sericina e alginato para incorporação dos fármacos cetoprofeno e naproxeno, visando obter novas formas farmacêuticas, de liberação retardada e prolongada. O objetivo geral dessa tese foi atingido, haja vista que novas formas farmacêuticas foram obtidas para cada fármaco, com alta taxa de carregamento ($40,49 \pm 0,24\%$ para o cetoprofeno e $33,41 \pm 0,66\%$ para o naproxeno), estabilidade físico-química comprovada por meio das técnicas analíticas de DRX, FT-IR e análises térmicas, empregadas para caracterização das partículas com e sem fármaco, e nenhuma toxicidade comprovada em células de linhagem HaCaT, na faixa de concentração de $100 - 0,0001 \mu\text{g/mL}$ de células. Além disso, foram atingidos os equilíbrios das liberações em cerca de 300 min para ambos os fármacos avaliados e também foram comprovadas a compatibilidade entre o fármaco e a matriz polimérica empregada, sem a ocorrência de grandes interações entre eles, e a obtenção de partículas com tamanho adequado a sistemas multiparticulados. No caso do cetoprofeno, a sericina demonstrou atuar positivamente sobre sua incorporação, enquanto no caso do naproxeno, a sericina colaborou com a prolongação de sua liberação.

Assim, pode-se concluir que o sistema matricial composto pela blenda de sericina e alginato é interessante à incorporação dos fármacos anti-inflamatórios cetoprofeno e naproxeno, tendo sido demonstrada a necessidade da reticulação para atender os objetivos pretendidos no caso do cetoprofeno. Essa necessidade pode ser em função da maior afinidade do grupo éter do naproxeno pelos grupos funcionais da matriz polimérica, o que não ocorre com o grupo cetona do cetoprofeno, necessitando de um agente extra para aprimorar sua incorporação. A blenda em questão demonstrou capacidade de erodir e intumescer na presença dos fluidos simuladores do meio gastrointestinal, permitindo a liberação do fármaco incorporado, tornando-se objeto de interesse para sistemas de liberação controlada. Além disso, se mostrou não citotóxica, se adequando a possibilidade de uso em organismos humanos.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Visando a continuidade dos estudos desenvolvidos nesta tese, sugerem-se como possíveis trabalhos futuros a realização de:

- Modificação da blenda para incorporação do cetoprofeno e do naproxeno, visando prolongar ainda mais a liberação;
- Avaliação da eliminação dos efeitos colaterais do cetoprofeno e do naproxeno após a incorporação na blenda de sericina e alginato;
- Avaliação de outros agentes reticulantes covalentes naturais;
- Incorporação de outros fármacos que apresentem efeitos colaterais ou problemas na liberação;
- Realização do ensaio de estabilidade das formulações com naproxeno;
- Diminuição dos tamanhos das partículas desenvolvidas para encapsular em cápsulas gelatinosas ou na forma de comprimidos;
- Realizar ensaios *in vivo* para confirmar a biocompatibilidade observada nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade celular.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA

7.1 Patentes e Registros

FREITAS, E.D., SILVA, T. L., VIDART, J. M. M., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A. Processo de obtenção de partículas gastrorresistentes, partículas gastrorresistentes e seu uso. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170182622, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 25/08/2017. Instituição financiadora: FAPESP.

BEZERRA, I. C. S., FREITAS, E. D., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A. Processo de desenvolvimento de partículas gastrorresistentes para incorporação e liberação modificada de furosemida, partículas gastrorresistentes para incorporação e liberação modificada de furosemida e seu uso. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR132018076907, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/12/2018. Instituição financiadora: FAPESP.

7.2 Artigos Completos Publicados em Periódicos Internacionais

FREITAS, E. D.; LIMA, B. M.; ROSA, P. C. P.; DA SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A., Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked sericina/alginate blend for ketoprofen extended release. *Advanced Powder Technology*, v. 30, p. 1531-1543, 2019.

FREITAS, E. D.; ROSA, P. C. P.; DA SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A., Development of sericina/alginate beads of ketoprofen using experimental design: formulation and *in vitro* dissolution evaluation. *Powder Technology*, v. 335, p. 315-326, 2018.

FREITAS, E. D.; VIDART, J. M. M.; SILVA, E. A.; DA SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A., Development of mucoadhesive sericin/alginate particles loaded with ibuprofen for sustained drug delivery. *Particuology*, v. 41, p. 65-73, 2018.

FREITAS, E. D.; SILVA, R. B.; DELDOTTI, S. R.; MARZOLA, G. A.; SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A., Development and in-vitro Evaluation of the Extended Release Valsartan from Sericin and Alginate Beads. *Chemical Engineering Transactions*, v. 74, p. 1537-1542, 2019.

VIDART, J. M. M., FREITAS, E. D., NAKASHIMA, M., SANTOS, R. D. J., ROSA, P. C. P., GIMENES, M. L., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Evaluation of incorporation efficiency of drugs in sericina/alginate particles. *Chemical Engineering Transactions*, v. 57, p. 1429-1434, 2017.

7.3 Artigos Completos Submetidos em Periódicos Internacionais

FREITAS, E. D., FREITAS, V. M. S., ROSA, P. C. P., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Development and evaluation of naproxen-loaded sericin/alginate beads for delayed and extended drug release using different covalent crosslinking agents. Artigo submetido ao periódico *Materials Science and Engineering C*.

FREITAS, E. D., VIDART, J. M. M., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Thermal characterization and stability investigation of sericin and alginate blend loaded with diclofenac sodium or ibuprofen. Artigo submetido ao periódico *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.

7.4 Artigos Completos em Elaboração para Submissão em Periódicos Internacionais

FREITAS, E. D., ROSA, P. C. P., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Application of experimental design to evaluate the incorporation of naproxen into sericin/alginate particles prepared by ionic gelation technique.

7.5 Artigos Completos Publicados em Anais de Congressos

FREITAS, E. D., FREITAS, V. M. S., COSTA, M. C., ROSA, P. C. P., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Partículas de sericina e alginato incorporadas com cetoprofeno submetidas à reticulação térmica: liberação *in vitro* e modelagem. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 2019, Belém.

SANTINON, C., FREITAS, E. D., VIEIRA, M. G. A., SILVA, M. G. C., Avaliação da eficiência de incorporação de antibióticos em partículas de sericina e alginato. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 2019, Belém.

FREITAS, V. M. S., FREITAS, E. D., ROSA, P. C. P., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Avaliação do processo de reticulação térmica sobre a incorporação de cetoprofeno em partículas de sericina e alginato. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2019, Uberlândia.

FREITAS, E. D., BEZERRA, I. C. S., SANTOS, R. D. J., ROSA, P. C. P., SILVA, M. G. C., VIEIRA, M. G. A., Avaliação da eficiência de incorporação de fármacos em partículas de blenda de sericina e alginato. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 2017, Maringá.

SANTOS, R. D. J.; FREITAS, E. D.; ROSA, P. C. P.; SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A., Eficiência de incorporação de cetoprofeno em partículas desenvolvidas a partir da blenda de sericina e alginato. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2017, São Carlos. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2017. p. 66-71.

7.6 Resumos Expandidos Publicados em Anais de Congressos

FREITAS, V. M. S., FREITAS, E. D., VIEIRA, M. G. A., Otimização da composição de partículas de sericina e alginato para incorporação de naproxeno. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2019. Campinas-SP.

LIMA, B. M., FREITAS, E. D., VIEIRA, M. G. A., Desenvolvimento de partículas a partir da blenda de sericina e alginato para incorporação de fármaco anti-inflamatório. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2018. Campinas-SP.

PINTO, I. C. G., LOPES, J. C., REIS, L. A., COSTA, C. S. D., FREITAS, E. D., VIEIRA, M. G. A., Extração de alginato da *Sargassum filipendula* para remoção de metais tóxicos e preparação de micropartículas de blenda de sericina/alginato comercial para aplicação farmacêutica. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2018. Campinas-SP.

SANTOS, R. J., FREITAS, E. D., VIEIRA, M. G. A., Eficiência de incorporação de fármaco gastrorresistentes em partículas desenvolvidas a partir de blenda de sericina e alginato. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2017. Campinas-SP:Galoá, 2017.

MARZOLA, G. A., DA SILVA, R. B., DELDOTTI, S. R., FREITAS, E. D., VIDART, J. M. M., VIEIRA, M. G. A., Preparação e caracterização de micropartículas de blenda de sericina-alginato para aplicação farmacêutica. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2017. Campinas-SP:Galoá, 2017.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M H; SAMMOUR, O A; EL-GHAMRY, H A; EL-NAHAS, H M; BARAKAT, W. Development and characterization of controlled release ketoprofen microspheres. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, n. 3, p. 60–67, 2012.

ABDELGHANY, S; PARUMASIVAM, T; PANG, A; ROEDIGER, B; TANG, P; JAHN, K; BRITTON, W J; CHAN, H K. Alginate modified-PLGA nanoparticles entrapping amikacin and moxifloxacin as a novel host-directed therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 52, n. December 2018, p. 642–651, 2019.

AKBARI, J; SAEEDI, M; MORTEZA-SEMNANI, K; ROSTAMKALAEI, S S; ASADI, M; ASARE-ADDO, K; NOKHODCHI, A. The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 145, p. 626–633, 2016.

AKDUMAN, C; ÖZGÜNEY, I; KUMBASAR, E P A. Preparation and characterization of naproxen-loaded electrospun thermoplastic polyurethane nanofibers as a drug delivery system. *Materials Science and Engineering C*, v. 64, p. 383–390, 2016.

AL-TAHAMI, K A. Preparation, characterization, and in vitro release of ketoprofen loaded alginate microspheres. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, v. 6, n. 3, p. 9–12, 2014.

ALTMAN, G H; DIAZ, F; JAKUBA, C; CALABRO, T; HORAN, R L; CHEN, J; LU, H; RICHMOND, J; KAPLAN, D L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, v. 24, p. 401–416, 2003.

ANDRADE, C. Sustained-release, extended-release, and other time-release formulations in neuropsychiatry. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 76, n. 8, p. e995–e999, 2015.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências*. Brasília: [s.n.]. 1973

ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC Nº 45, DE 9 DE AGOSTO DE 2012. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)*, p. 1–8, 2012.

ANVISA. RESOLUÇÃO – RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)*, p. 87, 2017.

ANWAR, H; AHMAD, M; MINHAS, M U; REHMANI, S. Alginate-polyvinyl alcohol based interpenetrating polymer network for prolonged drug therapy, Optimization and in-vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 166, p. 183–194, 15 jun. 2017.

