



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

IÊDA CECÍLIA SALDANHA BEZERRA

**INCORPORAÇÃO DE FUROSEMIDA EM MATRIZ
GASTRORRESISTENTE DE SERICINA E ALGINATO PARA
LIBERAÇÃO MODIFICADA**

CAMPINAS, SP
2018

IÊDA CECÍLIA SALDANHA BEZERRA

**INCORPORAÇÃO DE FUROSEMIDA EM MATRIZ
GASTRORRESISTENTE DE SERICINA E ALGINATO PARA
LIBERAÇÃO MODIFICADA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orietadora: Prof^ª. Dr^ª.MEURIS GURGEL CARLOS DA SILVA

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª.MELISSA GURGEL ADEODATO VIEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA IÊDA
CECÍLIA SALDANHA BEZERRA,
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
MEURIS GURGEL CARLOS DA SILVA

Campinas, São Paulo

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 133444/2017-1; FAPESP, 2015/13505-9

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

B469i Bezerra, Ieda Cecília Saldanha, 1992-
Incorporação de furosemida em matriz gastrorresistente de sericina e alginato para liberação modificada / Ieda Cecília Saldanha Bezerra. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Meuris Gurgel Carlos da Silva.
Coorientador: Melissa Gurgel Adeodato Vieira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Proteínas. 2. Alginatos. 3. Sistemas de liberação de medicamentos. 4. Diuréticos. 5. Eficiência de encapsulação. I. Silva, Meuris Gurgel Carlos da, 1955-. II. Vieira, Melissa Gurgel Adeodato, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Incorporation of furosemide into sericin and alginate gastro-resistant matrix for modified release

Palavras-chave em inglês:

Proteins

Alginates

Drug release systems

Diuretics

Encapsulation Efficiency

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Meuris Gurgel Carlos da Silva [Orientador]

Marcus Bruno Soares Forte

Roniérik Pioli Vieira

Data de defesa: 22-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Iêda Cecília Saldanha Bezerra e aprovada em 22 de Agosto de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Meuris Gurgel Carlos da Silva

Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte

Prof. Dr. Roniérík Pioli Vieira

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família, ao meu pai Arnaldo, às minhas irmãs Isolda, Isadora e Analu e, principalmente, à minha mãe Ana Maria e à minha tia Fátima, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu desacreditei. Todas as minhas vitórias também pertencem a vocês.

Ao Igor, pela paciência e pelo apoio durante todo esse processo.

À minha orientadora Prof^a Meuris Gurgel Carlos da Silva e minha co-orientadora Prof^a Melissa Gurgel Adeodato Vieira, pelo acompanhamento e orientação durante esse trabalho.

A todos aqueles que fazem parte do LEA/LEPA, em especial aos amigos Camila, Manu, Geovani, Jacyara, Júlia, Maria Fernanda, Nilza, Talles e Thiago. Agradeço pelos conselhos, pelas orientações e pelo companheirismo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química - Unicamp pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica que colaboram com os trabalhos do grupo de pesquisa do LEA/LEPA, em especial à Maryenne, pelo esforço e dedicação.

Agradeço à equipe do LRAC, que tanto me auxiliou nas análises e à empresa de fiação BRATAC pela doação dos casulos utilizados nesse estudo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, à Capes e à Fapesp (Proc. 2015/13505-9) pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que, embora não mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A forma de administração de fármaco mais comum é a via oral devido sua praticidade e maior aceitabilidade dos pacientes. Grande parte dos medicamentos concebidos para administração oral é de liberação imediata, ou seja, liberam a dose do fármaco em um curto período de tempo logo após a sua ingestão. A grande variação das concentrações do fármaco no organismo causadas por esse tipo de medicamento pode ser prejudicial ao paciente, seja quando a quantidade de fármaco está abaixo da faixa terapêutica, não atingindo o efeito desejado, ou quando sua concentração é maior que a indicada, acarretando aumento dos efeitos colaterais. Formulações de liberação modificada prometem amenizar os problemas inerentes aos medicamentos de liberação imediata por modificação da sua forma de encapsulação, eliminando a necessidade de desenvolvimentos de novos fármacos, processo que demanda muito tempo e alto investimento financeiro. Neste trabalho foi produzida uma matriz polimérica para incorporação de fármaco, no caso, de furosemida, a base de sericina e alginato para liberação modificada. A sericina é um resíduo da indústria têxtil com grande potencial para as aplicações farmacêuticas devido a suas propriedades como resistência à oxidação, atividade antibacteriana e antimicrobiana, proteção contra radiação solar ultravioleta e fácil absorção e liberação de umidade. O seu aproveitamento pode trazer benefícios econômicos e ambientais. O alginato é um biopolímero, extraído de algas marrons, que serve como agente gelificante, amplamente utilizado na área farmacêutica, principalmente no estudo de sistemas de liberação controlada. A furosemida, diurético aplicado no tratamento de edemas hepáticos, cardíacos e renais, foi incorporada à blenda de sericina e alginato a fim de modificar a sua liberação. As partículas foram produzidas por gotejamento e reticuladas ionicamente em solução de CaCl_2 . As partículas que apresentaram maior eficiência de incorporação e tempo de liberação foram modificadas por reticulação térmica ou covalente, por tratamento térmico ou adição do agente reticulante proantocianidina, respectivamente. As eficiências de incorporação das formulações estudadas variaram de $99,84 \pm 0,20$ a $73,39 \pm 2,05\%$, sendo as partículas com maior quantidade de furosemida aquelas com melhor resultado. O tempo de liberação atingido pelas formulações estudadas variou entre 420 e 720 minutos, tempo superior ao apresentado por medicamentos comerciais. As formulações com sericina apresentaram liberação em tempo mais prolongado que as formulações contendo somente alginato. Além de prolongada, a liberação foi considerada retardada devido o caráter gastrorresistente da blenda. O mecanismo de liberação foi controlado pelo relaxamento e absorção de água pelas partículas e pela erosão da matriz, em alguns casos. A presença de furosemida na matriz polimérica foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura, difração de raio X e espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier. A estabilidade térmica da furosemida não foi alterada com a sua incorporação à blenda de sericina e alginato. O diâmetro médio das partículas produzidas foi entre $1,438 \pm 0,121$ e $1,620 \pm 0,108$ mm. As partículas sofreram alterações físicas durante o estudo de estabilidade acelerado.

Palavras-chave: blenda, sericina, alginato, incorporação de fármaco, furosemida, liberação modificada de fármaco.

ABSTRACT

The most common form of drug administration is the oral route because of its practicality and greater patient acceptability. Most of the drugs designed for oral administration are immediate release, in other words, they release the drug dose in a short period of time shortly after ingestion. The great variation of the concentrations of the drug in the organism caused by this type of drug can be harmful to the patient, either when the amount of drug is below the therapeutic range, not reaching the desired effect or when its concentration is higher than indicated, leading to increased side effects. Modified release formulations promise to alleviate the inherent problems of immediate release drugs by modifying their encapsulation form, eliminating the need for new drug developments, a time-consuming process and high financial investment. In this work, a polymeric matrix was produced for incorporation of drug, in this case, furosemide, based on sericina and alginate for modified release. Sericin is a textile waste with great potential for pharmaceutical applications due to its properties such as oxidation resistance, antibacterial and antimicrobial activity, protection against ultraviolet solar radiation and easy absorption and release of moisture. Its use can bring economic and environmental benefits. Alginate is a biopolymer, extracted from brown algae, which serves as a gelling agent, widely used in the pharmaceutical field, mainly in the study of controlled release systems. Furosemide, a diuretic applied in the treatment of hepatic, cardiac and renal edema, was incorporated into the sericin and alginate blend in order to modify its release. The particles were produced by dripping and ion-crosslinked in CaCl_2 solution. The particles which had the greatest incorporation efficiency and release time were modified by thermal or covalent crosslinking by heat treatment or addition of the proanthocyanidin crosslinking agent, respectively. The incorporation efficiencies of the studied formulations ranged from 99.84 ± 0.20 to $73.39 \pm 2.05\%$, the particles with the highest amount of furosemide being those with the best results. The release time achieved by the formulations studied ranged from 420 to 720 minutes, longer than commercial drugs. Formulations with sericin showed longer release time than formulations composed for alginate and furosemide only. Besides prolonged, the release was considered delayed due to the gastroresistant character of the blend. The mechanism of release was controlled by the relaxation and absorption of water by the particles and the erosion of the matrix, in some cases. The presence of furosemide in the polymer matrix was confirmed by scanning electron microscopy, X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. The thermal stability of furosemide was not altered with its incorporation into the sericin and alginate blend. The average diameter of the particles produced was between 1.438 ± 0.121 and 1.620 ± 0.108 mm. The particles underwent physical changes during the accelerated stability study.

Key words: blend, sericin, alginate, drug incorporation, furosemide, modified drug release.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Vias de administração e concentração do fármaco no organismo	17
Figura 2.2 – Perfis de liberação: convencional e modificadas	19
Figura 2.3 – Esquema de liberação de fármaco contido em forma farmacêutica matricial de liberação controlada, utilizando (a) matriz insolúvel (b) matriz hidrofílica.....	23
Figura 2.4 – Esquema de liberação de fármaco contido em formas farmacêuticas do tipo sistemas de reservatório de liberação controlada	23
Figura 2.5 – Esquema de liberação de fármaco contido em formas farmacêuticas do tipo sistemas de bombas osmóticas de liberação controlada	24
Figura 2.6 – Esquema das etapas farmacocinéticas do fármaco.....	27
Figura 2.7 – Ciclo de vida do <i>Bombyx mori</i>	34
Figura 2.8 – Fio da seda.	36
Figura 2.9 – Estrutura química do alginato	39
Figura 2.10 – Modelo “caixa de ovo”	40
Figura 2.11 – Estrutura representativa das procianidinas, principal componente das proantocianidinas.....	42
Figura 2.12 – Esquema do local de ação da furosemida no organismo.....	43
Figura 2.13 – Estrutura da furosemida	44
Figura 3.1 – Casulos do bicho-da-seda: (a) antes de serem preparados (b) limpos e cortados	47
Figura 3.2 – Aparato experimental - gotejamento	49
Figura 4.1- Perfil de liberação da furosemida nas formulações estudadas.....	58
Figura 4.2 – Perfil de liberação da furosemida em medicamentos comerciais	60
Figura 4.3 – Perfil de distribuição de tamanho.....	66
Figura 4.4 – Micrografias da furosemida pura (FUR), da partícula de sericina/alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida. Ampliação de: (a) 150x e (b) 1500x ..	68
Figura 4.5 – Difractogramas de raio X da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida.....	69
Figura 4.6 – TG, DTG e DTA da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida.....	70
Figura 4.7 – Espectro FTIR da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida.....	74
Figura 4.8 – Perfil de liberação das partículas F2 e F4 após estudo de estabilidade.....	76
Figura 4.9 – Cápsulas de F2 e F4 após estudo de estabilidade acelerada	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Aplicações do método de gelificação iônica	26
Tabela 2.2 – Interpretação do mecanismo de liberação difusional do modelo de Korsmeyer-Peppas.....	31
Tabela 3.1 – Formulações para avaliação da eficiência de incorporação e perfil de liberação de fármaco	50
Tabela 4.1 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco das partículas F1 – F5..	56
Tabela 4.2 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco	56
Tabela 4.3 – Quantidade de furosemida liberada em meio ácido.....	61
Tabela 4.4 – Ajuste dos modelos matemáticos para as formulações estudadas	62
Tabela 4.5 – Diâmetro médio e coeficiente de determinação ajustado	65
Tabela 4.6 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco das partículas F2 e F4 após teste de estabilidade acelerado	75
Tabela 4.7 – Quantidade de furosemida liberada em meio ácido pelas formulações F2 e F4 após estudo de estabilidade.....	77
Tabela 4.8 – Ajuste dos modelos matemáticos para as formulações F2 e F4 após teste de estabilidade acelerado.....	78

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	9
SUMÁRIO.....	10
CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	13
1.1 Introdução.....	13
1.2. Objetivo	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2. Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO 2	17
2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Liberação de fármacos.....	17
2.1.1. Propriedades físico-químicas dos fármacos para liberação modificada	19
2.1.2. <i>Tecnologias para desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada</i>	21
2.2. Métodos de preparação de partículas carregadas com fármacos.....	24
2.3. Farmacocinética.....	26
2.3.1. <i>Etapas farmacocinéticas do fármaco no organismo</i>	26
2.3.2. <i>Modelos matemáticos</i>	29
2.4. Materiais utilizados na confecção da matriz carreadora.....	32
2.4.1. <i>Sericina</i>	33
2.4.1.1. Extração e separação da sericina.....	36

2.4.2. Alginato	38
2.4.3. Agente reticulante: Proantocianidinas.....	40
2.5. Furosemida	42
CAPÍTULO 3	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1. Material e Equipamentos.....	46
3.2. Metodologia.....	47
3.2.1. Preparação dos casulos do <i>Bombyx mori</i>	47
3.2.2. Extração da sericina.....	47
3.2.3. Separação e Fracionamento da Sericina	48
3.2.4. Determinação da Concentração de Sericina	48
3.2.5. Preparação da blenda sericina/alginato, da partícula de alginato e incorporação do fármaco	49
3.2.5.1. Modificação na partícula de sericina e alginato por adição de proantocianidina.....	50
3.3. Caracterização das Partículas Carregadas com Fármacos.....	51
3.3.1. Eficiência de incorporação e de carregamento de Furosemida	51
3.3.2. Diâmetro, Distribuição de Tamanho e Análise Morfológica das Partículas.....	52
3.3.3. Cristalinidade	52
3.3.4. Análises Térmicas.....	52
3.3.5. Grupos Funcionais	53
3.4. Dissolução <i>In Vitro</i> e Modelagem da Cinética de Liberação	53
3.5. Estudo da Estabilidade	54
CAPÍTULO 4	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Eficiência de incorporação e carregamento da furosemida.....	55
4.2. Dissolução <i>In Vitro</i> e Modelagem da Cinética de Liberação	57

4.2.1. Perfil de liberação In Vitro	57
4.2.2. Modelagem matemática da cinética de liberação	61
4.3. Caracterização das partículas carregadas com fármaco	65
4.3.1. Diâmetro, Distribuição de Tamanho e Análise Morfológica das Partículas... 65	
4.3.2. Cristalinidade (DRX).....	69
4.3.3. Análises Térmicas.....	70
4.3.4. Grupos funcionais	73
4.4. Estudo de Estabilidade	74
4.5. Considerações sobre os resultados obtidos.....	79
CAPÍTULO 5	80
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	80
5.1. Conclusões.....	80
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	81
REFERÊNCIAS	82

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

A administração de fármacos via oral é a mais empregada entre todas as vias que são exploradas para administração medicamentosa de produtos farmacêuticos com diferentes dosagens. A via oral é considerada mais natural, conveniente e segura devido à sua facilidade de administração, aceitação pelo paciente e custo efetivo do processo de fabricação. Produtos farmacêuticos preparados para administração oral são principalmente do tipo de liberação imediata, também conhecidos como sistemas de administração de fármacos convencionais, concebidos para liberação instantânea de fármaco para rápida absorção (Ummadi *et al.*, 2013).