ANWEKAR, H; PATEL, S; SINGHAI, A K. Liposome- as drug carriers. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, v. 2, n. 7, p. 945–951, 2011.

ARAMWIT, P; PALAPINYO, S; SRICHANA, T; CHOTTANAPUND, S; MUANGMAN, P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Archives of Dermatological Research*, v. 305, n. 7, p. 585–594, 2013.

ARAMWIT, P; SIRITIENTONG, T; SRICHANA, T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste Management & Research*, v. 30, n. 3, p. 217–224, 2012.

ARIFIN, D Y; LEE, L Y; WANG, C-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1274–1325, 30 nov. 2006.

AZEVEDO, G D; PINTO, J C C S. Particle size distributions of P(VAc-co-MMA) beads produced through nonconventional suspension copolymerizations. *Powder Technology*, v. 355, p. 727–737, 2019.

BANACH, M; KOWALSKI, Z; WZOREK, Z; GORAZDA, K. A chemical method of the production of “heavy” sodium tripolyphosphate with the high content of Form I or Form II. *Polish Journal of Chemical Technology*, v. 11, n. 2, p. 13–20, 2009.

BARAJAS-GAMBOA, J A; SERPA-GUERRA, A M; RESTREPO-OSORIO, A; ÁLVAREZ-LÓPEZ, C. Sericin applications: a globular silk protein. *Ingeniería y Competitividad*, v. 18, n. 2, p. 193–206, 2016.

BARBOSA-CÁNOVAS, G V; ORTEGA-RIVAS, E; JULIANO, P; YAN, H. *Food Powders - Physical Properties, Processing, and Functionality*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.

BAR-GERA, H. The Target Parameter of Adjusted R-Squared in Fixed-Design Experiments. *The American Statistician*, v. 71, n. 2, p. 112–119, 2017.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 94, n. 4, p. 522–529, 2009.

BASTIDAS, D M; CRIADO, M; LA IGLESIA, V M; FAJARDO, S; LA IGLESIA, A; BASTIDAS, J. M. Comparative study of three sodium phosphates as corrosion inhibitors for steel reinforcements. *Cement and Concrete Composites*, v. 43, p. 31–38, 2013.

BATRAKOVA, E V; BRONICH, T K; VETRO, J A; KABANOV, A V. Polymer micelles as drug carriers. *Nanoparticulates as drug carriers*, p. 57–93, 2006.

BATYRBEKOV, E O; ISKAKOV, R; ZHUBANOV, B A. Synthetic and natural polymers as drug carriers for tuberculosis treatment. *Macromolecular Symposia*, v. 127, p. 251–256, 1998.

BELKACEM, N; SHEIKH SALEM, M A.; ALKHATIB, H S. Effect of ultrasound on the physico-chemical properties of poorly soluble drugs: Antisolvent sonocrystallization of ketoprofen. *Powder Technology*, v. 285, p. 16–24, 2015.

BERGER, J; REIST, M; MAYER, J M; FELT, O; PEPPAS, N A; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19–34, 2004.

BERZINA-CIMDINA, L; BORODAJENKO, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: THEOPHILE, THEOPHANIDES (Org.). *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. [S.l.]: InTech, 2012.

BETTINETTI, G; MURA, P. Dissolution Properties of Naproxen in Combinations with Polyvinylpyrrolidone. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, n. 8, p. 1353–1366, 1994.

BEZERRA, I C S. *Incorporação de furosemida em matriz gastrorresistente de sericina e alginato para liberação modificada*. 2018. 92 f. UNICAMP, 2018.

BHAGWAT, R R; VAIDHYA, I S. Novel drug delivery systems: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 4, n. 3, p. 970–982, 2013.

BHATIA, S. Natural polymers vs synthetic polymer. In: BHATIA, S (Org.) *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer, 2016.

BONILLA, P; ARIAS, E M; SOLANS, C; GARCÍA-CELMA, M. José Influence of crosslinked alginate on drug release from highly concentrated emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 536, n. September 2016, p. 148–155, 2018.

BORAH, K; BORUAH, G; KALYANAPPA, S. Design and in vitro evaluation of a novel sustained release double layer tablets of ketoprofen. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 7, p. 1138–1168, 2016.

BOURNE, D W A. Pharmacokinetics. In: BANKER, G. S.; RHODES, C. T. (Org.). *Modern Pharmaceutics*. 4th. ed. Nova York: Marcel Dekker Inc., 2002.

BRACCINI, I; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1089–1096, 2001.

BRADY, J; DRIG, T; LEE, P I; LI, J X. Polymer properties and characterization. In: QIU, Y *et al.* (Org.). *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. 2nd. ed. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 181–223.

BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. *Bulário eletrônico*. Acessado em 06/12/2019. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp

BRUSCHI, M L. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2015.

BURDOCK, G A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 12, p. 2341–2351, 2007.

BURGAIN, J; GAIANI, C; LINDER, M; SCHER, J Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, v. 104, p. 467–483, 2011.

BURKE, A; SMYTH, E; FITZGERALD, G A. Analgesic-Antipyretic Agents; Pharmacotherapy of Gout. In: BRUNTON, L L (Org.). *Goodman & Gilman's -The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th. ed. [S.l.]: McGraw Hill, 2006.

BUXTON, I L O; BENET, L Z. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. In: BRUNTON, L L (Org.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12nd. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Companies, Inc., 2006. p. 17–39.

CACURO, T A; WALDMAN, W. Alginate and its use as pH-sensitive polymer. *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 5, p. 1607–1617, 2018.

CALDWELL, J.; GARDNER, I.; SWALES, N. An introduction to drug disposition: The basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicologic Pathology*, v. 23, n. 2, p. 102–114, 1995.

CAO, T T; ZHANG, Y Q. Processing and characterization of silk sericin from Bombyx mori and its application in biomaterials and biomedicines. *Materials Science and Engineering C*, v. 61, p. 940–952, 2016.

ČALIJA, B; CEKIĆ, N; SAVIĆ, S; DANIELS, R; MARKOVIĆ, B; MILIĆ, J. pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 “sandwich” polyelectrolyte complex. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 110, p. 395–402, 2013.

ČALIJA, B; CEKIĆ, N; SAVIĆ, S; KRAJIŠNIK, D; DANIELS, R; MILIĆ, J. An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen. *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, n. 6, p. 919–929, 2011.

CAPAR, G; AYGUN, S S; GECIT, M. R. Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery. *Journal of Membrane Science*, v. 325, n. 2, p. 920–931, 1 dez. 2008.

CASTAGNETTI, C; MARIELLA, J. Anti-inflammatory Drugs in Equine Neonatal Medicine. Part I: Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 35, p. 475–480, 2015.

CASTRILLÓN, D C.; VELEZ, L M; HINCAPIE, G A; ÁLVAREZ, C. Characterization of Colombian Silk Sericin Dehydrated by Spray Drying and Freeze Drying. *Advance Journal of Food Science and Technology*, v. 15, p. 5–14, 2018.

CHAMBERS, G; MUKHERJEE, S; CASEY, A; CLAONADH, N Ó. Comparative in vitro Cytotoxicity Study of Silver Nanoparticle on Two Mammalian Cell Lines. *Toxicology in Vitro*, v. 26, n. 2, p. 238–251, 2012.

CHAO, S; LI, Y; ZHAO, R; ZHANG, L; LI, Y; WANG, C; LI, X Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 44, p. 440–447, 2018.

CHEN, X; LAM, K F; MAK, S F; CHING, W K; NG, T N; YEUNG, K L. Assessment of sericin biosorbent for selective dye removal. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 3, p. 426–432, 2012.

CHENG, B; LI, D; HUO, Q; ZHAO, Q; LAN, Q; CUI, M; PAN, W; YANG, X. Two kinds of ketoprofen enteric gel beads (CA and CS-SA) using biopolymer alginate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 120–130, 2018.

CHENG, Y; XU, Z; MA, M; XU, T. Dendrimers as Drug Carriers: Applications in Different Routes of Drug Administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 1, p. 123–143, 2008.

CHIME, S A; ONUNKWO, G C; ONYISHI, I I. Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 4, n. 2, p. 97–103, 2013.

CHIMSOOK, T. Controlled release behaviors of ketoprofen from matrix polymer of chitosan and poly(ethylene glycol). *Advanced Materials Research*, v. 813, p. 399–402, 2013.

CHIRILA, T V; SUZUKI, S; MCKIRDY, N C. Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from Bombyx mori silk cocoons. *Progress in Biomaterials*, v. 5, p. 135–145, 2016.

CHOI, H-K; CHUN, M-K; LEE, S H; JANG, M H; KIM, H D; JUNG, C S; OH, S Y. In vitro and in vivo study of poly(ethylene glycol) conjugated ketoprofen to extend the duration of action. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 50–57, 2007.

CHOI, J M; LEE, B; JEONG, D; PARK, K H; CHOI, E-J; JEON, Y-J; DINDULKAR, S D; CHO, E; DO, S H; LEE, K; LEE, I-S; PARK, S; JUN, B-H; YU, J-H; JUNG, S Characterization and regulated naproxen release of hydroxypropyl cyclosophoraose-pullulan microspheres. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 48, p. 108–118, 2017.

CHOIRI, S.; AINUROFIQ, A. Understanding the drug release mechanism from a montmorillonite matrix and its binary mixture with a hydrophilic polymer using a compartmental modelling approach. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 333, n. 1, p. 1–6, 2018.

CHOUDHARI, S J; SINGH, S R. Extended Release dosage form- Novel drug delivery system. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, v. 3, n. 2, p. 296–300, 2014.

CHOUDHURY, M; DEVI, D. Impact of high temperature and pressure on sericin scouring of muga silk cocoons. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, v. 41, n. 1, p. 93–96, 2016.

CHU, K R; LEE, E; JEONG, S H; PARK, E S. Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs. *Archives of Pharmacal Research*, v. 35, n. 7, p. 1187–1195, 2012.

CHUNG, M; VASHI, V; PUENTE, J; SWEENEY, M; MEREDITH, P. Clinical pharmacokinetics of doxazosin in a controlled-release gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 48, p. 678–687, 1999.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: MEYERS, R. A. (Org.). . *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2011. p. 1–23.

COPPI, G; IANNUCELLI, V; LEO, E; BERNABEI, M T; CAMERONI, R. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 1, p. 37–44, 2002.

COSTA, P; LOBO, J M S. Modeling and comparison of dissolution profile. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 123–133, 2001.

ĆURIĆ, A; MÖSCHWITZER, J P; FRICKER, G. Development and characterization of novel highly-loaded itraconazole poly(butyl cyanoacrylate) polymeric nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 114, p. 175–185, 2017.

CZOCHANSKA, Z; FOO, L Y; NEWMAN, R H; PORTER, L J. Polymeric Proanthocyanidins. Stereochemistry, Structural Units, and Molecular Weight. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 2278–2286, 1980.

DA SILVA, T L; DA SILVA JR, A C; RIBANI, M; VIEIRA, M G A; GIMENES, M L; DA SILVA, M G C Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing. *Chemical Engineering Transactions*, v. 38, p. 103–108, 2014a.

DA SILVA, T L; DA SILVA JR, A C; VIEIRA, M G A; GIMENES, M L; DA SILVA, M G C. Production and physicochemical characterization of microspheres made from sericin and alginate blend. *Chemical Engineering Transactions*, v. 39, n. Special Issue, p. 643–648, 2014b.

DA SILVA, T L; DA SILVA JR, A C; VIEIRA, M G A; GIMENES, M L; DA SILVA, M G C. Biosorption study of copper and zinc by particles produced from silk sericin – alginate blend: evaluation of blend proportion and thermal cross-linking process in particles production. *Journal of Cleaner Production*, v. 137, p. 1470–1478, 2016.

DAS, S K; DEY, T; KUNDU, S C. Fabrication of sericin nanoparticles for controlled gene delivery. *RSC Advances*, v. 4, p. 2137–2142, 2014.

DASH, S; MURTHY, P N; NATH, L; CHOWDHURY, P Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta poloniae pharmaceutica*, v. 67, n. 3, p. 217–23, 2010.

DATTA, R K; NANAVATY, M. *Global Silk Industry*. Nova Délhi: APH Publishing Corporation, 2007.

DAVIES, N M.; ANDERSON, K E. Clinical pharmacokinetics of naproxen. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 32, n. 4, p. 268–293, 1997.

DEL ARCO, M; GUTIÉRREZ, S; MARTÍN, C; RIVES, V; ROCHA, J. Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). *Journal of Solid State Chemistry*, v. 177, n. 11, p. 3954–3962, 2004.

DEY, N S; MAJUMDAR, S; RAO, M E B. Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. September, p. 1067–1075, 2008.

DHAKAR, R C; MAURYA, S D; SAGAR, B P S; BHAGAT, S; PRAJAPATI, S K; JAIN, C P. Variables Influencing the Drug Entrapment Efficiency of Microspheres: A Pharmaceutical Review. *Scholars Research Library*, v. 2, n. 5, p. 102–116, 2010.

DHARMALINGAM, K.; ANANDALAKSHMI, R. Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 815–829, 2019.

DICKSON, M.; GAGNON, P. The cost of new drug discovery and development. *Discovery Medicine*, v. 4, n. 22, p. 172–179, 2004.

DING, H. Modified-Release Drug Products and Drug Devices. In: SHARGEL, L.; YU, A. B. C. (Org.). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2012. p. 567–614.

DONG, Y; PAUKKONEN, H; FANG, W; KONTTURI, E; LAAKSONEN, T; LAAKSONEN, P. Entangled and colloidally stable microcrystalline cellulose matrices in controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 548, n. 1, p. 113–119, 2018.

DU, J R; SU, X; FENG, X. Chitosan/sericin blend membranes for adsorption of bovine serum albumin. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 95, n. 5, p. 954–960, 1 maio 2017.

DUAN, L; YUAN, J; YANG, X; CHENG, X; LI, J. Interaction study of collagen and sericin in blending solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, p. 468–475, 1 dez. 2016.

DUCHARME, M P. Drug Elimination, Clearance, and Renal Clearance. In: SHARGEL, L; YU, A B C (Org.). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2012. p. 149–175.

DUTTA, R. Drug Carriers in Pharmaceutical Design: Promises and Progress. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, n. 7, p. 761–769, 2007.

DYAKONOV, T; YANG, C H; BUSH, D; GOSANGARI, S; MAJURU, S; FATMI, A. Design and Characterization of a Silk-Fibroin-Based Drug Delivery Platform Using Naproxen as a Model Drug. *Journal of Drug Delivery*, v. 2012, p. 1–10, 2012.

EL-KAMEL, A; SOKAR, M S; AL GAMAL, S S; NAGGAR, V F. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 220, n. 1–2, p. 13–21, 2001.

ETXABIDE, A; LONG, J; GUERRERO, P; DE LA CABA, K; SEYFODDIN, A. 3D printed lactose-crosslinked gelatin scaffolds as a drug delivery system for dexamethasone. *European Polymer Journal*, v. 114, n. February, p. 90–97, 2019.

FAN, S; TANG, Q; WU, J; HU, D; SUN, H; LIN, J. Two-step synthesis of polyacrylamide/poly(vinyl alcohol)/polyacrylamide/ graphite interpenetrating network hydrogel and its swelling, conducting and mechanical properties. *Journal of Materials Science*, v. 43, p. 5898–5904, 2008.

FERNANDES, R S; DE MOURA, M R; GLENN, G M; AOUADA, F A. Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of Ca²⁺ alginate/clay nanocomposite hydrogel beads. *Journal of Molecular Liquids*, v. 265, p. 327–336, 2018.

FOLKMAN, J. How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. *Biomaterials*, v. 11, p. 615–618, 1990.

FOTAKIS, G; TIMBRELL, J A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRANÇA, M T; BERINGHS, A O; PEREIRA, R N; MARCOS, T M; BAZZO, G C; STULZER, H K. The role of sodium alginate on the supersaturation state of the poorly soluble drug chlorthalidone. *Carbohydrate Polymers*, v. 209, n. January, p. 207–214, 2019.

FRANCO, P; REVERCHON, E; DE MARCO, I. PVP/ketoprofen coprecipitation using supercritical antisolvent process. *Powder Technology*, v. 340, p. 1–7, 2018.

FREGNAN, F; CIGLIERI, E; TOS, P; CROSIO, A; CIARDELLI, G; RUINI, F; TONDA-TURO, C; GEUNA, S; RAIMONDO, S. Chitosan crosslinked flat scaffolds for peripheral nerve regeneration. *Biomedical Materials*, v. 11, n. 4, p. 045010, 2016.

FREIRE, M C L C; ALEXANDRINO, F; MARCELINO, H R; PICCIANI, P H S; SILVA, K G H; GENRE, J; DE OLIVEIRA, A G; DO EGITO, E S T. Understanding drug release data through thermodynamic analysis. *Materials*, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2017.

FREITAS, E D; VIDART, J M M; SILVA, E A; DA SILVA, M G C; VIEIRA, M G A. Development of mucoadhesive sericin/alginate particles loaded with ibuprofen for sustained drug delivery. *Particuology*, v. 41, p. 65–73, 2018.

FU, C; YANG, D; PEH, W Y E; LAI, S; FENG, X; YANG, H. Structure and Antioxidant Activities of Proanthocyanidins from Elephant Apple (*Dillenia indica* Linn.). *Journal of Food Science*, v. 80, n. 10, p. C2191–C2199, 2015.

GANDHI, B; BAHETI, J. Multiparticulates Drug Delivery Systems: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, v. 2, n. 3, p. 1620–1626, 2013.

GANDHI, R; KAUL, C L; PANCHAGNULA, R. Extrusion and spheronization in the development of oral controlled-release dosage forms. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 2, n. 4, p. 160–170, 1999.

GASMI, H; DANEDE, F; SIEPMANN, J; SIPEMANN, F. Does PLGA microparticle swelling control drug release? New insight based on single particle swelling studies. *Journal of Controlled Release*, v. 213, p. 120-127, 2015.

GERK, P M; YU, A B C; SHARGEL, L. Physiologic Factors Related to Drug Absorption. In: SHARGEL, L; YU, A B C (Org.). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2012. p. 373–414.

GHOSAL, K; DAS, A; DAS, S K; MAHMOOD, S; RAMADAN, M A M; THOMAS, S. Synthesis and characterization of interpenetrating polymeric networks based bio-composite alginate film: A well-designed drug delivery platform. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 130, p. 645–654, 2019.

GHOSAL, K; RAY, S D. Alginate/hydrophobic HPMC (60M) particulate systems: New matrix for site-specific and controlled drug delivery. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 4, p. 833–844, 2011.

GIANOTTO, E A S; ARANTES, R P; LARA-FILHO, M J; CASIMIRO FILHO, A C S; FREGONEZI-NERY, M M. Dissolution test for glibenclamide tablets. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1218–1221, 2007.

GILOTRA, S; CHOUHAN, D; BHARDWAJ, N; NANDI, S K; MANDAL, B B. Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications. *Materials Science and Engineering C*, v. 90, p. 420–432, 2018.

GIMENES, M L; SILVA, V R; VIEIRA, M G A; SILVA, M G C; SCHEER, A P. High Molecular Sericin from Bombyx mori Cocoons: Extraction and Recovering by Ultrafiltration. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, v. 5, n. 3, p. 266–271, 2014.

GIMENES, M L; LIU, L; FENG, X. Sericin/poly(vinyl alcohol) blend membranes for pervaporation separation of ethanol/water mixtures. *Journal of Membrane Science*, v. 295, p. 71–79, 31 maio 2007.

GOLDSHTEIN, M; SHAMIR, S; VINOGRADOV, E; MONSONEGO, A; COHEN, S. Co-assembled Ca²⁺ Alginate-Sulfate Nanoparticles for Intracellular Plasmid DNA Delivery. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 16, n. June, p. 378–390, 2019.

GOMBOTZ, W R; WEE, S F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 194–205, 2012.

GRANT, G T; MORRIS, E R; REES, D A; SMITH, P J C; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, v. 32, p. 195–198, 1973.

GRASEL, F S; BEHRENS, M C; STRASSBURGER, D; EINLOFT, S; DIZ, F M; MORRONE, F B; WOLF, C R; LIGABUE, R A. Synthesis, characterization and *in vitro*

cytotoxicity of *Acacia mearnsii* proanthocyanidin loaded PLGA microparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 1, p. 239-250, 2019.

GRIESSER, U J; STOWELL, J G. Solid-state analysis and polymorphism. In: LEE, D C; WEBB, M L (Org.). . *Pharmaceutical Analysis*. 1st. ed. [S.l.]: CRC Press, 2003. .

GROENEWOUD, W M. *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*. Amsterdam: Elsevier B.V., 2001.