O uso de medicamentos de liberação imediata apresenta entre suas limitações a necessidade de doses frequentes e as variações bruscas da concentração do princípio no plasma sanguíneo, que podem levar a episódios de dosagem excessiva ou insuficiente (Collett e Moreton, 2001; Ummadi *et al.*, 2013). As altas concentrações de fármaco no organismo podem evidenciar os efeitos colaterais de drogas, como a furosemida. A fim de superar os problemas apresentados pelos medicamentos de liberação convencional, surge o sistema de liberação modificada, no qual o fármaco é liberado em período maior do que na forma convencional. A modificação na maneira de encapsulação dos princípios ativos já existentes, a fim de modificar a sua liberação, é mais vantajosa do que o desenvolvimento de princípios ativos que não provoquem os efeitos adversos citados, por esse processo ser extremamente caro e demorado (Tiwari *et al.*, 2012).

Na busca por sistemas de liberação modificada encontram-se os sistemas multiparticulados, que são formas farmacêuticas que consistem na união de diversas pequenas unidades que podem ser *pellets*, grânulos ou pequenas esferas. Para fornecer a dose total desejada, essas pequenas unidades são encapsuladas ou compactadas, por essa razão, o sistema particulado apresenta flexibilidade na formulação, já que para mudar a dose total basta variar a quantidade de pequenas unidades empregadas. Além disso, por ter tamanho reduzido, as unidades do sistema particulado tendem a serem mais bem distribuídas e causar menos irritação local (Dey *et al.*, 2008). Nesses sistemas, as micropartículas funcionam como

um sistema matricial no qual o fármaco está dissolvido. O fármaco é liberado da matriz através de difusão, erosão da matriz ou uma combinação dos dois.

A furosemida, objeto de estudo deste trabalho, é um diurético de alça que produz um efeito potente com início de ação rápida e de curta duração. É empregada no tratamento de hipertensão arterial leve a moderada, edema devido a distúrbios cardíacos, hepáticos e renais e edema devido a queimaduras (Granero *et al.*, 2010).

Um dos efeitos adversos observado com o uso desta droga, quando administrada em forma de comprimidos convencionais, são os períodos curtos e intensos de diurese, o que acarreta incômodo aos pacientes. A modificação da forma farmacêutica para o sistema de liberação prolongada produz o mesmo efeito diurético, porém sem o desconforto causado pela diurese rápida e intensa. Formas farmacêuticas que utilizam comprimidos podem ser desastrosas tanto pela falha na liberação da droga como na liberação exagerada, causando superdosagem. O sistema multiparticulado, proposto por esse trabalho, pode distribuir amplamente as partículas contendo o fármaco ao longo do sistema gastrointestinal, atingindo assim uma liberação mais uniforme (Das e Senapati, 2008).

A blenda polimérica de sericina e alginato vem sendo estudada como matriz com a finalidade de promover a liberação prolongada de fármacos. Khandai *et al.* (2010) estudaram a incorporação de aceclofenaco na blenda, Vidart *et al.* (2018) a incorporação de diclofenaco de sódio, Freitas *et al.* (2018a) a incorporação de ibuprofeno e cetoprofeno (2018b). Os últimos trabalhos citados utilizaram a técnica de gelificação iônica por gotejamento que tem apresentado excelentes resultados para obtenção de micropartículas de sericina e alginato com fármaco incorporado (Vidart *et al.*, 2015).

A sericina, proteína globular e hidrossolúvel, é extraída do casulo do *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda. A fibra de seda é constituída por duas proteínas: fibroína e sericina. A sericina constitui 25-30% da massa do casulo e envelopa a fibroína, formando uma camada colante que ajuda na formação do casulo (Zhang, 2002). A fibroína é, principalmente, usada para confeccionar os tecidos de seda enquanto a sericina é usualmente descartada no efluente da indústria. A prática de descarte pode trazer prejuízo ambiental para os recursos hídricos devido à alta quantidade de oxigênio necessária para decompor a carga desta matéria orgânica. Ela possui características que a torna usual para outras aplicações, principalmente nas áreas médicas e farmacêuticas (Zhang, 2002). Dentre

essas características estão a biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de reticular, polimerizar e formar blendas (Barajas-Gamboa *et al.*, 2016). O aproveitamento desta proteína pode trazer benefícios econômicos e ambientais.

Com o intuito de melhorar as propriedades da sericina, estudos têm investigado a formação de blendas a partir dessa proteína (Zhang, 2002). Um dos compostos que pode ser usado para isso é o alginato, polímero natural extraído de algas marrons, que tem grande aplicação nas áreas médicas e farmacêutica, devido sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo relativamente baixo e elevada capacidade de formar géis, principalmente na presença de cátions divalentes, como Ca^{2+} (Lee e Mooney, 2012). Além disso, géis de alginato protegem a membrana do trato intestinal contra irritações químicas, protege os fármacos que são sensíveis ao ambiente ácido do suco gástrico e ainda são capazes de liberar compostos de maneira controlada, devido a sua capacidade de intumescimento (Hwang *et al.*, 1995).

A furosemida já foi avaliada para incorporação em partículas de alginato (Das e Senapati, 2008). Porém, não há dados sobre a sua incorporação em blenda de sericina e alginato. Com a adição da sericina na blenda, as propriedades mecânicas das partículas foram melhoradas em relação às partículas formadas somente com o alginato. Com isso, é possível destacar a importância deste trabalho na avaliação de uma blenda formada por materiais sustentáveis, biocompatíveis e de baixo custo para incorporação de furosemida. Modelos matemáticos foram avaliados visando um melhor entendimento do mecanismo da liberação do fármaco

1.2. Objetivo

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de uma forma farmacêutica a partir de partículas formadas pela blenda de sericina e alginato, para incorporação de furosemida visando à avaliação de liberação modificada deste fármaco. Para o desenvolvimento do estudo, os seguintes objetivos específicos foram realizados.

1.2.2. Objetivos específicos

- a) Preparação dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*): limpeza e corte;
- b) Extração da sericina dos casulos do *Bombyx mori* por autoclave;
- c) Fracionamento da sericina por congelamento e descongelamento em temperatura ambiente, e posterior separação da sericina de alta massa molar;
- d) Formação de blenda de sericina e alginato, seguida da incorporação de furosemida, por agitação em Ultraturrax®;
- e) Preparação de micropartículas de sericina/alginato/fármaco em diferentes proporções de alginato e furosemida, pelo método de gelificação por gotejamento em solução de cloreto de cálcio 3% (m/V);
- f) Avaliação da eficiência de incorporação da furosemida;
- g) Caracterização das micropartículas com e sem furosemida incorporada pelos métodos de Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) e Análises Térmicas de Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG/DTG e DTA);
- h) Avaliação da taxa de liberação do fármaco *in vitro* através de testes de dissolução em meios de simulação dos ambientes gástrico e entérico;
- i) Avaliação dos mecanismos de incorporação da furosemida por ajuste de modelos farmacocinéticos;
- j) Estudo de estabilidade das formulações obtidas.

CAPÍTULO 2

Neste capítulo serão apresentadas a revisão bibliográfica e a fundamentação teórica dos assuntos relativos à realização dessa dissertação de mestrado.

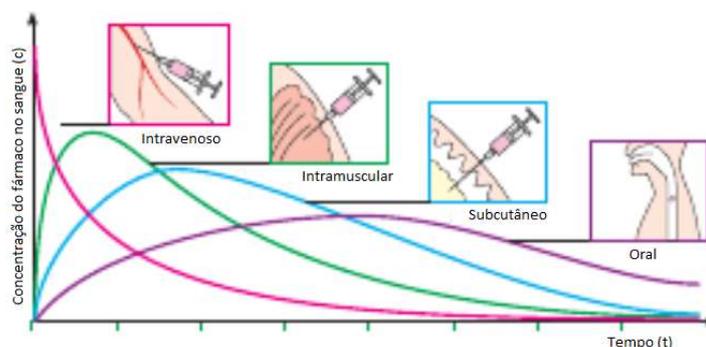
2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Liberação de fármacos

Medicamento é um produto que tem como finalidade curar, prevenir ou amenizar os sintomas de enfermidades, enquanto fármaco é o princípio ativo contido no medicamento, de acordo com a definição apresentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (1973) (Ministério da Saúde, 1998).

Os medicamentos podem ser administrados por vias oral, retal, sublingual, intravenosa, dermatológica, nasal, oftálmica, dentre outras (Figura 2.1). De todas as vias existentes, a oral é a mais comumente empregada. Medicamentos deste tipo são considerados seguros, convenientes, de fácil administração, baixo custo de fabricação e têm grande aceitação do paciente. Os produtos farmacêuticos concebidos para administração oral são principalmente de liberação convencional (Buxton e Benet, 2012; Ummadi *et al.*, 2013).

Figura 2.1 – Vias de administração e concentração do fármaco no organismo



Fonte: Adaptado de Lüllmann *et al.* (2000)

As formas farmacêuticas com liberação convencional ou imediata são aquelas que não sofrem nenhum tipo de alteração no tempo ou local de liberação e são concebidas para liberar rapidamente a dose completa de fármaco nela contida, imediatamente após a administração. Além disso, supõe-se que o fármaco liberado esteja numa forma terapeuticamente ativa e imediatamente disponível para absorção (Collett e Moreton, 2001).

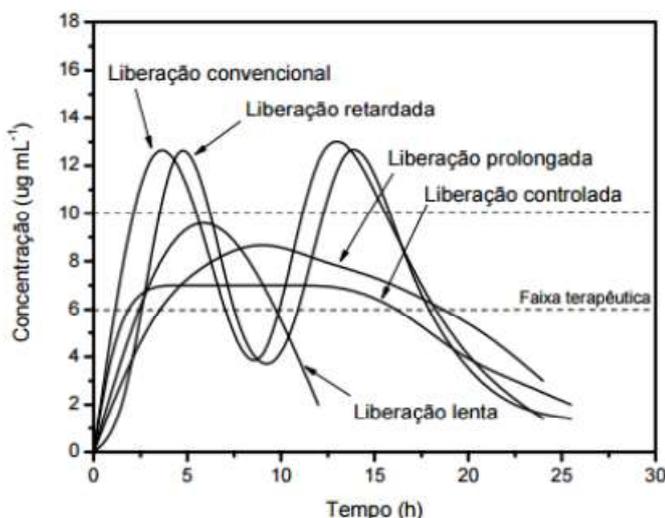
A liberação imediata apresenta algumas limitações, dentre elas encontra-se a flutuação da concentração do fármaco no plasma sanguíneo devido às dosagens sucessivas, logo não é possível manter a concentração terapêutica do fármaco durante o tratamento. Essas flutuações podem levar as concentrações de fármaco abaixo ou acima do nível terapêutico. Além disso, para fármacos que tem meia-vida biológica curta, são necessárias dosagens frequentes, a fim de manter as concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica. Nesse caso, a manutenção dessas concentrações está diretamente ligada à adesão do paciente ao tratamento. O esquecimento de uma dose pode ser a causa da ineficiência ou falha terapêutica (Collett e Moreton, 2001; Rhodes, 2002).

Com o intuito de superar as limitações inerentes ao sistema de liberação convencional, novas soluções têm sido estudadas a fim de modificar a forma em que os princípios ativos são liberados. O desenvolvimento de novos fármacos muitas vezes não é viável por ser um processo caro e demorado, podendo levar em média 12 anos para seu lançamento no mercado. Com isso, tem-se buscado modificar as formas de encapsulação de drogas já existentes. Esses sistemas de liberação modificada podem apresentar vantagens como menor toxicidade, ação em local específico, maior eficácia terapêutica e diminuição de efeitos adversos (Zerbini e Ferraz, 2011; Tiwari *et al.*, 2012; Bhagwat e Vaidhya, 2013).

Segundo Collett e Moreton (2001), as formas de liberação que visam contornar os problemas apresentados pelas formas convencionais podem ser classificadas em liberação retardada, prolongada, repetida, sustentada, estendida e controlada (Figura 2.2). A liberação retardada é aquela na qual o princípio ativo não é liberado imediatamente após a sua administração, mas após um intervalo de tempo. Na liberação prolongada, o princípio ativo é liberado no organismo para absorção em período de tempo maior que a liberação convencional. A liberação repetida consiste na liberação do fármaco em duas ou três etapas: a primeira logo após a sua administração e as doses subsequentes são liberadas posteriormente. Já na liberação sustentada ocorre a liberação inicial suficiente para proporcionar a dose terapêutica logo após a administração seguida de uma liberação gradual por período prolongado. Na liberação estendida, o fármaco é liberado lentamente de modo a manter a concentração terapêutica por períodos de tempo prolongado, que podem chegar até 12 horas. A liberação controlada é caracterizada pela liberação do fármaco em quantidade suficiente para suprir o nível terapêutico a uma taxa constante. A liberação modificada é aquela cujas características de liberação de

fármaco no curso do tempo e/ou localização são escolhidas para atingir objetivos terapêuticos ou de conveniência, não oferecidos por formas convencionais.

Figura 2.2 – Perfis de liberação: convencional e modificadas



Fonte: Rodrigues (2005)

Os métodos de liberação modificada apresentam um maior controle na manutenção da concentração terapêutica do fármaco no organismo, com isso tem-se a melhoria no tratamento de doenças crônicas, onde os sintomas aparecem caso a concentração do princípio ativo esteja abaixo do requerido (asma, depressão). Além disso, ocorre uma manutenção da ação terapêutica do fármaco em períodos sem dosagens, como na noite. Outra vantagem é a redução na incidência de superdosagem, uma vez que o fármaco é liberado lentamente, com isso, efeitos colaterais causados pelo excesso da droga no organismo são amenizados. Esse tipo de liberação também ocasiona a melhor adesão do paciente ao tratamento, resultante da redução do número e da frequência de doses necessárias para manter a ação terapêutica desejada (Collett e Moreton, 2001).

2.1.1. Propriedades físico-químicas dos fármacos para liberação modificada

Quando um fármaco de liberação modificada é administrado, ele pode ter sua absorção ao longo de todo o trato gastrointestinal ou em local específico. Como o trato gastrointestinal apresenta grande variação de composição, estrutura e função desde o estômago até o cólon, as propriedades do fármaco devem ser analisadas em função da posição no trato gastrointestinal, a fim de avaliar a sua aptidão para a forma de liberação

modificada (Zhang e Surian, 2010). Dentre as principais propriedades a serem analisadas estão o pKa, a solubilidade em água, o coeficiente de partição e a estabilidade do composto.

O pKa expressa a força de um ácido ou base e permite determinar a carga de um fármaco em qualquer valor de pH. A grande maioria dos fármacos são ácidos ou bases fracas. Quando apresentados em sua forma não ionizada, os fármacos têm maior facilidade em permear as membranas lipídicas, logo é importante avaliar a relação entre o pKa e o local de absorção. A desvantagem de administrar o princípio ativo na sua forma não ionizada é que, geralmente, essa apresenta menor solubilidade em água, extremamente necessária para os sistemas que utilizam a difusão e dissolução. Compostos os quais apresentam solubilidade muito baixa são inerentemente de liberação sustentada, uma vez que sua liberação é limitada a sua dissolução no trato gastrointestinal. Por outro lado, esse tipo de droga não pode ser utilizada em sistemas que necessitam da difusão, uma vez que a força motriz, que é a concentração da droga em solução, será baixa (Ashford, 2001a; Jantzen e Robinson, 2002).

Várias drogas são pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal, apesar de predominarem em suas formas não ionizadas. Isso ocorre porque a absorção de fármacos também é afetada pela solubilidade lipídica dessas drogas. Uma indicação da solubilidade lipídica de um fármaco é dada pela a sua capacidade de separação entre um solvente orgânico e um tampão aquoso, conhecido como coeficiente de partição (Ashford, 2001a). O coeficiente de partição é definido como a razão entre a fração do fármaco na fase orgânica e a sua fração na fase aquosa. A avaliação desse parâmetro é importante para se verificar a facilidade com que os princípios ativos passam através das membranas biológicas, que podem ser consideradas lipídicas, até atingir o seu nível terapêutico desejado. Substâncias com alto coeficiente de partição são mais solúveis na fase óleo do que na fase água, resultando na sua permanência prolongada no organismo uma vez que ficam retidos na membrana lipídicas das células (Jantzen e Robinson, 2002).

A estabilidade das drogas em fluidos gastrointestinais depende da estabilidade química do fármaco ao longo da faixa de pH gastrointestinal, que varia entre 1 e 8, e da sua suscetibilidade à degradação enzimática pelos fluidos gastrointestinais. Os fármacos administrados oralmente estão sujeitos tanto à hidrólise ácida e básica quanto à

degradação enzimática. A degradação procederá a uma taxa reduzida para drogas no estado sólido, logo essa forma é preferível. Para medicamentos que são instáveis no estômago a mudança é vantajosa para o sistema que prolonga a liberação ao longo do trato gastrointestinal. Os compostos que são instáveis no intestino delgado podem demonstrar diminuição da biodisponibilidade quando administrados a partir de uma forma de liberação sustentada. Isso ocorre porque mais droga é liberada no intestino delgado e, portanto, está sujeita a degradação (Ashford, 2001b; Jantzen e Robinson, 2002).

2.1.2. Tecnologias para desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada

As formas farmacêuticas sólidas orais podem ser constituídas por sistemas monolíticos ou multiparticulados. Os sistemas monolíticos são aqueles que consistem em uma única unidade contendo uma dose de princípio ativo que deve ser administrada individualmente. Esse sistema pode conter altas dosagens do fármaco, tem produção simples e de baixo custo e está disponível em uma grande quantidade de matrizes poliméricas para liberação controlada. Os sistemas multiparticulados são compostos por múltiplas unidades que, quando combinadas, formam a dose farmacêutica desejada, essa característica confere a esse sistema uma flexibilidade de dosagem, uma vez que basta alterar a quantidade de partículas na dose total para alterar a quantidade de fármaco administrada. As unidades que constituem esse sistema podem ser *pellets*, grânulos ou esferas. Outras vantagens apresentadas pelo sistema multiparticulados são a dispersão das suas unidades no trato gastrointestinal, maximizando a absorção do fármaco; a redução do tempo de passagem pelo organismo, minimizando possíveis variações no plasma; e quando em formulações de liberação modificada, são menos suscetíveis a superdosagem (Gandhi *et al.*, 1999; Pezzini *et al.*, 2007). Além disso, sistemas multiparticulados são capazes de veicular, num único medicamento, fármacos incompatíveis entre si, desde que os mesmos estejam em subunidades diferentes (Dey *et al.*, 2008; Zerbini e Ferraz, 2011).

Dentre as tecnologias disponíveis para conceber formas farmacêuticas, monolíticas ou multiparticuladas, para liberação modificada de fármacos destacam-se os sistemas matriciais, reservatórios e bombas osmóticas. Independente do sistema utilizado, o

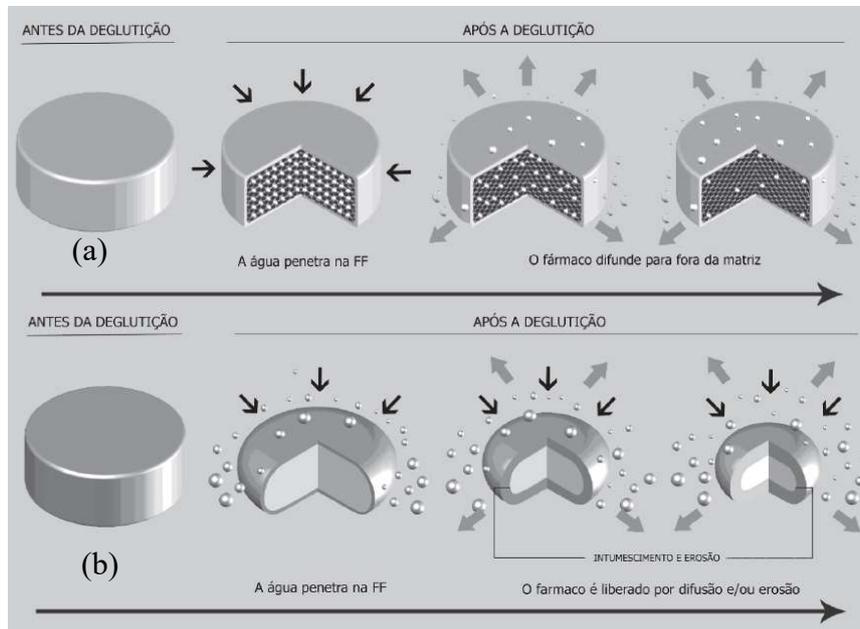
princípio empregado na liberação de fármacos é que, em uma solução, a difusão de drogas ocorrerá de uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração. Essa diferença de concentração é a força motriz para a difusão de drogas fora de um sistema. A água se difunde para o interior do sistema de maneira análoga. Para isso, deve haver uma abundância de água no meio circundante e o sistema deve permitir a penetração da água. O interior do sistema normalmente tem um menor teor de água inicialmente do que o meio circundante (Collett e Moreton, 2001).

As matrizes são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação (Figura 2.3). Dentre os materiais utilizados para a confecção dessas matrizes estão os polímeros hidrofílicos e os inertes. Quando as matrizes são hidrofílicas, a liberação é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão. Neste caso, o polímero é hidratado e intumescce quando entra em contato com os fluidos gastrointestinais. Essa camada superior é dissolvida, promovendo a erosão da forma farmacêutica. Após a erosão dessa camada, outras serão hidratadas e erodidas até que todo o fármaco seja totalmente liberado. O fármaco é liberado por difusão através dessas camadas gelificadas e/ou erosão da matriz. No caso das matrizes inertes, também chamadas de insolúveis, o fármaco é liberado por difusão, ou seja, a taxa de liberação depende da passagem das moléculas de fármaco em solução aquosa através de uma rede de capilares formada entre partículas de polímero compactadas (Collett e Moreton, 2001; Pezzini *et al.*, 2007). Os sistemas matriciais acomodam fármacos com propriedades físico-químicas variadas e podem conter o fármaco em concentrações baixas ou altas. Quando em comparação aos sistemas reservatórios e bombas osmóticas, o sistema matricial é econômico e de fácil escalonamento e fabricação (Qiu e Zhou, 2011).

Os sistemas de reservatórios (Figura 2.4) são normalmente utilizados para controlar a taxa de liberação de princípios ativos hidrossolúveis. Esses sistemas são constituídos de um núcleo contendo o fármaco envolto por uma membrana polimérica, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Quando essa membrana é microporosa, a liberação do fármaco ocorre através da sua difusão nos poros da membrana. No caso de membranas não porosas, a liberação é dada pela difusão através do polímero, nesse caso, a quantidade de fármaco liberado depende da interação entre a membrana e o princípio ativo (Pezzini *et al.*, 2007). O sistema reservatório é preferencialmente multiparticulado, uma vez que, por ser constituído por uma grande quantidade de

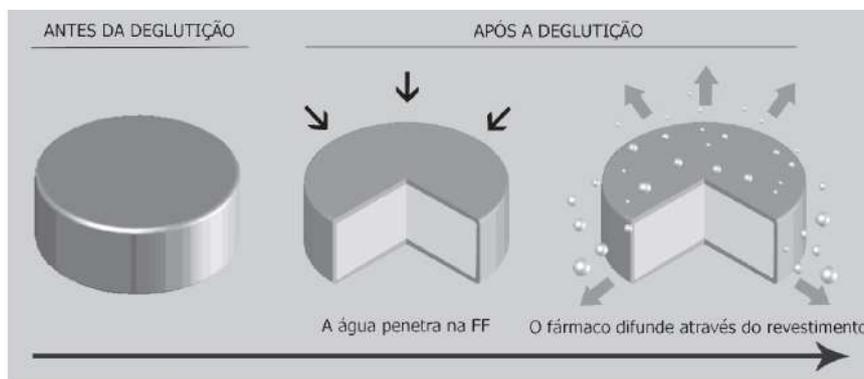
partículas, é capaz de minimizar ou eliminar o impacto de qualquer defeito de revestimento individual do sistema monolítico (Qiu e Zhou, 2011).

Figura 2.3 – Esquema de liberação de fármaco contido em forma farmacêutica matricial de liberação controlada, utilizando (a) matriz insolúvel (b) matriz hidrofílica.



Fonte: Pezzini *et al.* (2007)

Figura 2.4 – Esquema de liberação de fármaco contido em formas farmacêuticas do tipo sistemas de reservatório de liberação controlada

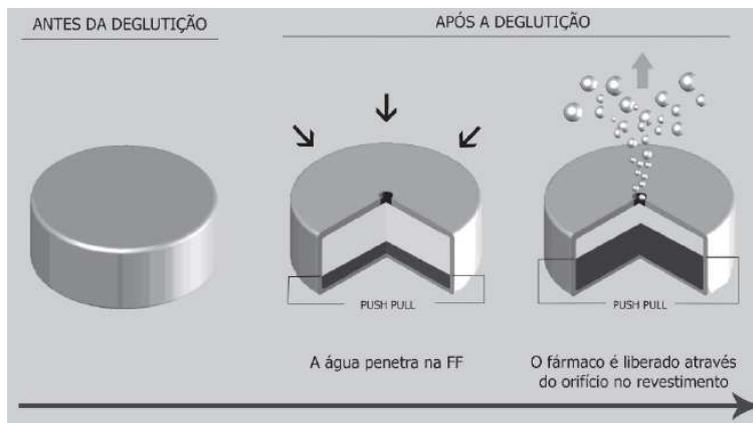


Fonte: Pezzini *et al.* (2007)

Os sistemas conhecidos como bombas osmóticas (Figura 2.5) utilizam a pressão osmótica para modular a liberação do fármaco. Nesse caso, a forma farmacêutica consiste em um núcleo revestido com membrana semipermeável, que contém um orifício feito a *laser*. No núcleo, está presente um agente osmótico, que pode ou não ser o princípio ativo. O fármaco é liberado através do aumento da pressão interna, causado pela penetração de solvente presente no meio (Pezzini *et al.*, 2007). Além da pressão

osmótica, o tamanho do orifício, a natureza da membrana e a solubilidade do fármaco também controlam a sua liberação (Verma *et al.*, 2002).

Figura 2.5 – Esquema de liberação de fármaco contido em formas farmacêuticas do tipo sistemas de bombas osmóticas de liberação controlada



Fonte: Pezzini *et al.* (2007)

Independente do sistema de liberação e do tipo de forma farmacêutica, o uso de excipientes específicos se faz necessário. Esses materiais são, geralmente, polímeros com características e propriedades especiais, tais como: capacidade de formação de estruturas (matrizes ou membranas) microporosas/semipermeáveis, capacidade de intumescimento (expansão) em contato com a água e capacidade de complexação com fármacos (Pezzini *et al.*, 2007).