GRUND, S; BAUER, M; FISCHER, D. Polymers in drug delivery-state of the art and future trends. *Advanced Engineering Materials*, v. 13, n. 3, p. 61–87, 2011.

GUINEA, G V; ELICES, M; PÉREZ-RIGUEIRO, J; PLAZA, G R. Structure and properties of spider and silkworm silk for tissue scaffolds. In: BASU, A (Org.). . *Advances in Silk Science and Technology*. [S.l.]: Woodhead Publishing Limited, 2015. p. 185–218.

GULRAJANI, M L. Degumming of silk. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, v. 22, n. 1, p. 79–89, 1992.

GULRAJANI, M L; PURWAR, R; PRASAD, R K; JOSHI, M. Studies on Structural and Functional Properties of Sericin Recovered from Silk Degumming Liquor by Membrane Technology. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 113, p. 2796–2804, 2009.

GUPTA, D; AGRAWAL, A; RANGI, A. Extraction and characterization of silk sericin. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, v. 39, n. 4, p. 364–372, 2014.

GUPTA, D; CHAUDHARY, H; GUPTA, C. Sericin based bioactive coating for polyester fabric. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, v. 40, p. 70–80, 2015.

GUPTA, D; AGRAWAL, A; CHAUDHARY, H; GULRAJANI, M; GUPTA, C. Cleaner process for extraction of sericin using infrared. *Journal of Cleaner Production*, v. 52, p. 488–494, 2013.

GUPTA, M M; BRIJESH, R. A review on: sustained release technology. *International Journal of Therapeutic Applications*, v. 8, n. 1, p. 18–23, 2012.

HADI, M A; AZHARUDDIN, M; RAO, A S; RAO, V U; SIRISHA, Y. Surface response methodology for development and optimization of naproxen sustained release tablets. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 7, n. 1, p. 125–133, 2014.

HALES, D; DUMITRAȘCU, D L; TOMUȚĂ, I; BRICIU, C; MUNTEAN, D M; TEFAS, L R; IURIAN, S; IOVANOV, R I; ACHIM, M; VLASE, L. Formulation, preparation and in vitro-in vivo evaluation of compression-coated tablets for the colonic-specific release of ketoprofen. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 4, p. 1-11, 2017.

HAN, B; JAUREQUI, J; TANG, B W; NIMNI, M E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 65, n. 1, p. 118–124, 2003.

HARIRFOROOSH, S; ASGHAR, W; JAMALI, F. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal

Complications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 5, p. 821–847, 2013.

HARRINGTON, P J.; LODEWIJK, E. Twenty years of naproxen technology. *Organic Process Research and Development*, v. 1, p. 72–76, 1997.

HARRISON, I T; LEWIS, B; NELSON, P; ROOKS, W; ROSZKOWSKI, A; TOMOLONIS, A; FRIED, J H. Nonsteroidal antiinflammatory agents. I. 6-Substituted 2-naphthylacetic acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 203–205, 1970.

HE, F; PAN, Q H; SHI, Y; DUAN, C Q. Chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wines. *Molecules*, v. 13, n. 12, p. 3007–3032, 2008.

HE, H; CAI, R; WANG, Y; TAO, G; GUO, P; ZUO, H; CHEN, L; LIU, X; ZHAO, P; XIA, Q. Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 457–464, 1 nov. 2017.

HERNANDEZ, C. *Desenvolvimento e avaliação in vitro de matrizes de cetoprofeno para liberação prolongada*. 2004. Universidade de São Paulo, 2004.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 12, p. 1145–1149, 1963.

HIGUCHI, T. Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 10, p. 874–875, 1961.

HOUGHTON, G W; DENNIS, M J; RIGLER, E D; PARSONS, R L. Comparative pharmacokinetics of ketoprofen derived from single oral doses of ketoprofen capsules or a novel sustained-release pellet formulation. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 5, n. 3, p. 203–209, 1984.

HU, X; KAPLAN, D; CEBE, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules*, v. 39, n. 18, p. 6161–6170, 2006.

HUANG, C H; CHI, C Y; CHEN, Y S; CHEN, K Y; CHEN, P L; YAO, C H. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. *Materials Science and Engineering C*, v. 32, n. 8, p. 2476–2483, 2012.

HUGHES, H K; KAHL, L K. *Manual Harriet Lane de Pediatria*. 21st. ed. [S.l.]: Elsevier, 2019.

INTERNATIONAL SERICULTURE COMISSION. *Global Silk Production Statistics*. [S.l: s.n.], 2016.

IQBAL, Z; BABAR, A; ASHRAF, M. Controlled-Release Naproxen Using Micronized Ethyl Cellulose by Wet-Granulation and Solid-Dispersion Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, n. 2, p. 129–134, 2002.

JABEEN, S; RAJU, K N; DEEPIKA, B; REGUPATHI, T; RAO, K; DUTT, K R. Formulation and in-vitro evaluation of gastro retentive floating tablets of lisinopril. *Innovat International Journal of Mecial & Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p. 56–63, 2017.

JAN, S U; KHAN, G M; KHAN, H; ASIM-UR-REHMAN; KHAN, K A; SHAH, S U; SHAH, K U; BADSHAH, A; HUSSAIN, I. Release pattern of three new polymers in Ketoprofen controlled-release tablets. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, n. 9, p. 601–607, 2012.

JANG, M J; UM, I C. Effect of sericin concentration and ethanol content on gelation behavior, rheological properties, and sponge characteristics of silk sericin. *European Polymer Journal*, v. 93, n. March, p. 761–774, 2017.

JENA, K; PANDEY, J P; KUMARI, R; SINHA, A K; GUPTA, V P; SINGH, G P. Free radical scavenging potential of sericin obtained from various ecoraces of tasar cocoons and its cosmeceuticals implication. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 255–262, 2018.

JIN, X; LI, L; XU, R; LIU, Q; DING, L; PAN, Y; WANG, C; HUNG, W; LEE, K. Effects of thermal cross-linking on the structure and property of asymmetric membrane prepared from the polyacrylonitrile. *Polymers*, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2018.

JOSHI, S; PATEL, P; LIN, S; MADAN, P L. Development of cross-linked alginate spheres by ionotropic gelation technique for controlled release of naproxen orally. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 1, p. 134–142, 2012.

JUDEFEIND, A; DE VILLIERS, M M. Drug Loading into and In Vitro Release from Nanosized Drug Delivery Systems. In: DE VILLIERS, M M; ARAMWIT, P; KWON, G S (Org.). *Nanotechnology in Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 129–162.

JYOTHI, B J; DONIPARTHI, J. Multiparticulate drug delivery systems using natural polymers as release retardant materials. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, n. 10, p. 61–65, 2014.

KALEEMULLAH, M; JIYAUDDIN, K; THIBAN, E; RASHA, S; AL-DHALLI, S; BUDIASIH, S; GAMAL, O E; FADLI, A; EDDY, Y. Development and evaluation of Ketoprofen sustained release matrix tablet using Hibiscus rosa-sinensis leaves mucilage. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 5, p. 770–779, 2017.

KANTOR, T G. Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. *Pharmacoterapy*, v. 6, n. 3, p. 93–102, 1986.

KARAMI, Z; SADIGHIAN, S; ROSTAMIZADEH, K; PARSA, M; REZAEI, S. Naproxen conjugated mPEG–PCL micelles for dual triggered drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, v. 61, p. 665–673, 2016.

KARNA, S; CHATURVEDI, S; AGRAWAL, V; ALIM, M. Formulation approaches for sustained release dosage forms: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 8, n. 5, p. 34–41, 2015.

KATO, N; SATO, S; YAMANAKA, A; YAMADA, H; FUWA, N; NOMURA, M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 62, n. 1, p. 145-147, 1998

KATSIKOIANNI, G; AVGOUSTAKIS, K. Poly(lactide-co-glycolide)-Methoxy-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles: Drug Loading and Release Properties. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n. 9, p. 3080–3086, 2006.

KATZHENDLER, I; HOFFMAN, A; GOLDBERGER, A; FRIEDMAN, M. Modeling of drug release from erodible tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 1, p. 110–115, 1997.

KATZHENDLER, I; MÄDER, K; FRIEDMAN, M. Structure and hydration properties of hydroxypropyl methylcellulose matrices containing naproxen and naproxen sodium. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 200, n. 2, p. 161-179, 2000.

KAUR, G; GREWAL, J; JYOTI, K; JAIN, U K; CHANDRA, R; MADAN, J. Oral controlled and sustained drug delivery systems: Concepts, advances, preclinical, and clinical status. In: GRUMEZESCU, A M (Org.). *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. William Andrew, 2018. p. 567-626.

KELLY, J G; KINNEY, C D; DEVANE, J G; MULLIGAN, S; COLGAN, B V. Pharmacokinetic properties and clinical efficacy of once-daily sustained-release naproxen. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 36, p. 383-388, 1989.

KHADKA, P; RO, J; KIM, H; KIM, I; KIM, J T; KIM, H; CHO, J M; YUN, G; LEE, J. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 6, p. 304–316, 2014.

KHALIFA, I B; LADHARI, N.; TOUAY, M. Application of sericin to modify textile supports. *Journal of the Textile Institute*, v. 103, n. 4, p. 370–377, 2012.

KHAMPIENG, T; ARAMWIT, P; SUPAPHOL, P. Silk sericin loaded alginate nanoparticles: Preparation and anti-inflammatory efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 80, p. 636–643, 2015.

KHAN, M M R; TSUKADA, M; GOTOH, Y; MORIKAWA, H; FREDDI, G; SHIOZAKI, H. Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 21, p. 8439–8445, 2010.

KHANDAI, M; CHAKRABORTY, S; SHARMA, A; PATTNAIK, S; DINDA, S C; SEN, K K; BENGAL, W. Preparation and evaluation of algino-sericin mucoadhesive microspheres: An approach for sustained drug delivery. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research*, v. 1, p. 48–60, 2010.

KHAZAELI, P; PARDAKHTY, A; HASSANZADEH, F. Formulation of ibuprofen beads by ionotropic gelation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 3, p. 163–170, 2008.

KHLIBSUWAN, R; SIEPMANN, F; SIEPMANN, J; PONGJANYAKUL, T. Chitosan-clay nanocomposite microparticles for controlled drug delivery: Effects of the

MAS content and TPP crosslinking. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 40, p. 1–10, 2017.

KIM, C; KIM, H; PARK, H; LEE, K Y. Controlling the porous structure of alginate ferrogel for anticancer drug delivery under magnetic stimulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 223, n. March, p. 115045, 2019.

KODAMA, K. The preparation and physico-chemical properties of sericin. *Biochemical Journal*, v. 20, p. 1208–1222, 1926.

KONDO, T. The assignment of IR absorption bands due to free hydroxyl groups in cellulose. *Cellulose*, v. 4, p. 281–292, 1997.

KOTZ, J C; TREICHEL, P M; TOWNSEND, J R. *Chemistry and Chemical Reactivity*. 8th. ed. United States of America: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2011.

KUMAR, B P; CHANDIRAN, I S; BHAVYA, B; SINDHURI, M. Microparticulate Drug Delivery System: a Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, v. 1, n. 1, p. 2248–9126, 2011.

KUNZ, R I; BRANCALHÃO, R M C; RIBEIRO, L F C; NATALI, M R M. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 1–19, 2016.

KWAK, H W; SHIN, M; YUN, H; LEE, K H. Preparation of silk sericin/lignin blend beads for the removal of hexavalent chromium ions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 1–18, 2016.

LAMATTINA, J C; GOLAN, D E. Farmacocinética. In: GOLAN, D E *et al.* (Org.). *Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2nd. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009. p. 28–45.

LAMBONI, L; GAUTHIER, M; YANG, G; WANG, Q. Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1855–1867, 2015.

LARSON, N; GHANDEHARI, H. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials*, v. 24, n. 5, p. 840–853, 2012.

LEE, K Y; MOONEY, D J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 37, n. 1, p. 106–126, 1 jan. 2012.

LEE, P. I.; LI, J-X. Evolution of oral controlled release dosage forms. In: WEN, HONG; PARK, KINAM (Org.). *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 21–31.

LEHNE, R A. *Pharmacology for nursing care*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2013.

LI, X; KONG, X; ZHANG, J; WANG, Y; WANG, Y; SHI, S; GUO, G; LUO, F; ZHAO, X; WEI, Y; QIAN, Z. A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 1, p. 232–241, 2011.

LI, X; COOPER, M A. Measurement of drug lipophilicity and pKa using acoustics. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 2609–2613, 2012.

LIN, L; WONG, H. Predicting oral drug absorption: Mini review on physiologically-based pharmacokinetic models. *Pharmaceutics*, v. 9, n. 4, 2017.

LIU, D; YANG, F; XIONG, F; GU, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, v. 6, n. 9, p. 1306–1323, 2016.

LIU, X; ZHANG, K-Q. Silk Fiber — Molecular Formation Mechanism, Structure-Property Relationship and Advanced Applications. *Oligomerization of Chemical and Biological Compounds*. [S.l.]: InTech, 2014.

LOPES, C M; LOBO, J M S; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LÓPEZ-GARCÍA, J; LEHOCKY, M; HUMPOLÍČEK, P; SÁHA, P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 5, n. 2, p. 43-57, 2014.

LYRA, M A M; SOARES-SOBRINHO, J L; BRASILEIRO, M T; LA ROCA, M F; BARRAZA, J A; VIANA, O S; ROLIM-NETO, P J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.

MADEJOVÁ, J. FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational Spectroscopy*, v. 31, p. 1–10, 2003.

MAGOSHI, J; MAGOSHI, Y; NAKAMURA, S; KASAI, N; KAKUDO, M. Physical Properties and Structure of Silk. Thermal Behavior of Silk Fibroin in the Random-Coil Conformation. *J Polym Sci Polym Phys Ed*, v. 15, n. 9, p. 1675–1683, 1977.

MAHERIYA, P M; PRAJAPATI, V D. Alginate. In: MISHRA, M (Org.). *Encyclopedia of Polymer Applications*. 1st. ed. [S.l.]: CRC Press, 2019.

MAIER, R S. Information criteria for deciding between normal regression models. *Proceedings of the Royal Society A*, p. 1–27, 2013.

MAMIDALA, R K; RAMANA, V; SANDEEP, G; LINGAM, M; GANNU, R; YAMSANI, M R. Factors Influencing the Design and Performance of Oral Sustained / Controlled Release Dosage Forms. *International Journal for Pharmaceutical Research Science and nanotechnology*, v. 2, n. 3, p. 583–594, 2009.

MANDAL, B B.; GHOSH, B; KUNDU, S. C. Non-mulberry silk sericin/poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices for potential biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, n. 2, p. 125–133, 2011.

MANDAL, S; KUMAR, S S; KRISHNAMOORTHY, B; BASU, S K. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 4, p. 785–793, 2010.

MARCOLONGO, R; CANESI, B; FERRI, S; ORIENTE, P; PERPIGNANO, G; SERNI, U; TIRRI, G; TROTTA, F; DAL PRÀ, A; LUCCHINI, M. Efficacy and tolerability of ketoprofen 200 mg controlled-release cps vs indomethacin 50 mg cps in patients with symptomatic hip osteoarthritis. A multicentre study. *Minerva Medica*, v. 88, n. 10, p. 383–391, 1997.

MARTÍNEZ, A; FERNÁNDEZ, A; PÉREZ, E; BENITO, M; TEIJÓN, J M; BLANCO, M D. Polysaccharide-Based Nanoparticles for Controlled Release Formulations. In: HASHIM, A A (Org.). *The Delivery of Nanoparticles*. [S.l.]: InTech, 2012. p. 185–222.

MARTINS, A F; FACCHI, S P; MONTEIRO, J P; NOCCHI, S R; SILVA, C T P; NAKAMURA, C V; GIROTTO, E M; RUBIRA, A F; MUNIZ, E C. Preparation and cytotoxicity of N,N,N-trimethyl chitosan/alginate beads containing gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 466–471, 2015.

MATHEW, S T; DEVI, S G; PRASANTH, V V; VINOD, B. Formulation and in vitro in vivo evaluation of ketoprofen-loaded albumin microspheres for intramuscular administration. *Journal of Microencapsulation*, v. 26, n. 5, p. 456–469, 2009.

MATHUR, M; MISHRA, R. A Review on Osmotic Pump Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 7, n. 2, p. 453–471, 2016.

MATSUMOTO, A; KIM, H J; TSAI, I Y; WANG, X; CEBE, P; KAPLAN, D L. Silk. In: LEWIN, M (Org.). *Handbook of Fiber Chemistry*. 3rd. ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2007. p. 383–404.

MAURO, C. P. *Comprimidos de Liberação Controlada*. 2007. Faculdades Metropolitanas Unidas, 2007.

MENEZES, M F S C; RODRIGUES, L Z; CAVALHEIRO, C P; ETCHEPARE, M A; MENEZES, C R. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. *Ciência e Natura*, v. 37, p. 30–37, 2015.

MILADI, K; IBRAHEEM, D; IQBAL, M; SFAR, S; FESSI, H; ELAISSARI, A. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI Journal*, v. 13, p. 28–57, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Política Nacional de Medicamentos*. Brasil: [s.n.], 1998.

MIRCIA, E; VLASE, L; HANCU, G; BUDĂU, M; SOARE, R. Kinetic Modelling of Drug Release from Pentoxifylline Matrix Tablets based on Hydrophilic, Lipophilic and Inert Polymers. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, v. 62, n. 2, p. 5–12, 2015.

MISHRA, S P. *A Text Book of Fibre Science and Technology*. Nova Délhi: New Age International Publishers, 2000.

MIYAKE, H; WAKISAKA, H; YAMASHITA, Y; NAGURA, M. Moisture Characteristic and Structure of High Molecular Weight Sericin Film. *Polymer Journal*, v. 35, n. 8, p. 683–687, 2003.

MOHAMMED, Z H; HILL, S E; MITCHELL, J R Covalent crosslinking in heated protein systems. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 2, p. 221–226, 2000.

MOHSEN, M; GOMAA, E; MAZAID, N A; MOHAMMED, R. Synthesis and characterization of organic montmorillonite-polyvinyl alcohol-co-polyacrylic nanocomposite hydrogel for heavy metal uptake in water. *AIMS Materials Science*, v. 4, n. 5, p. 1122–1139, 2017.

MONDAL, M; TRIVEDY, K; KUMAR, S N. The silk protein, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn,-a review. *Casp. J Env Sci*, v. 5, n. nE, p. 63–76, 2007.

MOODY, V; NEEDLES, H L. *Tufted Carpet*. New York, NY: William Andrew Publishing, 2004.

MORAES, M A; NOGUEIRA, G M; WESKA, R F; BEPPU, M M. Preparation and Characterization of Insoluble Silk Fibroin/Chitosan Blend Films. *Polymers*, v. 2, p. 719–727, 2010.

MOREIRA, K; DE MIRANDA, L N; ZÉTOLA, M; PEZZINI, B R; BAZZO, G C. Comprimidos contendo microesferas de cetoprofeno como sistema de liberação bifásica. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 33, n. 1, p. 71–76, 2012.

MORLEY, K D; BERNSTEIN, R M; HUGHES, G R V; BLACK, C M; RAJAPAKSE, C N A; WILSON, L. A comparative trial of a controlled-release formulation of ketoprofen (“Oruvail”) and a conventional capsule formulation of ketoprofen (“Orudis”) in patients with osteoarthritis of the hip. *Current Medical Research and Opinion*, v. 9, n. 1, p. 28–34, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 16, p. 55–63, 1983.

MOTTA, A; BARBATO, B; FOSS, C; TORRICELLI, P; MIGLIARESI, C. Stabilization of *Bombyx mori* silk fibroin/sericin films by crosslinking with PEG-DE 600 and genipin. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 26, n. 2, p. 130–143, 2011.

MOUELHI, M E L; RUELIUS, H W; FENSELAU, C; DULIK, D M. Species-dependent enantioselective glucuronidation of three 2-arylpropionic acids. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 15, n. 6, p. 767–772, 1987.

MURPHY, E B.; WUDL, F. The world of smart healable materials. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 223–251, 2010.

MURTAZA, G; ULLAH, H; KHAN, S A; MIR, S; KHAN, A K; NASIR, B; AZHAR, S; ABID, M A. Formulation and in vitro dissolution characteristics of sustained-release matrix tablets of tizanidine hydrochloride. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 2, p. 219–225, 2015.

MUZOLF-PANEK, M; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A; SZYMUSIAK, H; TYRAKOWSKA, B. The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. *European Food Research and Technology*, v. 235, n. 6, p. 1001–1009, 2012.

NAGURA, M; OHNISHI, R; GITOH, Y; OHKOSHI, Y. Structures and physical properties of cross-linked sericin membranes. *Journal of Sericultural Science of Japan*, v. 70, n. 2, p. 149–153, 2001.