2.2. Métodos de preparação de partículas carregadas com fármacos

A tecnologia dos carreadores de fármaco oferece uma abordagem inteligente para a sua administração, acoplando-os a uma partícula transportadora como as micropartículas, que modula as características de liberação e absorção da droga. Essas pequenas unidades, que tem tamanho entre 1 μm até poucos milímetros, consistem em um sistema onde a droga está homoganeamente dissolvida ou dispersa em uma matriz polimérica. Essas estruturas possibilitam a proteção da droga em relação ao meio, a estabilização de substâncias sensíveis à droga, a eliminação de incompatibilidades e ainda disfarça o sabor desagradável de alguns fármacos. Essas partículas são produzidas a partir da técnica de microencapsulação, onde o fármaco, que pode está no estado sólido, líquido ou gasoso, é aprisionado em uma matriz ou casca polimérica (Kumar *et al.*, 2011).

Dentre os materiais mais utilizados para a preparação de matrizes estão os polímeros. A escolha do polímero a ser utilizado bem como da técnica de incorporação de sólidos e líquidos em revestimento ou matrizes poliméricas deve levar em consideração as características do material que será incorporado. Porém independentemente do fármaco a ser incorporado, algumas características são essenciais na escolha dos polímeros empregados na encapsulação de fármacos para aplicações biomédicas, como a biodegradabilidade e a biocompatibilidade. A biodegradabilidade de um polímero é adquirida pela presença de grupos funcionais como éster, ortoéster, anidrido, carbonato, amida, ureia ou uretano na sua estrutura. Estes polímeros podem ser de origem natural (polissacarídeos e polímeros à base de proteínas) ou sintética (poliésteres) (Pillai e Panchagnula, 2001).

As técnicas empregadas na preparação das partículas podem ser de natureza química ou física. Nas técnicas de natureza química ocorrem reações para que haja a formação das micropartículas. São exemplos desse tipo de técnica a polimerização em suspensão, polimerização em emulsão e métodos de dispersão e interfaciais, sendo a polimerização em emulsão a mais empregada para incorporação de fármacos. Nos métodos de natureza física, a partícula é produzida em sua configuração usual sem a necessidade de reações químicas. Dentre os métodos físicos e mecânicos encontram-se a reticulação em 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 evaporação/extração com solvente o método mais comum para preparar micropartículas (Kumar *et al.*, 2011). Nesse trabalho foi empregada uma blenda do carboidrato alginato e da proteína sericina como matriz carreadora do fármaco furosemida. Micropartículas de alginato têm sido produzidas através da utilização da técnica de gelificação iônica (Patil *et al.*, 2012), assim como em partículas de sericina e alginato para incorporação de fármacos (Silva *et al.*, 2015).

O método de gelificação iônica é usado principalmente com polímeros hidrofílicos naturais para preparar partículas carreadoras de particulados (Tabela 2.1). São exemplos desses polímeros a gelatina, a alginato, a quitosana e o ágar-ágar. A gelificação iônica baseia-se na transição do polímero do estado líquido para um gel (Miladi *et al.*, 2014). Nessa técnica, as partículas de hidrogel são formadas a partir da reticulação de polieletrólitos na presença de contra-íons. Quando a solução polimérica contendo fármaco entra em contato com a solução aquosa de cátion divalentes, os cátions se

difundem nas gotas de solução polimérica e ocorre a formação de grânulos (Patil *et al.*, 2012). Para o alginato, as partículas são produzidas por extrusão gota-a-gota da solução de alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio (Vidart *et al.*, 2018).

Tabela 2.1 – Aplicações do método de gelificação iônica

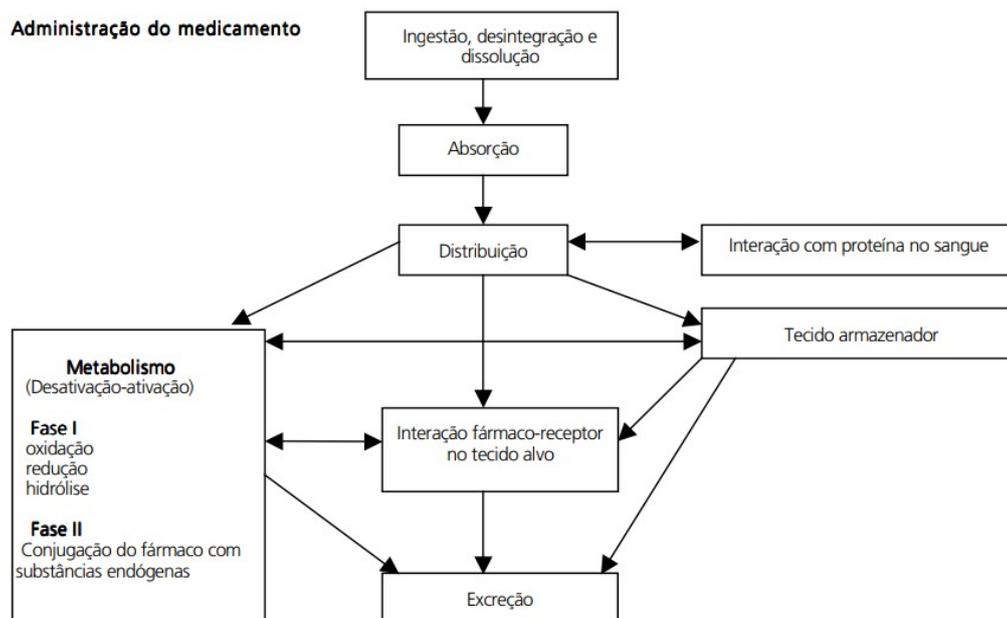
Molécula incorporada	Polímero	Referência
Probióticos	Pectina	Menezes <i>et al.</i> (2015)
Diclofenaco de sódio		Vidart <i>et al.</i> (2018)
Ibuprofeno	Sericina/alginato de sódio	Freitas <i>et al.</i> (2018a)
Cetoprofeno		Freitas <i>et al.</i> (2018b)
Insulina	Quitossana e goma arábica	Avadi <i>et al.</i> (2010)
Cloridrato de articaína	Alginato de sódio/quitossana	Melo <i>et al.</i> (2013)
Furosemida	Alginato de sódio	Das e Senapati (2008)
Itraconazol	Quitossana	Jafarinejad <i>et al.</i> (2012)
Pindolol	Alginato de sódio/gelatina	Almeida e Almeida (2004)

2.3. Farmacocinética

2.3.1. Etapas farmacocinéticas do fármaco no organismo

Após a sua administração, a dinâmica do fármaco ocorre em quatro etapas: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Figura 2.6). Todas essas etapas são dependentes do transporte do princípio ativo pelas membranas celulares. Esse transporte e a disponibilidade do fármaco no seu local de ação são determinados por características como massa molar, conformação estrutural e grau de ionização (Buxton e Benet, 2012).

Figura 2.6 – Esquema das etapas farmacocinéticas do fármaco



Fonte: Moura e Reyes (2002)

A absorção consiste na transferência do fármaco do seu local de administração para o compartimento central que engloba o plasma e o líquido extracelular de tecidos altamente perfundidos (como o pulmão), além da amplitude com que isso ocorre (Buxton e Benet, 2012). Após a administração oral, as moléculas do fármaco atravessam o epitélio intestinal passando entre ou através das células epiteliais, até alcançar a circulação sistêmica. A permeabilidade de um fármaco em seu local de absorção está intimamente relacionada com a sua estrutura molecular e com as propriedades além das propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares. Uma vez que o fármaco se encontra no plasma sanguíneo, o mesmo pode agir no seu local de ação diretamente ou indiretamente, tendo que atravessar as membranas biológicas, portanto, as membranas biológicas são uma barreira na absorção dos fármacos (Gerk *et al.*, 2012).

A passagem das drogas através das membranas celulares pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A difusão passiva é o processo pelo qual as moléculas se difundem espontaneamente de uma região de maior concentração para uma região de menor concentração sem que haja gasto de energia. Esse tipo de difusão ocorre para a maioria dos princípios ativos, principalmente para aqueles que apresentam baixa massa molar e afinidade por lipídios. O transporte de forma ativa é caracterizado pela capacidade de transportar o fármaco de regiões de baixa concentração desse fármaco para regiões de

altas concentrações de fármaco. Portanto, este é um sistema que consome energia e é realizado principalmente por drogas não solúveis em lipídios (Gerk *et al.*, 2012).

Após a absorção dos fármacos, ocorre a distribuição que é responsável pelo espalhamento do fármaco para os líquidos intersticiais e intracelulares. A distribuição do medicamento por todo o corpo ocorre principalmente através do sistema circulatório, que é composto por uma série de vasos sanguíneos que carregam a droga no sangue; estes incluem as artérias, que carregam sangue aos tecidos, e as veias, que devolvem o sangue de volta ao coração. A distribuição de medicamentos é geralmente rápida e a maioria das pequenas moléculas de fármaco permeiam facilmente as membranas capilares. A distribuição é dependente das características físico-químicas do fármaco e de condições fisiológicas, que determinam a taxa de liberação e a quantidade potencial do fármaco distribuído pelos tecidos (Buxton e Benet, 2012; Sun e Zhao, 2012a).

Após ser distribuído, o fármaco é metabolizado. O metabolismo ocorre em duas fases: na primeira ocorrem reações bioquímicas, como oxidação, redução e hidrólise e na segunda ocorrem reações que conjugam os grupos funcionais dos fármacos a moléculas endógenas (Moura e Reyes, 2002). A maioria dos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de princípios ativos encontra-se no fígado, eles são responsáveis pela modificação química dos fármacos de modo a torná-los inativos, facilitando a sua posterior eliminação. Além do fígado, outros tecidos e órgãos podem estar envolvidos no metabolismo dos princípios ativos. Estes locais incluem o pulmão, pele, células da mucosa gastrointestinal, flora microbológica do intestino delgado e o intestino grosso. O rim também pode estar envolvido em algumas reações do metabolismo de drogas (Buxton e Benet, 2012; He e Hong, 2012b).

A diminuição das concentrações plasmáticas do princípio ativo após sua administração é resultado da excreção, processo pelo qual os fármacos são eliminados do organismo. A eliminação da maioria das drogas do corpo envolve os processos de metabolismo, também chamados de biotransformação, seguidos da excreção renal. Os fármacos são excretados principalmente pelo rim, porém outras possíveis vias de excreção são a bile, o suor, a saliva, o leite (via lactação) ou outros fluidos corporais. Além disso, drogas voláteis, como anestésicos gasosos e álcool, são excretadas pelos pulmões através da expiração (Buxton e Benet, 2012; Ducharme, 2012; He e Hong, 2012b).

2.3.2. Modelos matemáticos

O uso de modelos matemáticos na farmacocinética tem por objetivo descrever as variações de concentração ao longo do tempo através de modelos matemáticos visando à avaliação da eficiência do fármaco em função da taxa de liberação e da quantidade liberada e o ajuste da dosagem para produzir e manter uma concentração terapêutica efetiva, com pouca ou nenhuma toxicidade (Bourne, 2002).

A dissolução *in vitro* tem sido reconhecida como um elemento importante no desenvolvimento de medicamentos. Podendo até, sob certas condições, ser usada como um substituto para a avaliação da bioequivalência. A dissolução de uma droga administrada no estado sólido é um pré-requisito para o seu transporte eficiente dentro do corpo humano, já que somente moléculas de fármaco dissolvidas são capazes de se difundir através do tecido vivo (Siepmann e Siepmann, 2013). Vários modelos cinéticos descrevem a dissolução de drogas a partir de formas de dosagem de liberação imediata ou modificada. São exemplos desses modelos: a cinética de ordem zero e primeira ordem, e os modelos de Hixson-Crowell (1931), Higuchi (1961), Korsmeyer-Peppas (1983), Weibull (1951), Hopfenberg (1976) e Baker-Lonsdale (1974) (Costa e Lobo, 2001).

Sistemas de liberação ideal devem seguir uma cinética de ordem zero, onde uma mesma quantidade de fármaco é liberada por unidade de tempo. Esse tipo de liberação ideal é interessante, especialmente, para medicamentos como antibióticos, analgésicos e antidepressivos. Esse modelo pode ser representado pela Eq. 2.1 (Costa e Lobo, 2001; Ummadi *et al.*, 2013).

$$Q = Q_0 + K_0 t \quad (2.1)$$

Em que 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.

A maioria dos processos naturais pode ser descritos pela cinética de primeira ordem, que é aquela em que a taxa de liberação do fármaco só depende da concentração ou quantidade de um componente. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e

excreção que apresentam esse tipo de cinética são considerados de pseudo primeira ordem devido à complexidade dessas etapas. Neste caso, somente a concentração do princípio ativo influencia na taxa de liberação do fármaco (Bourne, 2002). Esse tipo de cinética pode ser descrita pelas Eq. 2.2 e Eq. 2.3, em que K_1 representa a constante de liberação de primeira ordem com unidade de tempo⁻¹.

$$\frac{dQ}{dt} = -K_1 Q \quad (2.2)$$

$$\ln Q = \ln Q_0 - K_1 t \quad (2.3)$$

O modelo de raiz cúbica de Hixson-Crowell (1931) considera que a área regular das partículas é proporcional à raiz cúbica do seu volume. É usado para descrever a liberação de sistemas onde há uma mudança na área de superfície e no diâmetro de partículas ou comprimidos, ou seja, quando o fármaco é liberado somente por dissolução e quando não há mudança na forma geométrica da matriz carreadora. Para fármacos em pó, que apresentem partículas uniformes, é possível aplicar a Eq. 2.4 (Dash *et al.*, 2010; Ummadi *et al.*, 2013).

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} t \quad (2.4)$$

Em que Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica, Q_t é a quantidade restante de fármaco na forma farmacêutica no tempo t e K_{HC} é uma constante incorporando a relação superfície-volume.

O modelo de Higuchi (1961) admite que a etapa limitante da liberação seja a difusão do fármaco dissolvido através da matriz. Dentre as considerações para o desenvolvimento deste modelo tem-se que o intumescimento e a erosão da matriz são considerados insignificantes, logo esse modelo não deve ser aplicado em matrizes que passam por esses processos. Esse modelo é representado pela Eq. 2.5 e simplificado pela Eq. 2.6 (Dash *et al.*, 2010).

$$Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (2.5)$$

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (2.6)$$

Em que Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t por unidade de área A , C 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.

O modelo de Korsmeyer-Peppas (1983) foi desenvolvido como uma relação para descrever a liberação de fármaco encapsulado em um sistema polimérico por difusão. Para analisar o mecanismo da liberação do fármaco, os primeiros 60% de fármaco liberado foi ajustado pela Eq. 2.7 (Ummadi *et al.*, 2013).

$$Q_t/Q_\infty = K_{KP}t^n \quad (2.7)$$

Em que Q_t/Q_∞ é a fração de fármaco liberada no tempo t , K_{KP} é a constante da taxa e n é o expoente de liberação. Para encontrar o valor de n , apenas os dados de $Q_t/Q_\infty < 0,6$ devem ser usados. O valor de n caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco, conforme mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Interpretação do mecanismo de liberação difusional do modelo de Korsmeyer-Peppas

Expoente de liberação (n)		Mecanismo de liberação
Formato Cilíndrico	Formato esférico	
0,45	0,43	Difusão Fickiana
0,45 < n < 0,89	0,43 < n < 0,85	Anômala (difusão Fickiana + transporte de Caso II)
0,89	0,85	Transporte de Caso II
n > 0,89	n > 0,85	Super Transporte Caso II

Fonte: Siepmann e Peppas (2001)

O modelo de Weibull (1951) (Equação 2.8) se trata de um modelo empírico, não deduzido de qualquer fundamento cinético, por esse motivo é alvo de críticas. Apesar das críticas, este se ajusta adequadamente a variados processos de dissolução, que é definido como o processo pelo qual uma quantidade conhecida de substância medicamentosa entra em solução por unidade de tempo sob condições padronizadas (Costa e Lobo, 2001; Gianotto *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2010).

$$Q = Q_0 \left[1 - \exp\left(\frac{-(t - T)^b}{a}\right) \right] \quad (2.8)$$

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 é corresponde ao formato da curva de dissolução.

O modelo de Hopfenberg (1976) correlaciona a liberação do fármaco em matrizes de polímeros erodíveis, desde que a área superficial permaneça constante durante o processo de degradação. Ele pode ser descrito pela Eq. 2.9 (Dash *et al.*, 2010).

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a} \right]^n \quad (2.9)$$

Na qual Q_t é a quantidade de fármaco liberada em um tempo t , Q_∞ é a quantidade de fármaco liberada em um tempo infinito, k_0 é a constante de ordem zero que descreve a degradação do polímero, C_0 é a concentração inicial de fármaco, a é metade da espessura do sistema (equivalente ao raio em esferas ou cilindros), n é um expoente que varia com a geometria ($n = 1, 2, 3$ para geometria plana, cilíndrica e esférica, respectivamente).

O modelo de Baker-Lonsdale (1974) (Equação 2.10) é derivado do modelo de Higuchi (1961) e descreve a liberação de fármacos em matrizes esféricas. A equação 2.10 tem sido utilizada para linearizar os dados de liberação de formulações na forma de microcápsulas ou microesferas (Dash *et al.*, 2010).

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{Q_t}{Q_\infty} \right)^{2/3} \right] \frac{Q_t}{Q_\infty} = K_B t \quad (2.10)$$

Em que Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t , Q_∞ é a quantidade de fármaco liberada em um tempo infinito e K_B é a constante de liberação, obtida do gráfico de $d(Q_t/Q_\infty)/dt$ em função da raiz do inverso do tempo (Shaikh *et al.*, 2015).

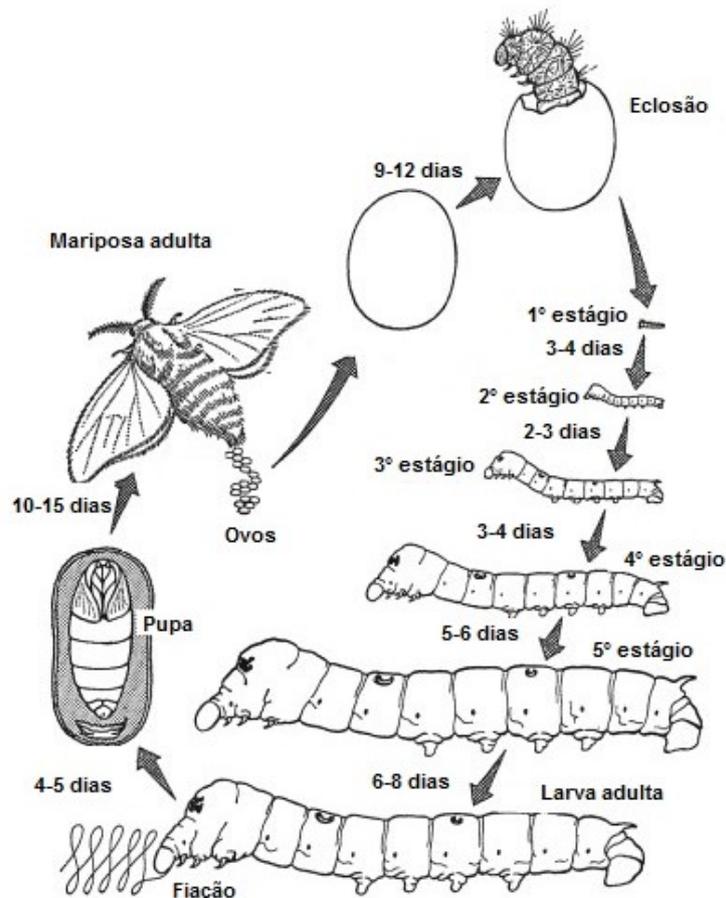
2.4. Materiais utilizados na confecção da matriz carreadora

Medicamentos de liberação modificada são projetados para aperfeiçoar o efeito terapêutico por meio de liberação lenta e contínua do fármaco durante o intervalo de tempo da dosagem, ao mesmo tempo em que também proporcionam maior conformidade e conveniência ao paciente. Esse tipo de sistema é, geralmente, composto

com uma matriz polimérica onde o fármaco é uniformemente dissolvido ou disperso (Abdul e Poddar, 2004). Dentre os materiais amplamente utilizados na confecção de matrizes para liberação de fármaco estão os polímeros naturais como quitosana (Avadi *et al.*, 2010; Jafarinejad *et al.*, 2012), gelatina (Almeida e Almeida, 2004; Jătariu *et al.*, 2011) e alginato (Albarghouthi *et al.*, 2000; Das e Senapati, 2008). Essa seção será focada nos polímeros sericina e alginato, que foram empregados nesse estudo.

2.4.1. Sericina

A sericina é uma proteína globular macromolecular, com massa molar entre 10 e 300 kDa, encontrada nos casulos do *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda (Zhang, 2002). Esses insetos são os únicos utilizados na produção de seda para comercialização, pois diferente das outras espécies que são capazes de produzi-la, como a aranha *Nephila clavipes*, podem ser criados em alta densidade populacional. Além disso, sua alimentação é baseada em uma única fonte, as folhas de amoreira (*Morus Alba* L.), podendo haver suplementação de minerais tais como Mg, Zn, Ca, P, K, Fe e Mn para melhorar as características dos seus casulos. Outra vantagem em relação à produção de seda utilizando o bicho-da-seda é que o mesmo produz os fios em um único estágio da sua vida, a construção do seu casulo, que ocorre por volta do 26º dia do seu ciclo de vida, que dura entre 55 e 60 dias, enquanto as aranhas produzem a seda ao longo de sua vida (Singh e Jayasomu, 2002; Matsumoto *et al.*, 2007). Além da confecção do casulo, o ciclo de vida desses insetos passa por outras etapas, conforme Takeda (2009), mostradas na Figura 2.7.

Figura 2.7 – Ciclo de vida do *Bombyx mori*.

Fonte: Adaptado de Takeda (2009)

Aplicações da sericina nas áreas cosmética, alimentícia e farmacêutica têm sido amplamente estudadas devido às suas características biológicas especiais, tais como resistência à oxidação, atividade antibacteriana e antimicrobiana, proteção contra radiação solar ultravioleta (UV), fácil absorção e liberação de umidade, anticoagulante e também promove crescimento celular e cicatrização de feridas (Barajas-Gamboa *et al.*, 2016). Além disso, a sericina é hidrofílica e apresenta capacidade de reticular, copolimerizar e formar blendas com outros polímeros graças aos seus fortes grupos polares hidroxila, carboxila e amino (Dash *et al.*, 2009). Esses grupos são parte da maioria dos 18 aminoácidos que constituem a sericina, dos quais o composto serina é o que apresenta maior fração (~ 30%), seguida do ácido aspártico (~ 17%), do ácido glutâmico (~ 10%) e da glicina (~ 9%) (Zhang, 2002; Ude *et al.*, 2014).

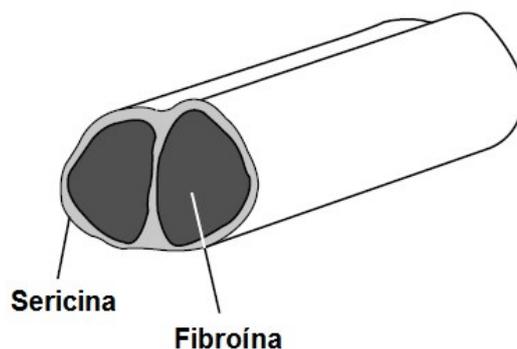
A estrutura da sericina é encontrada predominantemente na sua forma espiral aleatória e amorfa e, em menor proporção, por uma estrutura organizada de folhas- β . No entanto, a forma espiral é facilmente alterada em folhas- β pela absorção de umidade e

estiramento mecânico. As estruturas em forma de espiral são solúveis em água quente e quando a temperatura diminui, elas se transformam em folhas- β , o que resulta na formação de géis. A sericina pode ser ainda classificada em três porções (sericina A, B e C), de acordo com a sua solubilidade. A sericina A constitui a camada mais externa da fibra da seda e é insolúvel em água quente; a sericina B é a camada intermediária; e a sericina C é a camada mais interna da fibra e adjacente à fibroína, insolúvel em água quente e facilmente extraída por tratamento ácido ou alcalino diluído quente (Padamwar e Pawar, 2004).

A sericina constitui 25 a 30% da fibra da seda e é responsável pela coesão dos casulos através do envelopamento da fibroína (Figura 2.8), proteína principal do fio da seda (Zhang, 2002). Na indústria têxtil, se faz necessária a separação da sericina através do processo de degomagem, a fim de obter fios com mais brilho, suavidade, maciez, brancura e susceptíveis ao tingimento. Após ser removida, sericina faz parte do resíduo dessa indústria, sem ter utilização imediata. O efluente da sericultura, rico em sericina, tem elevados índices de demanda bioquímica de oxigênio (4840 mg/L), carbono orgânico total (8870 mg/L) e nitrogênio (11%), criando um grande problema ambiental (Gupta *et al.*, 2013). O alto consumo de oxigênio necessário para degradar a matéria orgânica presente nesses efluentes é uma ameaça ao ecossistema aquático. Os métodos de extração da sericina serão discutidos na próxima seção.

A fibroína, também conhecida como fibra da seda, é um fio longo, fino, leve e macio que tem afinidade ao tingimento, facilidade de absorção de água, tolerância térmica e brilho. Dentre as suas aplicações estão a produção de tecidos nobres, paraquedas, material para revestimento de pneus, vasos sanguíneos artificiais e suturas cirúrgicas (Mondal *et al.*, 2007).

Figura 2.8 – Fio da seda.



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

2.4.1.1. *Extração e separação da sericina*

Na indústria da seda, apenas a fibroína é utilizada, logo existe a necessidade da remoção da sericina, que é feita pelo processo de degomagem, e mais tarde, é descartada no efluente dessa indústria (Rangi e Jajpura, 2015). Teoricamente, o método de degomagem deveria se basear no ataque do agente de degomagem nas ligações peptídicas específicas formadas pelos principais aminoácidos da sericina. No entanto, esses métodos foram desenvolvidos a partir de observações empíricas e seus mecanismos não foram estabelecidos (Gulrajani, 1992). A escolha dos métodos de extração e recuperação da sericina é importante, uma vez que as suas propriedades variam de acordo com os métodos empregados (Gupta *et al.*, 2014).

O processo de degomagem pode ser de caráter químico, físico ou enzimático e podem ser divididos em cinco grupos principais: extração com água, com sabão, com bases, com ácidos e com enzimas. A extração feita com sabões é empregada por mais de 200 anos e, embora tenha sofrido algumas modificações, ainda hoje é a mais utilizada (Gulrajani, 1992; Lamboni *et al.*, 2015). Esse método apresenta desvantagens quando se tem interesse na utilização da sericina, já que a separação do sabão é complexa (Rangi e Jajpura, 2015). A extração em meio alcalino pode utilizar agentes como hidróxido de sódio, carbonato de sódio, carbonato de potássio e fosfato trissódico; enquanto a extração em meio ácido utiliza agentes como ácidos como lácteo, cítrico, tartárico e oxálico. Tanto a extração em meio alcalino quanto em meio ácido podem causar degradação da sericina, dificultando sua posterior utilização (Gulrajani, 1992; Rangi e Jajpura, 2015). A extração enzimática produz bons resultados quando comparada com

os processos tradicionais, mas por ser operada em baixas temperaturas e pH moderado, é necessário uma etapa de pré-tratamento com solução alcalina para a completa eliminação da sericina, o que também leva a sua degradação; além disso, é um processo caro (Gulrajani, 1992; Gimenes *et al.*, 2014). O método de degomagem com água quente consiste na adição do fio da seda em água aquecida, sem adição de agentes químicos. O aquecimento pode ser realizado à pressão ambiente ou com elevação de pressão, radiação infravermelha ou micro-ondas. Nesse processo, a temperatura e o tempo de extração são fatores determinantes na eficiência de extração. A degradação causada por esse método é pequena, permitindo que a sericina mantenha suas principais características e, por esse motivo, é o método mais empregado para extração da sericina, quando se visa o uso da mesma (Rangi e Jajpura, 2015).