NAKAMURA, S; MAGOSHI, J; MAGOSHI, Y. Thermal properties of silk proteins in silkworms. In: KAPLAN, D; ADAMS, W W; FARMER, B; VINEY, C (Org.). *Silk Polymers*, 1st. ed. Washington:ACS Symposium Series, 1993, p. 211–221.

NALINI, T; BASHA, S K; MOHAMED SADIQ, A M; KUMARI, V S; KAVIYARASU, K. Development and characterization of alginate / chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 52, n. March, p. 65–72, 2019.

NARRA, K; DHANALEKSHMI, U; RANGARAJ, G; RAJA, D; KUMAR, C S; REDDY, P N; MANDAL, A B. Effect of formulation variables on rifampicin loaded alginate beads. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 11, n. 3, p. 715–721, 2012.

NASAR, G; KHAN, M S; KHALIL, U. Structural study of PVA composites with inorganic salts by X-ray diffraction. *J Pak Mater Soc*, v. 3, n. 2, p. 67–70, 2009.

NEO, P Y; SHI, P; GOH, J C; TOH, S L. Characterization and mechanical performance study of silk/PVA cryogels: towards nucleus pulposus tissue engineering. *Biomedical Materials*, v. 9, n. 6, p. 1–16, 2014.

NGUYEN, M H; TRAN, T T; HADINOTO, K. Controlling the burst release of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex via crosslinking of the polysaccharide chains. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 104, p. 156–163, 2016.

NIȚĂ, J; IORGULESCU, M; SPIROIU, M F; GHIUREA, M; PETCU, C; CİNTEZĂ, O. The adsorption of heavy metal ions on porous calcium alginate microparticles. *Analele Universitatii din Bucuresti – Chimie*, v. 1, p. 59–67, 2007.

NORRIS, S M P; PANKEVICH, D E; DAVIS, M; ALTEVOGT, B M. *Improving and Accelerating Therapeutic Development for Nervous System Disorders*. Washington, D.C.: [s.n.], 2014.

NOVOHRADSKY, V; ZERZANKOVA, L; STEPANKOVA, J; KISOVA, A; KOSTRHUNOVA, H; LIU, Z; SADLER, P J; KASPARKOVA, J; BRABEC, V. A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. *Metallomics*, v. 6, n. 8, p. 1491–1501, 2014.

OH, H; LEE, J Y; KIM, M K; UM, I C; LEE, K H. Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 32–37, 2011.

OLIVEIRA, G G G; FERRAZ, H. G.; MATOS, J. S.R. Thermoanalytical study of glibenclamide and excipients. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 79, n. 2, p. 267–270, 2005.

OLIVEIRA, G G G. *Desenvolvimento e avaliação de formulações para cápsulas gelatinosas duras*. 2005. Universidade de São Paulo, 2005.

OSMAŁEK, T Z; FROELICH, A; SOBÓL, M; MILANOWSKI, B; SKOTNICKI, M; KUNSTMAN, P; SZYBOWICZ, M. Gellan gum macrobeads loaded with naproxen: The impact of various naturally derived polymers on pH-dependent behavior. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 33, n. 1, p. 140–155, 2018.

OSSOWICZ, P; KARDALEVA, P; GUNCHEVA, M; KLEBEKO, J; ŚWIĄTEK, E; JANUS, E; YANCHEVA, D; ANGELOV, I. Ketoprofen-Based Ionic Liquids: Synthesis and Interactions with Bovine Serum Albumin. *Molecules*, v. 25, n. 90, p. 1 – 17, 2020.

PADAMWAR, M N; PAWAR, A P. Silk sericin and its application: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 63, n. 10, p. 323–329, 2004.

PANTHONG, J; EAMCHOTCHAWALIT, C; SONGSERMPONG, S. Effect of spray drying conditions on the characteristics of sericin powder from eri silk boiling water. *International Journal of Health and Life-Sciences*, v. 1, n. 1, p. 151–160, 2015.

PAPADIMITRIOU, S; BIKIARIS, D. Novel self-assembled core-shell nanoparticles based on crystalline amorphous moieties of aliphatic copolyesters for efficient controlled drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 138, n. 2, p. 177–184, 2009.

PAPADOPOULOU, V; KOSMIDIS, K; VLACHOU, M; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARIDA, K R; PANDA, S K; RAVANAN, P; ROY, H; TALWAR, P. Microparticles Based Drug Delivery Systems: Preparation and Application in Cancer Therapeutics. *Review Article of International Archive of Applied Sciences and Technology*, v. 4, n. September, p. 68–75, 2013.

PATEL, N; CHOTAI, N; PATEL, J; SONI, T; DESAI, J; PATEL, R. Comparison of In Vitro Dissolution Profiles of Oxcarbazepine-HP b-CD Tablet Formulations with Marketed Oxcarbazepine Tablets. *Methods*, v. 5, n. November, p. 28–34, 2008.

PATEL, N; LALWANI, D; GOLLMER, S; INJETI, E; SARI, Y; NESAMONY, J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Progress in Biomaterials*, v. 5, n. 2, p. 117–133, 2016.

PATIL, P; CHAVANKE, D; WAGH, M. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. SUPPL. 4, p. 27–32, 2012.

PATNAIK, S; KURDEKAR, A D; CHUNDURI, LA A; PRATHIBHA, C; VENKATARAMANIAH, K. In Vitro Dissolution Studies on Naproxen-PVP Nanoformulations Show Enhanced Oral Bioavailability of Naproxen. *International Journal of Medical Nano Research*, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2018.

PEZZINI, B R; SILVA, M A S; FERRAZ, H G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 4, p. 12, 2007.

PHAECHAMUD, T; DARUNKAISORN, W. Drug release behavior of polymeric matrix filled in capsule. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 24, n. 6, p. 627–634, 1 nov. 2016.

PORADOWSKI, D; OBMÍŃSKA-MRUKOWICZ, B. Effect of selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the viability of canine osteosarcoma cells of the D-17 line: in vitro studies. *Journal of Veterinary Research*, v. 63, p. 399 – 403, 2019.

PUBCHEM. *U.S. National Library of Medicine*. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

QIAN, T; LI, J; FENG, W; NIAN, H. Enhanced thermal conductivity of form-stable phase change composite with single-walled carbon nanotubes for thermal energy storage. *Scientific Reports*, v. 7, n. November 2016, p. 1–10, 2017.

QIU, Y.; ZHOU, D. Understanding design and development of modified release solid oral dosage forms. *Journal of Validation Technology*, v. 17, n. 2, p. 23–32, 2011.

RAHIM, S N A; SULAIMAN, A; HAMZAH, F; HAMID, K H K; RODHI, M N M; MUSA, M; EDAMA, N A. Enzymes encapsulation within calcium alginate-clay beads: Characterization and application for cassava slurry saccharification. *Procedia Engineering*, v. 68, p. 411–417, 2013.

RAJENDRAN, R; BALAKUMAR, C; SIVAKUMAR, R; AMRUTA, T; DEVAKI, N. Extraction and application of natural silk protein sericin from Bombyx mori as antimicrobial finish for cotton fabrics. *Journal of the Textile Institute*, v. 103, n. 4, p. 458–462, 2012.

RAJKHOWA, R; WANG, L; KANWAR, J R; WANG, X. Molecular Weight and Secondary Structure Change in Eri Silk During Alkali Degumming and Powdering. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 119, p. 1339–1347, 2011.

RAMTEKE, K H. Mathematical models of drug dissolution: a review, *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, v. 3, n. 5, p. 388–396, 2014.

RANGI, A; JAJPURA, L. The Biopolymer Sericin: Extraction and Applications. *Journal of Textile Science & Engineering*, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2015.

RASTOGI, V; YADAV, P; BHATTACHARYA, S S; MISHRA, A K; VERMA, N; VERMA, A; PANDIT, J K. Carbon Nanotubes: An Emerging Drug Carrier for Targeting Cancer Cells. *Journal of Drug Delivery*, v. 2014, p. 1-23, 2014.

RATNAPARKHI, M P; JYOTI, P G. Sustained Release Oral Drug Delivery System - An Overview. *International Journal of Pharma Research & Review*, v. 2, n. 3, p. 11–21, 2013.

REMMINGHORST, U; REHM, B H A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 1701–1712, 2006.

RENÇBER, S; KARAVANA, S Y; ÖZYAZICI, M. Bioavailability file: Ketoprofen. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 34, n. 4, p. 203–216, 2009.

RHODES, C. T. Bioequivalency. In: BANKER, G. S.; RHODES, C. T. (Org.). *Modern Pharmaceutics*. 4th. ed. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 2002.

RISS, T L; MORAVEC, R A; NILES, A L; DUELLMAN, S; BENINK, H A; WORZELLA, T J; MINOR, L. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G S; COUSSENS, N P; NELSON, H (Org.). *Assay Guidance Manual*. Betesda: [s.n.], 2016.

RITGER, P L.; PEPPAS, N A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

RIVERA GIL, P; HÜHN, D; DEL MERCATO, L L; SASSE, D; PARAK, W J. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 115–125, 2010.

ROBINSON, J. R.; ERIKSEN, S. P. Theoretical formulation of sustained-release dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 55, n. 11, p. 1254–1263, 1966.

RODRIGUES, P. O. *Desenvolvimento tecnológico e avaliação de formas farmacêuticas de liberação prolongada do antiretroviral Zidovudina (AZT)*. 2005. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

ROGERO, S O; LUGÃO, A B; IKEDA, T I; CRUZ, A S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v. 6, p. 317–320, 2003.

ROUCO, H; DIAZ-RODRIGUEZ, P; RAMA-MOLINOS, S; REMUÑÁN-LÓPEZ, C; LANDIN, M. Delimiting the knowledge space and the design space of nanostructured lipid carriers through Artificial Intelligence tools. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 553, n. 1–2, p. 522–530, 2018.

ROWE, R C; SHESKEY, P J; QUINN, M E. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th. ed. [S.l.]: Pharmaceutical Press, 2009.

SAARAI, A; DIAZ-RODRIGUEZ, P; RAMA-MOLINOS, S; REMUÑÁN-LÓPEZ, C; LANDIN, M. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 18, p. 152–166, 2013.

SACCHETIN, P S C. *Incorporação de Flavobacterium columnare inativado em micropartículas de alginato e quitosana para a imunização de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 2009. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

SACHAN, N K; BHATTACHARYA, A; PUSHKAR, S; MISHRA, A. Biopharmaceutical classification system: A strategic tool for oral drug delivery technology. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 3, n. 2, p. 76–81, 2009.