Extrações de sericina em água e em solução de carbonato foram avaliadas por Gimenes *et al.* (2014). Outros estudos avaliaram diferentes métodos de extração da sericina presente no casulo do *Bombyx mori*, como a extração em alta temperatura e radiação infravermelha (Gupta *et al.*, 2013), com ácido cítrico (Khan *et al.*, 2010), com ácido fórmico (Um *et al.*, 2001), utilizando proteases (Freddi *et al.*, 2003) e com aquecimento em pressão atmosférica (Kato *et al.*, 1998).

Após ser extraída, a sericina deve ser separada da solução de degomagem, a fim de obter uma solução mais concentrada dessa proteína para posterior aplicação. Dentre os métodos propostos para separação da sericina estão a filtração por membranas, a precipitação em etanol, a secagem por *spray-dryer* e os processos de congelamento e descongelamento (Rangi e Jajpura, 2015).

A filtração por membrana concentra a quantidade de sericina na solução sem a necessidade de adicionar calor, apresentando economia energética. Além disso, esses processos têm baixo risco de degradação do material (Gulrajani *et al.*, 2009; Rangi e Jajpura, 2015). A desvantagem desse método encontra-se na seleção do método de filtração mais adequado. A sericina apresenta uma ampla faixa de massa molar (10 – 300 kDa) e sua distribuição em uma solução é afetada por fatores como temperatura, pH e tempo de processamento. Logo, para que haja a seleção da membrana correta para a sua recuperação, a massa molar da sericina deve ser conhecida (Capar *et al.*, 2008). A sericina pode ser ainda separada através da precipitação em etanol. A massa molar da sericina precipitada varia de acordo com a quantidade de etanol

adicionada (Oh *et al.*, 2011). A desvantagem desse método é que existe a necessidade de separação da sericina do seu solvente. Quando usada a técnica de *spray-dryer* tem-se como vantagem a pequena possibilidade de degradação de moléculas sensíveis ao calor e a produção rápida de pós secos, porém existe a dificuldade de se obter uma distribuição de tamanho regular e as partículas dos pós tem uma tendência a se aglomerarem (Genç *et al.*, 2009).

Além dos métodos citados, existe ainda o fracionamento por congelamento e descongelamento à temperatura ambiente, que atende a uma ampla faixa de massa molar (20 a 400 kDa). Essa técnica foi avaliada por Silva *et al.* (2014a) e por Tomadon Jr. (2011), para ambos os estudos este processo foi capaz de promover a separação da sericina em solução sem causar qualquer alteração significativa nos perfis de distribuição de massa molar da mesma. Como esse método não se utiliza adição de agentes químicos, não há necessidade de uma etapa adicional de remoção desses compostos.

2.4.2. Alginato

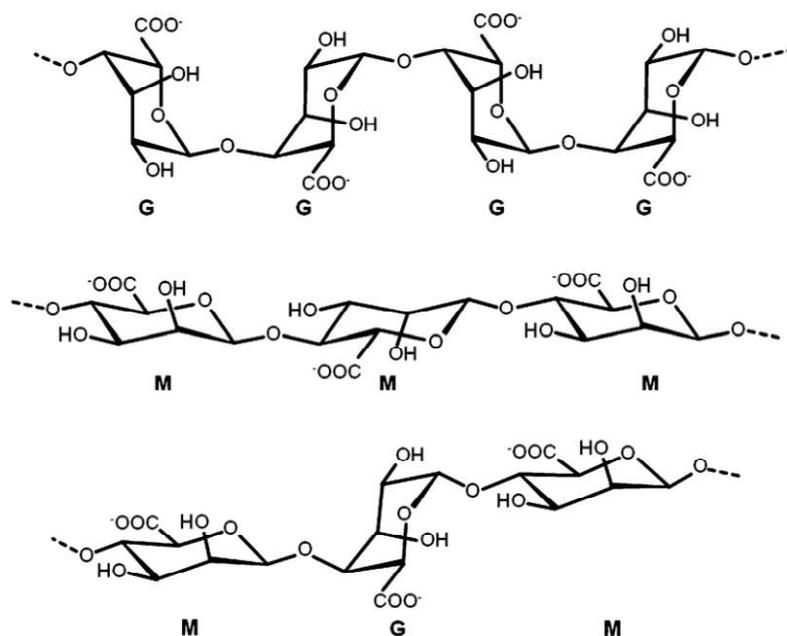
Devido a sua estrutura química, a sericina apresenta a capacidade de reticular, polimerizar e formar blendas com outros polímeros a fim de melhorar suas propriedades, dentre eles destaca-se o alginato de sódio (Silva *et al.*, 2014a).

O alginato é um polímero natural, na sua maioria, extraído das algas marrons. Ele apresenta como principais características a biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo e capacidade de gelificar quando em contato com cátions divalentes, como o Ca^{2+} . Essas propriedades aumentam o interesse na aplicação desse polímero nas áreas biomédica e farmacêutica. Dentre as suas aplicações está a capacidade de liberar pequenas moléculas de fármacos até proteínas macromoleculares de forma controlada. Além disso, os géis de alginato podem ser administrados oralmente ou injetados no corpo de maneira pouco invasiva (Tønnesen e Karlsen, 2002; Lee e Mooney, 2012). Outra característica do alginato é a capacidade de proteger os fármacos incorporados do pH ácido do estômago, uma vez que é gastrorresistente (Hwang *et al.*, 1995). Além de proteger o fármaco da ação ácida do suco gástrico, essa propriedade também protege o estômago da ação do fármaco.

O alginato comercialmente disponível é extraído das algas marrons (*Phaeophyceae*), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* a partir do tratamento com soluções alcalinas aquosas, tipicamente com NaOH. O extrato resultante da extração é filtrado e o alginato é precipitado em forma de sal quando se adiciona cloreto de sódio ou de cálcio (Gombotz e Wee, 2012; Lee e Mooney, 2012).

O alginato é um polímero polissacarídico linear composto por blocos de β -D-ácido manurômico (M) e α -L-ácido gulurônico (G) conectados por ligações (1,4)-glicosídicas. Esses blocos podem formar cadeias de subunidades G consecutivas (G)_n, M consecutivas (M)_n, ou M e G alternadas (GM)_n (Figura 2.9). As propriedades físicas desse polímero são determinadas a partir da composição e da extensão dessas cadeias e do seu peso molar, logo alginatos extraídos de diferentes fontes podem variar suas características (Gombotz e Wee, 2012).

Figura 2.9 – Estrutura química do alginato



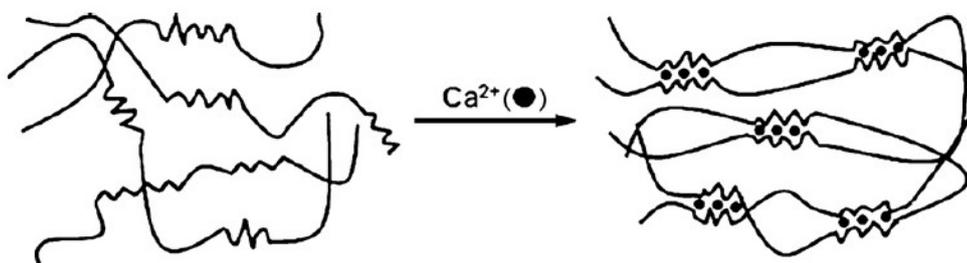
Fonte: Lee e Mooney (2012)

Nas áreas biomédica e farmacêutica, o alginato é frequentemente usado na forma de hidrogéis, que são redes tridimensionais compostas por polímeros hidrofílicos. A gelificação do alginato pode ser do tipo covalente, térmica e iônica. A gelificação iônica é a mais comum e consiste na adição da solução de alginato em solução iônica de cátions divalentes. Esses cátions se ligam aos blocos guluronatos, criando blocos adjacentes com uma estrutura conhecida como caixa de ovos (Figura 2.10). Dentre os

agentes gelificantes mais comuns está o CaCl_2 . O alginato também pode ser reticulado na presença de agentes reticulantes por ligações covalentes. O problema com esse tipo de reticulação é que os agentes reticulantes podem ser tóxicos e os produtos químicos que não reagiram podem precisar ser removidos completamente dos géis. A reticulação térmica é empregada a fim de controlar a liberação de fármacos incorporados em hidrogéis termo-sensíveis, uma vez que esse tipo de processo é capaz de controlar o intumescimento dessas partículas. Apesar do alginato não ser inerentemente termo-sensível, a taxa de intumescimento dos seus géis aumenta com a concentração de alginato de sódio a uma temperatura constante e diminui com o aumento da temperatura (Lee e Mooney, 2012).

Acredita-se que apenas os blocos G do alginato são capazes de formar hidrogéis a partir da reticulação na presença de cátions divalentes, como o Ca^{2+} . Logo, fatores como composição (razão M/G), sequência, comprimento do bloco G e massa molar são fatores que afetam as propriedades físicas do alginato e dos seus géis (Lee e Mooney, 2012).

Figura 2.10 – Modelo “caixa de ovo”.



Fonte: Lee e Mooney (2012)

2.4.3. Agente reticulante: Proantocianidinas

Biomateriais têm sido amplamente empregados na área biomédica por apresentar vantagens como citocompatibilidade e capacidade de degradação no corpo sem liberar substâncias nocivas. São exemplos desses materiais albumina, colágeno e proteínas da seda, que apresentam boa biocompatibilidade. Apesar dessas características, os biopolímeros podem apresentar limitações em sua aplicação nessa área. Dentre elas estão as propriedades mecânicas, que nem sempre são adequadas, e, em muitos casos, a

falta de estabilidade necessária em ambientes aquosos e fisiológicos exigidos para aplicações médicas (Reddy *et al.*, 2015).

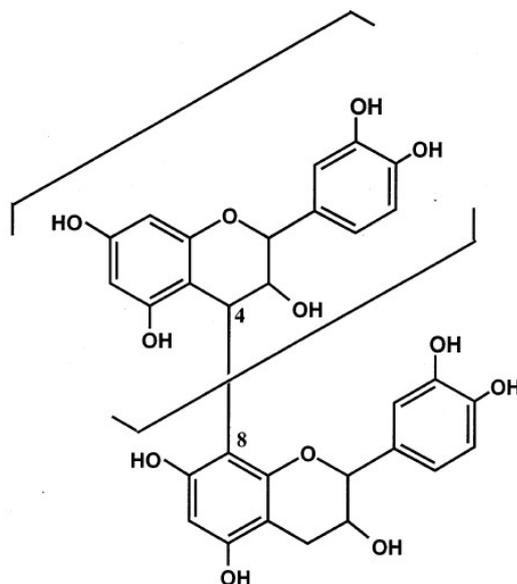
A técnica mais comum para superar as limitações apresentadas pelos biopolímeros é a reticulação ou gelificação covalente, que acontece na presença de agentes reticulantes. Os agentes reticulantes ligam as moléculas aumentando o seu massa molar e as modificam melhorando suas propriedades mecânicas e sua estabilidade. O problema com os agentes reticulantes é que eles podem levar à diminuição da degradabilidade da molécula formada. Além disso, a reticulação covalente acarreta uma menor disponibilidade de grupos funcionais no polímero reticulado e altera a sua reologia, levando a dificuldades de processamento do polímero, o que pode aumentar a sua citotoxicidade (Reddy *et al.*, 2015). Logo, a escolha do agente reticulante é de fundamental importância para reticulação covalente nas áreas biomédica e farmacêutica.

O glutaraldeído é um agente reticulante potente de proteínas e carboidratos que tem sido comumente usado no campo da engenharia de tecidos e na área biomédica em geral (Wei *et al.*, 2014). Porém, apesar de ser responsável pela melhoria de propriedades mecânicas, evidências mostram que a citotoxicidade do material reticulado com glutaraldeído aumenta, dependendo da sua concentração (Reddy *et al.*, 2015).

Uma alternativa para o glutaraldeído são os agentes reticulantes naturais, como a proantocianidina, que é abundante em extratos de semente de uva, e tem mostrado ser mais de 120 vezes menos tóxico que o glutaraldeído (Kim *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2014). Dentre as aplicações já estudadas deste composto estão a reticulação de filmes a base de quitosana e gelatina realizada por Kim *et al.* (2005) e a estabilização de matrizes de colágeno (Han *et al.*, 2003).

Proantocianidinas (PAs) são metabólitos naturais de plantas amplamente disponíveis em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e cascas. PAs (Figura .2.11) fazem parte de um grupo específico de compostos polifenólicos e pertencem à categoria conhecida como taninos condensados, que consistem em estruturas altamente hidroxiladas capazes de formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas (Kim *et al.*, 2005).

Figura 2.11 – Estrutura representativa das procianidinas, principal componente das proantocianidinas



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

Em estudos com colágeno, as PAs mostraram que têm o potencial de dar origem a estruturas de ligação de hidrogênio estáveis e gerar matrizes não biodegradáveis. Além disso, as PAs são amplamente utilizadas como antioxidantes naturais, sequestrantes de radicais livres e têm se mostrado seguras em diferentes aplicações clínicas e em suplementos dietéticos. Estudo em ratos confirmou a ausência de toxicidade aguda e subaguda da proantocianidina (Han *et al.*, 2003).

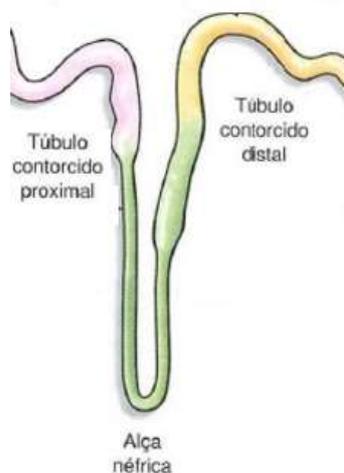
2.5. Furosemida

A furosemida, fármaco empregado neste estudo, é um diurético de alça empregada no tratamento de edemas cardíacos, hepáticos e renais e, principalmente, no tratamento de hipertensão (Chaulang *et al.*, 2009). Suas doses diárias variam entre 40 – 120 mg, sendo que para edemas leves doses diárias de 20 mg podem ser efetivas e para edemas severos doses de até 600 mg/dia podem ser necessárias. A Organização Mundial de Saúde recomenda a dosagem de 40 mg/cápsula (Granero *et al.*, 2010).

A furosemida age inibindo a reabsorção de sódio e cloreto na porção ascendente da alça de Henle ou alça néfrica e também na porção inferior dos tubos distais, localizados nos rins (Figura 2.12). Ela bloqueia o sistema cotransportador de $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ localizado na membrana celular luminal do ramo ascendente da alça de Henle. A excreção de íons de sódio, potássio, cálcio e cloreto é aumentada, com isso há uma liberação acentuada

de água. A maioria dos efeitos adversos da furosemida ocorre em altas doses e/ou uso prolongado, os mais comuns são o desequilíbrio de fluidos. Sinais de desequilíbrio eletrolítico incluem dor de cabeça, hipotensão, câibras musculares, boca seca, sede e fraqueza (Granero *et al.*, 2010). Dentre seus efeitos colaterais também se encontram os períodos de diurese intensa que causam incômodo ao paciente. A modificação da forma farmacêutica para o sistema de liberação controlada produz o mesmo efeito diurético, porém sem o incômodo causado pela diurese rápida e intensa (Das e Senapati, 2008).

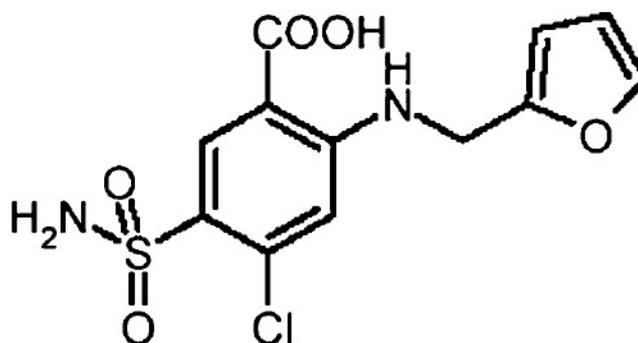
Figura 2.12 – Esquema do local de ação da furosemida no organismo



Fonte: Amabis e Martho (2004)

Ácido 5-(aminossulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino]-benzoico é o nome químico da furosemida. Sua fórmula molar é $C_{11}H_{11}ClN_2O_5S$ e sua massa molar é 330,74 g/gmol. A furosemida é um pó cristalino branco ou quase branco e inodoro estável em temperatura ambiente. É praticamente insolúvel em água (18,25 mg/L a temperatura ambiente), tendo sua solubilidade aumentada em pH alcalino. Para pH 2,3, a sua solubilidade é de 18 mg/L, enquanto em pH 10, sua solubilidade é de 13,36 g/L. A furosemida é um ácido fraco com pKa em água de 3,8 para o grupo carboxílico (Granero *et al.*, 2010). Sua fórmula estrutural está apresentada na Figura 2.13.

Figura 2.13 – Estrutura da furosemida



Fonte: Granero *et al.* (2010)

O coeficiente de partição da furosemida foi calculado por Kasim *et al.* (2004) usando o sistema n-octanol/água por duas maneiras diferentes. Os valores encontrados foram 1,9 e 0,74, ambos considerados de baixa solubilidade em água.

A furosemida é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo seu principal local de absorção a porção superior do intestino delgado. Sua biodisponibilidade tem valores pode volta de 60-70%, mas sua absorção é variável. Para as formas farmacêuticas atualmente comercializadas, seu pico de concentração ocorre entre 60 e 90 minutos após a sua administração e seus níveis de concentração ficam abaixo no nível de detecção entre 3 e 4 horas após a ingestão (Granero *et al.*, 2010).

A furosemida apresenta tempo de meia-vida na faixa de 30 a 120 minutos. Quando o paciente em tratamento apresenta doença renal terminal este tempo pode chegar a quase 10 horas. O prolongamento do tempo de meia-vida também acontece quando o medicamento é administrado em recém-nascidos, uma vez que a função renal não é totalmente desenvolvida logo após o nascimento. A eliminação da furosemida se dá principalmente pela urina, em sua grande parte inalterada. Outra forma de eliminação é via bile, mas em menor escala (Granero *et al.*, 2010).

A furosemida foi incorporada em matriz de alginato por Das e Senapati (2008), em blenda de alginato e polietilenoimina (PEI) por Setty *et al.* (2005) e em goma xantana por Kumar *et al.* (2013) a fim de alcançar a liberação modificada. Em todos os casos, a liberação da droga foi prolongada.

Apesar dos trabalhos citados, a incorporação de furosemida em matrizes poliméricas de sericina e alginato para a liberação modificada ainda não foi reportada na literatura, o que comprova o caráter inédito do trabalho, que utiliza uma blenda econômica e ambientalmente favorável para incorporação de fármacos. A sericina pode modificar as propriedades do alginato de forma a aumentar a incorporação e o tempo de liberação do fármaco (Vidart *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2018a).

CAPÍTULO 3

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as metodologias empregadas no desenvolvimento da pesquisa bem como os materiais e os equipamentos utilizados.

3.1. Material e Equipamentos

Os materiais e reagentes a serem empregados foram:

- Casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*, fornecidos pela empresa de fiação de seda BRATAC, com sede na cidade de Londrina-PR;
- Furosemida, Purifarma (Brasil);
- Cloreto de cálcio anidro (CaCl_2), Anidrol (Brasil);
- Fosfato de sódio tribásico ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Dinâmica (Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), Dinâmica (Brasil);
- Hidróxido de sódio (NaOH), Dinâmica (Brasil);
- Ácido clorídrico (HCl), Synth (Brasil);
- Alginato de sódio, Sigma-Aldrich (EUA).

Os equipamentos utilizados nas etapas experimentais foram:

- Microscópio Estéreo DC4-456H, Schertz (EUA);
- DTG-60, Shimadzu (Japão);
- Espectrofotômetro UVmini-1240, Shimadzu (Japão);
- DRX X'Pert-MPD, Philips Analytical X Ray (Holanda);
- MEV Leo 440i, LEO Electron Microscopy/Oxford (Inglaterra);
- Espectrômetro de FT-IR Nicolet 6700, Thermo Scientific (USA);
- Câmara Climática 420-150L, Ethik (Brasil);
- Dissolutor de comprimidos e cápsulas UDT-814, Logan (EUA);
- Autoclave vertical AV-18, Phoenix Lufenco (Brasil);
- Sonicador, Branson (EUA);
- *Jar test*, Milan (Brasil);
- Sputter Coater K450, Emitech (Reino Unido);
- Dispersor UltraTurrax®, IKA (China);

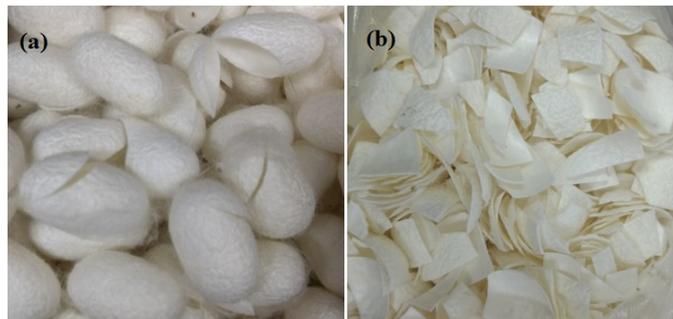
- Balança Analítica, Ohaus (EUA);
- Estufa, Nova Ética (Brasil);
- Agitador Magnético, Tecnal (Brasil);
- Pipeta volumétrica Nichipet EX, Nichiryo (EUA);
- Bomba peristáltica, Masterflex (EUA).

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação dos casulos do *Bombyx mori*

Os casulos que foram gentilmente cedidos pela empresa Bratac (Londrina-PR) para o desenvolvimento desta pesquisa são considerados de segunda linha, uma vez que apresentam cortes ou foram danificados, de forma que esses seriam descartados por não atenderem os padrões exigidos para o processo de produção do fio da seda. A preparação dos casulos (Figura 3.1) para extração da sericina segue metodologia aplicada por Silva (2016). A primeira etapa da preparação é a limpeza, onde com o auxílio de pinças e tesouras as sujidades mais grosseiras foram eliminadas. Após esse processo, os casulos foram cortados em partes medindo aproximadamente 1 cm². O corte deve ser feito de maneira que o material resultante seja o mais plano possível, de modo que a eficiência de extração seja otimizada.

Figura 3.1 – Casulos do bicho-da-seda: (a) antes de serem preparados (b) limpos e cortados



Para reforçar a limpeza dos casulos, os mesmos foram lavados em água corrente, enxaguados e lavados três vezes com água deionizada. Após a lavagem, os casulos foram secos em estufa a 50 °C por 24 horas para eliminação total da umidade. Depois de secos, os casulos foram deixados em dessecador para resfriar e, por fim, foram pesados para a realização da extração da sericina.

3.2.2. Extração da sericina

Tomadon Jr. (2011) e Silva (2016) estudaram diferentes métodos para extração de sericina, sendo o método da autoclave o que apresentou melhor eficiência de remoção da

mesma. Assim, neste trabalho a sericina foi extraída em autoclave vertical com pressão manométrica de 1 kgf/cm², temperatura de 120 °C, durante 40 min. Na extração, foi utilizado um litro de água para cada 40 g de casulo. A solução resultante foi filtrada a fim de separar a fibroína.

3.2.3. Separação e Fracionamento da Sericina

Após o processo de extração, a sericina foi fracionada pela técnica de congelamento e descongelamento, também descrita por Tomadon Jr. (2011) e Silva (2016).

A solução de sericina extraída conforme descrito anteriormente foi acondicionada em recipiente fechado e mantida em temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, o material foi armazenado em congelador convencional por 24 horas. O fracionamento da sericina foi então realizado por descongelamento da solução à temperatura ambiente. Após o descongelamento, a sericina de maior massa molar se torna insolúvel, formando uma solução heterogênea, onde a fase aquosa contém a proteína de menor massa molar solubilizada. A separação das duas fases foi realizada por filtração simples em papel de filtro qualitativo 80 g. Em seguida, o material retido no filtro foi reaquecido em autoclave vertical (1 kgf/cm², 120°C, 10 min) para ressolubilizar a proteína. Após esse processo, a concentração de sericina em solução foi ajustada para o valor desejado de 2,5% (m/V) por meio de diluições (Silva *et al.*, 2016).

3.2.4. Determinação da Concentração de Sericina

Para determinar a concentração de sericina em solução, um volume conhecido desta solução foi colocado em uma placa de Petri de massa conhecida. O sistema (placa+sericina) foi colocado em estufa a 100 °C por 24 horas, após esse período, a massa do sistema foi determinada em triplicata. A concentração da sericina na solução foi então calculada utilizando a Eq. 3.1.

$$C_S = \frac{m_f - m_i}{V} \cdot 1000 \quad (3.1)$$

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 de secagem em estufa (g), m_i é a massa da placa e V é o volume de solução de sericina adicionado inicialmente (mL).

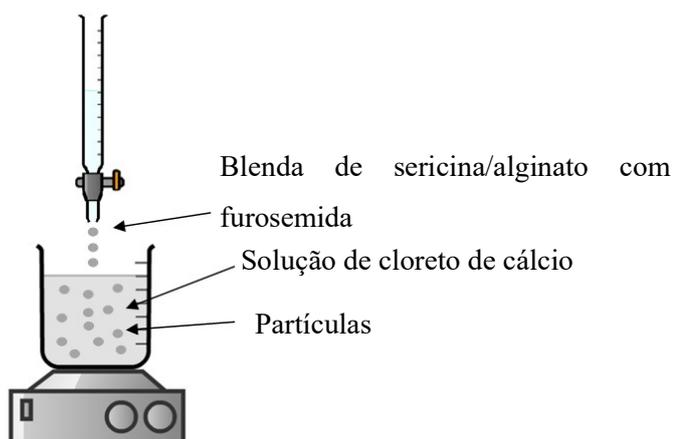
A concentração pode ser ajustada, conforme necessidade, através de diluição. Este método de determinação da concentração de sericina é conhecido como métodos das massas e também foi empregado por Tao *et al.* (2005).

3.2.5. Preparação da blenda sericina/alginate, da partícula de alginate e incorporação do fármaco

A incorporação de fármaco utilizou a metodologia proposta por Vidart *et al.* (2015). A solução de sericina 2,5% (m/V) foi aquecida em autoclave por 10 min a 70 °C e 1 kgf/cm² e depois colocada para agitação em Ultraturrax® a 4000 rpm até atingir a temperatura de 55 °C. Nesse momento, o alginate de sódio foi adicionado em diferentes concentrações à sericina, conforme Tabela 3.1. A mistura foi mantida sob agitação constante até que fosse homogeneizada por completo. A furosemida foi então adicionada à blenda de sericina e alginate, inicialmente com agitação de 4000 rpm e, posteriormente, sob agitação de 8000 rpm até que toda a mistura ficasse homogênea.

As partículas foram preparadas de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 3.1 utilizando o método de gelificação por gotejamento, semelhante ao realizado por Khandai *et al.* (2010). Com o auxílio de bomba peristáltica, a solução contendo a blenda sericina/alginate e a furosemida foi gotejada em solução aquosa de cloreto de cálcio - CaCl₂ 3% (m/V), sob agitação constante (Figura 3.2). Durante o gotejamento, ocorreu a formação de uma partícula, resultado da rápida gelificação da solução polimérica. Ao final do gotejamento, as partículas permaneceram em agitação, a 100 rpm, em *jar test*, durante 30 min, a fim de completar a reticulação com os íons de cálcio.

Figura 3.2 – Aparato experimental - gotejamento



Após o processo de reticulação, as partículas foram colocadas em uma peneira e lavadas com água corrente e água deionizada para remoção do cálcio e cloro residuais. A secagem das partículas foi realizada em temperatura ambiente, por no mínimo um período de 24 horas, em seguida foram acondicionadas em recipientes fechados até sua utilização.