SADIQ, A; CHOUBEY, A; BAJPAI, A. K. Biosorption of chromium ions by calcium alginate nanoparticles. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 63, n. 3, p. 4077–4081, 2018.

SAFARI, J; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

SALMAN; ARDIANSYAH; NASRUL, E; RIVAI, H; BEN, E S; ZAINI, E. Physicochemical chracterization of amorphous solid dispersion of ketoprofen – polyvinylpyrrolidone K-30. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 2, p. 5–8, 2015.

SANCHEZ-BALLESTER, N M; SOULAIROL, I; BATAILLE, B; SHARKAWI, T. Flexible heteroionic calcium-magnesium alginate beads for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, v. 207, n. November 2018, p. 224–229, 2019.

ŞANLI, O; SOLAK, E K. Controlled Release of Naproxen from Sodium Alginate and Poly(vinyl alcohol)/Sodium Alginate Blend Beads Crosslinked with Glutaraldehyde. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 112, p. 2057–2065, 2009.

SANOH, S; HORIGUCHI, A; SUGIHARA, K; KOTAKE, Y; TAYAMA, Y; URAMARU, N; OHSHITA, H; TATENO, C; HORIE, T; KITAMURA, S; OHTA, S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 40, n. 12, p. 2267–2272, 2012.

SANTOS, N T G; DA SILVA, M G C; VIEIRA, M G A. Development of novel sericin and alginate-based biosorbents for precious metal removal from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018.

SANTOS, P A. *Efeito do 8-metoxipsoraleno (8-mop) na citotoxicidade da rotenona sobre células do sistema nervoso central, um modelo de doença de Parkinson in vitro*. 2015. Universidade Federal da Bahia, 2015.

SANTOS, P S. *Tecnologia de Argilas Aplicada às Argilas Brasileiras*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1975.

SARKER, B; PAPAGEORGIOU, D G; SILVA, R; ZEHNDER, T; GUL-E-NOOR, F; BERTMER, M; KASCHTA, J; CHRISSAFIS, K; DETSCH, R; BOCCACCINI, A R. Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 11, p. 1470–1482, 2014.

SAROVART, S; SUDATIS, B; MEESILPA, P; GRADY, B P; MAGARAPHAN, R. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Reviews on Advanced Materials Science*, v. 5, p. 193–198, 2003.

SASAKI, M; YAMADA, H; KATO, N. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. *Nutrition Research*, v. 20, n. 10, p. 1505–1511, 2000.

SCHOUBBEN, A; BLASI, P; GIOVAGNOLI, S; ROSSI, C; RICCI, M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chemical Engineering Journal*, v. 160, p. 363–369, 2010.

SHAIKH, H K; KSHIRSAGAR, R V; PATIL, S G. Mathematical models for drug release characterization: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 4, p. 324–338, 2015.

SHAKSHOOKI, S K; ELEJMI, A A; HAMASSI, A M; EL-AKARI, F A; MASOUD, N A. Facile Synthesis of Poly (vinylalcohol)/Fibrous Cerium Phosphate Nanocomposite Membranes. *Physics and Materials Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2014.

SHARGEL, L; YU, A B C. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2016.

SHARGEL, L; YU, A B C. Introduction to Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. In: SHARGEL, L; YU, A B C (Org.). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2012. p. 1–26.

SHEKUNOV, B Y; CHATTOPADHYAY, P; TONG, H H Y; CHOW, A H L. Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 2, p. 203–227, 2007.

SHEN, S; WU, Y; LIU, Y; WU, D. High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4085–4109, 2017.

SHOHIN, I E; KULINICH, J I; RAMENSKAYA, G V; ABRAHAMSSON, B; KOPP, S; LANGGUTH, P; POLLI, J E; SHAH, V P; GROOT, D W; BARENDSE, D M; DRESSMAN, J B. Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Ketoprofen. *International Journal of Drug Development and Research*, v. 101, n. 10, p. 1–11, 2012.

SILVA, T L; VIDART, J M M; SILVA JR, A C; GIMENES, M L; VIEIRA, M G A; SILVA, M G C. Evaluation of incorporation of diclofenac sodium in dried sericin-alginate particles prepared by ionic gelation technique. *Chemical Engineering Transactions*, v. 43, p. 829–834, 2015.

SINGH, K P; JAYASOMU, R S. Bombyx mori – A Review of its Potential as a Medicinal Insect. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, n. 1, p. 28–32, 2002.

SINGH, M N; HEMANT, K S Y; RAM, M; SHIVAKUMAR, H G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 2, p. 65–77, 2010.

SINHA, P; UBAIDULLA, U; HASNAIN, M S; NAYAK, A K; RAMA, B. Alginate-okra gum blend beads of diclofenac sodium from aqueous template using ZnSO₄ as a cross-linker. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 555–563, 2015.

SINHA, P; UBAIDULLA, U.; NAYAK, A K. Okra (*Hibiscus esculentus*) gum-alginate blend mucoadhesive beads for controlled glibenclamide release. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 1069–1075, 2015.

SIONKOWSKA, A; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J; GAWRON, M; KOZLOWSKA, J; PLANECKA, A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and

elastin hydrolysates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 47, n. 4, p. 570–577, 2010.

SKWAREK, E; GONCHARUK, O; STERNIK, D; JANUSZ, W; GDULA, K; GUN'KO, V M. Synthesis, Structural, and Adsorption Properties and Thermal Stability of Nanohydroxyapatite/Polysaccharide Composites. *Nanoscale Research Letters*, v. 12, n. 1, 2017.

SMIDSRØD, O; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, v. 8, p. 71–78, 1990.

SOARES, J P; SANTOS, J E; CHERICE, G O; CAVALHEIRO, E T G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, v. 29, n. 2, p. 57–64, 2004.

SOLAK, E K. Preparation and Characterization of IPN Microspheres for Controlled Delivery of Naproxen. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 02, n. 04, p. 445–453, 2011.

SONG, P; WU, Y; ZHANG, X; YAN, Z; WANG, M; XU, F. Preparation of Covalently Crosslinked Sodium Alginate/Hydroxypropyl Methylcellulose pH-Sensitive Microspheres for Controlled Drug Release. *BioResources*, v. 13, n. 4, p. 8614–8628, 2018.

SONI, T.; CHOTAI, N. Assessment of Dissolution Profile of Marketed Aceclofenac Formulations. *Journal of Young Pharmacists*, v. 2, n. 1, p. 21–26, 2010.

SONJUI, T; NOOMHORM, C; PROMBOON, A. Sericin Recovery from Silk Cocoon Degumming Wastewater by a Membrane Process. *Kasetsart Journal*, v. 43, p. 538–549, 2009.

STODGHILL, S P. Thermal analysis - A review of techniques and applications in the pharmaceutical sciences. *American Pharmaceutical Review*, v. 13, n. 2, p. 29–36, 2010.

SUKTHAM, K; KOOBKOKKRUD, T; WUTIKHUN, T; SURASSMO, S. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 537, n. 1–2, p. 48–56, 2018.

SUN, H; ZHAO, H. Physiologic Drug Distribution and Protein Binding. In: SHARGEL, L; YU, A B C (Org.). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics* 2. 7th. ed. [S.l.]: McGraw Hill Education, 2012. p. 259–308.

SUNDARRAJAN, P; ESWARAN, P; MARIMUTHU, A; SUBHADRA, L B; KANNAIYAN, P. One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 33, n. 10, p. 3218–3224, 2012.

SWAMY, T M M; RAMARAJ, B; SIDDARAMAIAH. Sodium alginate and poly(ethylene glycol) blends: thermal and morphological behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 47, p. 877–881, 2010.

TAKAGI, T; RAMACHANDRAN, C; BERMEJO, M; YAMASHITA, S; YU, L X; AMIDON, G L. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug

Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular Pharmaceutics*, v. 3, n. 6, p. 631-643, 2006.

TAKASU, Y; YAMADA, H; TSUBOUCHI, K. Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 66, n. 12, p. 2715–2718, 2002.

TAKEI, F; KIKUCHI, Y; KIKUCHI, A; MIZUNO, S; SHIMURA, K. Further Evidence for Importance of the Subunit Combination of Silk Fibroin in Its Efficient Secretion from the Posterior Silk Gland Cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 105, p. 175–180, 1987.

TAN, B; HUANG, Z; YIN, Z; MIN, X; LIU, Y; WU, X; FANG, M. Preparation and thermal properties of shape-stabilized composite phase change materials based on polyethylene glycol and porous carbon prepared from potato. *RSC Advances*, v. 6, p. 15821–15830, 2016.

TANAKA, T; NONAKA, G; KOHNO, I; FUJII, H; NAGAWAKA, T; NISHIOKA, H. *Method of Producing Proanthocyanidin Oligomer*. [S.l: s.n.], 2007

TAO, W; LI, M; XIE, R. Preparation and Structure of Porous Silk Sericin Materials. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 290, p. 188–194, 2005.

TERAMOTO, H; KAMEDA, T; TAMADA, Y. Preparation of Gel Film from *Bombyx mori* Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 72, n. 12, p. 3189–3196, 2008.

TIȚA, D; FULIAȘ, A; TIȚA, B. Thermal stability of ketoprofen: Part 2. Kinetic study of the active substance under isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 111, n. 3, p. 1979–1985, 2013.

TIWARI, G; TIWARI, R; BANNERJEE, S; BHATI, L; PANDEY, S; PANDEY, P; SRIWASTAWA, B. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TOMADON JR., J. *Obtenção da proteína sericina, com alta massa molecular, a partir de casulos Bombyx mori*. 2011. Universidade Estadual de Maringá, 2011.

TØNNESSEN, H H; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, n. 6, p. 621–630, 2002.

TOUS, S; FATHY, M; FETIH, G; GAD, S F. Preparation and Evaluation of Ketoprofen-loaded Calcium alginate beads. *International Journal of PharmaTech Research*, v. 6, n. 3, p. 1100–1112, 2014.

TURBIANI, F R B; TOMADON JR., J; SEIXAS, F L; GIMENES, M L. Properties and Structure of Sericin Films: Effect of the Crosslinking Degree. *Chemical Engineering Transactions*, v. 24, p. 1489–1494, 2011.

UDE, A U; ESHKOOR, R A; ZULKIFILI, R; ARIFFIN, A K; DZURAI DAH, A W; AZHARI, C H. *Bombyx mori* silk fibre and its composite: A review of contemporary developments. *Journal of Materials and Design*, v. 57, p. 298–305, 2014.

UMMADI, S; SHRAVANI, B; RAO, N G R; REDDY, M S; SANJEEV, B. Overview on controlled release dosage forms. *International Journal of Pharma Sciences*, v. 3, n. 4, p. 258–269, 2013.

UYEN, N T T; HAMID, Z A A; TRAM, N X T; AHMAD, N. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, *In press*.

VAITHANOMSAT, P; KITPREECHAVANICH, V. Sericin separation from silk degumming wastewater. *Separation and Purification Technology*, v. 59, p. 129–133, 2008.

VAITHIYALINGAM, S R; TULIANI, P; WILBER, W; REDDY, I K; KHAN, M A. Formulation and stability evaluation of ketoprofen sustained-release tablets prepared by fluid bed granulation with Carbopol 971P solution. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 28, n. 10, p. 1231–40, 2002.

VANE, J R; BOTTING, R M. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *American Journal of Medicine*, v. 104, n. 3A, p. 2S-8S, 1998.

VARMA, M V S; KAUSHAL, A M; GARG, A; GARG, S. Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems. *American Journal of Drug Delivery*, v. 2, n. 1, p. 43–57, 2004.

VASHISTH, P; RAGHUWANSHI, N; SRIVASTAVA, A K; SINGH, H; NAGAR, H; PRUTHI, V. Ofloxacin loaded gellan/PVA nanofibers - Synthesis, characterization and evaluation of their gastroretentive/mucoadhesive drug delivery potential. *Materials Science and Engineering C*, v. 71, p. 611–619, 2017.

VELAZQUEZ PEREDA, M C; POLEZEL, M A; DIEAMANT, G C; NOGUEIRA, C; MARCELINO, A G; ROSSAN, M R; SANTANA, M H A. *Sericin cationic nanoparticles for application in products for hair and dyed hair*. United States of America: [s.n.], 2009

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S. H. Differential scanning calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 21, n. 7, p. 847–855, 1995.

VERBEECK, R K; BLACKBURN, J L; LOEWEN, G R. Clinical Pharmacokinetics of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 8, p. 297–331, 1983.

VERNON, R B; GOODEN, M D; PREISINGER, A; GEBE, J A. Controlled release of monoclonal antibodies from poly-L-lysine-coated alginate spheres within a scaffolded implant mitigates autoimmune responses to transplanted islets and limits systemic antibody toxicity. *Materials Science and Engineering C*, v. 93, n. December 2017, p. 390–398, 2018.

VERZA, S G.; PAVEI, C; ORTEGA, G G. Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 8, p. 1627–1633, 2008.

VIDART, J M M. *Desenvolvimento de partículas à base de sericina e alginato para incorporação de diclofenaco de sódio e ibuprofeno*. 2019. UNICAMP, 2019.

VIDART, J M M; SILVA, T L; ROSA, P C P; VIEIRA, M G A; SILVA, M G C. Development of sericin/alginate particles by ionic gelation technique for the controlled release of diclofenac sodium. *Journal of Applied Polymer Science*, p. 45919, 2018.

VIDART, J M M; NAKASHIMA, M; SILVA, T L; ROSA, P C P; GIMENES, M L; VIEIRA, M G A; SILVA, M G C. Sericin and Alginate Blend as Matrix for Incorporation of Diclofenac Sodium. *Chemical Engineering Transactions*, v. 52, p. 343–348, 2016.

VILLANOVA, J C O; ORÉFICE, R L; CUNHA, A S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n. 1, p. 14, 2010.

VITTAL, G V; DEVESWARAN, R; BHARATH, S; BASAVARAJ, B V; MADHAVAN, V. Formulation and characterization of ketoprofen liquisolid compacts by Box-Behnken design. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 2, n. 3, p. 150–156, 2012.

WADKE, D A; SERAJUDDIN, A T M; JACOBSON, H. Preformulation testing. In: LIEBERMAN, H A; LACHMAN, L; SCHWARTZ, J B (Org.). *Pharmaceutical dosage forms – tablets*. New York:Marcel Dekker, Inc., 1989.WANG, G; WANG, X; HUANG, L. Feasibility of chitosan-alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue engineering: a pilot study in vitro. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 31, n. 4, p. 766–773, 2017.

WANG, H-Y; LI, C; WANG, N; LI, K; FENG, X-W; HE, T; YU, X-Q. Two-step enzymatic selective synthesis of water-soluble ketoprofen–saccharide conjugates in organic media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 1905-1910, 2009.

WANG, L; LIU, J; LONG, Y. Delayed gelation kinetics of hydrogel formation by ionic nano-gel cross-linkers. *Journal of Materials Science*, v. 53, p. 14789–14800, 2018.

WANG, Q; ZHANG, N; HU, X; YANG, J; DU, Y. Alginate/polyethylene glycol blend fibers and their properties for drug controlled release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 82, n. 1, p. 122–128, 2007.

WANG, W; PAN, Y; GONG, K; ZHOU, Q; ZHANG, T; LI, Q. A comparative study of ultrasonic degumming of silk sericin using citric acid, sodium carbonate and papain. *Coloration Technology*, v. 135, n. 3, p. 195–201, 2019.

WANG, Y; BI, S; ZHOU, H; ZHAO, T. Resonance light scattering spectroscopy of procyanidin-CPB-DNA ternary system and its potential application. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 146, p. 255–260, 2015.

WANG, Z; ZHANG, Y; ZHANG, J; HUANG, L; LIU, J; LI, Y; ZHANG, G; KUNDU, S C; WANG, L. Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: an injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel. *Scientific Reports*, v. 4, n. 7064, p. 1–11, 2014.

WANWIMOLRUK, S; LIPSCHITZ, S; ROBERTS, M S. Pharmacokinetics and bioavailability of Naprosyn CR 500 mg tablet, a new controlled-release formulation of naproxen, after single and multiple dosing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 75, p. 55-62, 1991.

WEI, M; SHI, S; WANG, J; LI, Y; DUAN, X. Studies on the intercalation of naproxen into layered double hydroxide and its thermal decomposition by in situ FT-IR and in situ HT-XRD. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 177, n. 7, p. 2534–2541, 2004.

WILLIAMS, J D. A simplified regression formulation of tukey's test. *Journal of Experimental Education*, v. 42, n. 4, p. 80–82, 1974.

WILSON, M J. *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. Londres: Chapman & Hall, 1994.

WIT, P P. *Process to prepare crosslinked cellulose ethers, crosslinked cellulose ethers obtainable by such process and the use thereof*. USA: [s.n.]. 2015

WONGRAKPANICH, S; WONGRAKPANICH, A; MELHADO, K; RANGASWAMI, J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging and Disease*, v. 9, n. 1, p. 143–150, 2018.

XIE, D Y; DIXON, R A. Proanthocyanidin biosynthesis - Still more questions than answers? *Phytochemistry*, v. 66, p. 2127–2144, 2005.

XLI USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA. The United States Pharmacopeial Convention Incorp. 2018.

XU, Q A; MADDEN, T L. *Analytical Methods for Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

XU, S F; ZOU, B; YANG, J; YAO, P; LI, C M. Characterization of a highly polymeric proanthocyanidin fraction from persimmon pulp with strong Chinese cobra PLA 2 inhibition effects. *Fitoterapia*, v. 83, n. 1, p. 153–160, 2012.

XU, Z P; ZENG, Q H; LU, G Q; YU, A B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 1027–1040, 2006.

YALKOWSKY, S H; HE, Y; JAIN, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. 2nd. ed. [S.l.]: CRC Press, 2010.

YOO, Y J; UM, I C. Effect of Extraction Time on the Rheological Properties of Sericin Solutions and Gels. *International Journal of Industrial Entomology*, v. 27, n. 1, p. 180–184, 2013.

YUN, H; OH, H; KIM, M K; KWAK, H W; LEE, J Y; UM, I C; VOOTLA, S K; LEE, K H. Extraction conditions of *Antheraea mylitta* sericin with high yields and minimum molecular weight degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 59–65, 2013.

ZAHARUDDIN, N D; NOORDIN, M I; KADIVAR, A. The use of hibiscus esculentus (Okra) gum in sustaining the release of propranolol hydrochloride in a solid oral dosage form. *BioMed Research International*, v. 2014, n. Figure 1, 2014.

ZAMAN, M; QURESHI, J; EJAZ, H; SARFRAZ, R M; KHAN, H U; SAJID, F R; REHMAN, M S U. Oral controlled release drug delivery system and Characterization of

oral tablets; A review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 1, p. 67, 2016.

ZEESHAN, R; MUTAHIR, Z; IQBAL, H; ALI, M; IQBAL, F; IJAZ, K; SHARIF, F; SHAH, A T; CHAUDHRY, A A. Hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) crosslinked chitosan (CH) based scaffolds containing bioactive glass (BG) and zinc oxide (ZnO) for alveolar bone repair. *Carbohydrate Polymers*, v. 193, n. December 2017, p. 9–18, 2018.

ZERBINI, A P N A; FERRAZ, H G. Sistemas multiparticulados: minicomprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 2, p. 149–158, 2011.

ZHANG, H; SURIAN, J M. Biopharmaceutic Consideration and Assessment for Oral Controlled Release Formulations. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*, p. 33–45, 2010.

ZHANG, X; KHAN, M M R; YAMAMOTO, T; TSUKADA, M; MORIKAWA, H. 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.

ZHANG, X; TANG, K; ZHENG, X. Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. *Journal of Bionic Engineering*, v. 13, n. 1, p. 143–149, 2016.

ZHANG, Y Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*, v. 20, n. 2, p. 91–100, 2002.

ZHANG, Y-Q; TAO, M-L; SHEN, W-D; ZHOU, Y-Z; DING, Y; MA, Y; ZHOU, W-L. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*, v. 25, n. 17, p. 3751–3759, 2004.

ZHANG, Y; LIU, J; HUANG, L; WANG, Z; WANG, L. Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2015.

ZHAO, J; PANG, Y; DIXON, R A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology*, v. 153, n. 2, p. 437–443, 2010.

ZIMMERMANN, B F. *Proanthocyanidins in barley and malt analyzed by pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and HPLC*. 2005. 132 f. Universität Bonn, 2005.

ZWELL, L. X-Ray Diffraction – A Versatile, Quantitative, and Rapid Technique of Metallography. In: ABRAMS, H.; MANIAR, G N (Org.). *Metallography – A Practical Tool for Correlating the Structure and Properties of Materials*. Filadélfia: American Society for Testing and Materials, 1974. p. 23–42.