As formulações da Tabela 3.1 foram submetidas à avaliação de eficiência de incorporação e tempo de liberação da furosemida.

Tabela 3.1 – Formulações para avaliação da eficiência de incorporação e perfil de liberação de fármaco

Formulação	Sericina (g)	Alginato (g)	Furosemida (g)
F1	2,5	2,0	2,0
F2	2,5	2,0	4,0
F3	2,5	2,8	2,0
F4	2,5	2,8	4,0
F5	2,5	2,4	3,0
BF2	-	2,0	4,0
BF4	-	2,8	4,0

Silva (2016) desenvolveu partículas de sericina e alginato com concentrações de sericina de 2,0 e 2,5% (m/V). As partículas contendo maior concentração de sericina apresentaram resultados superiores em relação à esfericidade e maior resistência mecânica da partícula, sendo esta concentração adotada para este estudo. As concentrações de alginato e furosemida foram variadas a fim de avaliar os melhores resultados de incorporação e liberação. Partículas sem sericina foram avaliadas a fim de verificar o efeito desta proteína em termos de eficiência de incorporação e liberação do fármaco. Neste caso, na etapa de preparação de partículas a solução de sericina foi substituída por água deionizada.

As formulações que apresentaram maior eficiência de incorporação e liberação mais prolongada de furosemida foram selecionadas para a etapa de reticulação térmica a fim de determinar a influência dessa etapa nos testes de eficiência de incorporação e na liberação do fármaco. Essa etapa foi realizada em duas fases: 24 horas em estufa a 50 °C e 24 horas em estufa a 100 °C, segundo metodologia descrita em Silva (2016).

3.2.5.1. Modificação na partícula de sericina e alginato por adição de proantocianidina

A fim de verificar o efeito da reticulação covalente na partícula de sericina e alginato, foi adicionado o agente reticulante proantocianidina (PA), derivado do extrato da semente da uva. O efeito desse componente foi medido em termos de eficiência de incorporação e tempo de liberação de fármaco.

Assim como descrito anteriormente, para a preparação da partícula (FPA) 100 ml de solução de sericina 2,5% (m/V) foram aquecidos em autoclave e homogeneizados com 2,0 g de alginato. Após essa etapa, foi adicionado 0,5 g de proantocianidina. A mistura foi agitada em Ultraturrax® a 4000 rpm até completa homogeneização. Massa de 4,0 g de furosemida foi então adicionada à blenda com agitação inicial de 4000 rpm, seguida de agitação a 8000 rpm até que a mistura fosse homogeneizada.

As concentrações de alginato, sericina e furosemida na partícula contendo PA foram determinadas a partir da avaliação da eficiência de incorporação e tempo de liberação de fármaco das partículas previamente estudadas. Já a quantidade de PA foi determinada a partir de testes anteriores realizados pelo grupo de pesquisa.

3.3. Caracterização das Partículas Carregadas com Fármacos

3.3.1. Eficiência de incorporação e de carregamento de Furosemida

Para avaliação da eficiência de incorporação da furosemida à blenda de sericina e alginato, 0,1 g de partícula seca foi adicionada a 500 mL de tampão fosfato (pH = 6,8) durante 24 horas. Após esse período, a suspensão foi deixada em sonicador (Branson, EUA) durante 15 min e, depois, foi filtrada em papel de filtro 0,45 µm.

A concentração experimental de furosemida no filtrado foi obtida por espectroscopia UV-visível no comprimento de onda de 271 nm e, pela Eq. 3.2, determinou-se a eficiência de incorporação (Papadimitriou e Bikiaris, 2009).

$$\text{Incorporação} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Em que a concentração teórica é a fração mássica da furosemida na partícula.

A eficiência de carregamento do fármaco em cada partícula foi determinada a partir da porcentagem de carregamento (% m/m), conforme Eq. 3.3 (Papadimitriou e Bikiaris, 2009).

$$\text{Carregamento} = \frac{\text{Massa de fármaco na partícula}}{\text{Massa de partículas}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

O procedimento para determinar a quantidade de massa de fármaco na partícula foi o mesmo empregado para ensaio de eficiência de incorporação.

3.3.2. Diâmetro, Distribuição de Tamanho e Análise Morfológica das Partículas

O diâmetro das partículas foi obtido por análise de Microscopia Óptica. As medidas foram feitas no modo de luz incidente e em campo claro com a ampliação de 10 vezes. Para cada formulação, foi medido o diâmetro de 500 partículas. A distribuição de tamanhos foi analisada utilizando o ajuste do modelo Gaussiano. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização e Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) – UNICAMP.

A análise morfológica e de superfície das partículas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura no LRAC. As partículas foram recobertas por uma camada de ouro (Au) com espessura estimada em 200 Å utilizando *Sputter Coater* e as imagens foram capturadas com o aumento de 150, 1500 e 5000 vezes.

3.3.3. Cristalinidade

Para avaliar a cristalinidade das formulações foram utilizadas as análises por difração de Raios X. Nestas análises, são obtidas medidas das distâncias basais existentes na cela unitária, pela Lei de Bragg, descrita pela Eq. 3.4.

$$d = \frac{n\lambda}{2\sin\theta} \quad (3.4)$$

Em que n é um número inteiro positivo, λ o comprimento de onda de raios X (nm) e θ o ângulo de difração.

Foram obtidos os difratogramas das formulações estudadas que apresentaram melhor eficiência de incorporação e com maior período de liberação de furosemida, para comparação com os resultados do fármaco, sericina e alginato. Essa análise foi realizada no LRAC/FEQ/UNICAMP, segundo as seguintes condições: radiação $K\alpha$ do cobre, comprimento de onda de 1,54 Å, voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, 2θ na faixa de 5 a 50°, com passo de 0,02° e velocidade de 0,02°/s.

3.3.4. Análises Térmicas

A análise termogravimétrica (TG) e a análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas para avaliar possíveis interações entre o alginato de sódio, a sericina e a furosemida, através da determinação da perda de massa, temperatura e entalpia de fusão e o comportamento térmico da mistura.

Na TG, a massa da amostra é determinada à medida que ocorre o aumento da temperatura. As perdas e os ganhos de massa e a decomposição ocorrida são quantificadas. Já na DTA, é possível identificar a ocorrência de transformações endotérmicas ou exotérmicas pela comparação da temperatura do material com a temperatura de um padrão, durante o aquecimento (Santos, 1975).

As análises foram efetuadas em atmosfera inerte de nitrogênio, fluxo de 50 mL/min, taxa de aquecimento 20 °C/min, na faixa de 30 – 1000 °C no Laboratório de Engenharia Ambiental/ Laboratório de Engenharia e Processos Ambientais (LEA/LEPA) – FEQ/UNICAMP.

3.3.5. Grupos Funcionais

Para avaliar a presença de grupos funcionais das partículas sem e com fármaco incorporado foi realizada a análise de FT-IR no LRAC/FEQ/UNICAMP em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier. As medidas foram feitas no modo transmitância utilizando o acessório *snap-in baseplate* (método KBr), na faixa de 4000-400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans.

Os resultados obtidos foram comparados com resultados de trabalhos anteriores sobre a sericina e alginato puros, a fim de verificar a presença dos grupos funcionais característicos desses compostos na blenda. A presença dos grupos funcionais da furosemida nas partículas também foi avaliada.

3.4. Dissolução *In Vitro* e Modelagem da Cinética de Liberação

O ensaio de dissolução permite determinar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo em meio que simula o ambiente gástrico e entérico (Gianotto *et al.*, 2007).

As condições da análise variam de acordo com o fármaco em estudo. Para a furosemida, o estudo foi realizado conforme metodologia apresentada na Farmacopéia Brasileira (2010). O ensaio foi realizado em dissolutor de comprimidos e cápsulas, aparato I (cesto), sob agitação de 50 rpm a $37,0 \pm 0,5$ °C, e utilizando 900 mL de solução tampão de fosfato (pH = 5,8) como meio de dissolução entérico. Alíquotas de 5 mL foram retiradas em tempos pré-determinados (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 horas), enquanto 5 mL de solução tampão de fosfato foi reposta. A concentração de fármaco foi determinada por espectroscopia UV-visível.

Também foram efetuados ensaios que simulam o meio gástrico, a fim de verificar a gastrorresistência das partículas. Esses ensaios foram realizados em 1000 mL de solução HCl 0,1 M sob as mesmas condições descritas anteriormente durante um período de duas horas. Assim como descrito anteriormente, amostras de 5 mL foram retiradas para análise ao final desse período.

Para a modelagem da cinética de liberação de fármaco, foram ajustados modelos matemáticos anteriormente descritos na seção 2.3.2 desse trabalho aos dados experimentais obtidos nos ensaios de dissolução *in vitro*, utilizando o programa Maple 17®. O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) e o Critério de Informação de Akaike (AIC) foram calculados para avaliar os melhores ajustes dentre os modelos aplicados.

3.5. Estudo da Estabilidade

O estudo de estabilidade tem como objetivo avaliar a degradação das formulações farmacêuticas visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificada. Esses testes podem ser de dois tipos: o estudo de estabilidade acelerado e o estudo de estabilidade de longa duração (Anvisa, 2005).

Segundo a Resolução da Anvisa (Resolução nº1, 29/07/2005), o estudo de estabilidade acelerado foi projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de produtos farmacêuticos em condições forçadas de armazenamento. Esse teste tem duração de 6 meses. O estudo de estabilidade de longa duração tem como objetivo verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante período de 12 meses.

Devido ao curto tempo disponível para o desenvolvimento de um projeto de mestrado, apenas o estudo de estabilidade acelerada foi realizado. Para isso, as partículas foram acondicionadas dentro de cápsulas farmacêuticas de tamanho 00, as quais foram armazenadas em blísteres.

Os blísteres contendo as cápsulas foram acomodados em câmara climática seguindo condições de temperatura (40 ± 2 °C) e umidade relativa do ar (75 ± 5 % UR) estabelecidas pela Anvisa por 6 meses. A cada 3 meses, as partículas armazenadas foram submetidas a análises de teor de fármaco e ao teste de dissolução.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados relativos à eficiência de incorporação e carregamento do fármaco na blenda de sericina e alginato e em partículas de alginato, bem como o perfil de liberação da furosemida em dissolução *in vitro* e a sua modelagem cinética de liberação. As partículas que apresentaram melhor desempenho nas análises mencionadas foram caracterizadas pelas análises mencionadas no item 3.3 desse trabalho. Serão apresentados também os resultados do estudo de estabilidade acelerado.

4.1. Eficiência de incorporação e carregamento da furosemida

A furosemida foi incorporada na blenda de sericina e alginato (F1 – F5), com variação das concentrações do alginato e da furosemida, conforme Tabela 4.1. Para efeito de comparação, o fármaco também foi incorporado em partículas contendo somente alginato (BF2 e BF4) e também foram efetuadas modificações nas partículas contendo furosemida incorporada em blenda de sericina e alginato por reticulação covalente (FPA) e térmica (TF2 e TF4), conforme Tabela 4.2.

As eficiências de incorporação de furosemida na blenda cujas partículas foram produzidas por gelificação iônica e as suas porcentagens de carregamento são apresentadas na Tabela 4.1. As medidas foram realizadas em triplicata e as suas médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (HSD) a 95% de confiança.

Dentre o primeiro grupo de partículas analisadas, a formulação F2 foi a que apresentou melhor resultado em termos de eficiência de incorporação e carregamento do fármaco. As demais formulações são estatisticamente equivalentes no que diz respeito à eficiência de incorporação e, em relação ao carregamento de fármaco, todas as formulações apresentam médias estatisticamente distintas a 95% de confiança. As formulações F2 e F4 apresentaram melhor desempenho no carregamento da furosemida, o que pode ser atribuído a maior quantidade de fármaco disponível para a incorporação.

Tabela 4.1 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco das partículas F1 – F5

Formulação	Composição (% m/v)			Eficiência de incorporação (%)*	Carregamento (%)*
	Sericina	Alginato	Furosemida		
F1	2,5	2,0	2,0	78,22±4,32 ^a	24,07±1,33 ^A
F2	2,5	2,0	4,0	84,68±2,92 ^b	39,85±1,37 ^B
F3	2,5	2,8	2,0	73,39±2,05 ^a	20,11±0,56 ^C
F4	2,5	2,8	4,0	77,31±0,56 ^a	33,25±0,24 ^D
F5	2,5	2,4	3,0	75,46±2,67 ^a	28,65±1,01 ^E

* Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança

As formulações que apresentaram melhor desempenho nos testes de eficiência de incorporação e carregamento de furosemida (F2 e F4) foram avaliadas em formulações contendo somente alginato e em formulações modificadas por reticulação térmica e covalente, conforme Tabela 4.2. Assim como no caso anterior, as medidas foram feitas em triplicata e as suas médias foram avaliadas pelo Teste de Tukey com limite de confiança de 95%.

Tabela 4.2 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco

Formulação	Composição (% m/v)				Eficiência de incorporação (%)*	Carregamento (%)*
	Sericina	Alginato	Furosemida	PA		
F2	2,5	2,0	4,0	-	84,68±2,92 ^b	39,85±1,37 ^B
F4	2,5	2,8	4,0	-	77,31±0,56 ^a	33,25±0,24 ^D
BF2	-	2,0	4,0	-	78,14±0,48 ^a	52,10±0,32 ^F
BF4	-	2,8	4,0	-	75,87±1,10 ^a	44,63±0,64 ^G
FPA	2,5	2,0	4,0	0,5	95,38±1,18 ^c	42,39±0,53 ^H
TF2	2,5	2,0	4,0	-	99,84±0,20 ^c	46,98±0,09 ^I
TF4	2,5	2,8	4,0	-	97,01±0,84 ^c	41,72±0,36 ^{B,H}

* Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança

As formulações contendo somente alginato (BF2 e BF4) e a formulação F4 apresentam médias estatisticamente equivalentes a 95% de confiança. Quando são comparados apenas os valores numéricos das médias de eficiência de incorporação das partículas F2 e F4 com as médias das formulações sem sericina equivalentes (BF2 e BF4, respectivamente), pode-se notar que a sericina aumenta ligeiramente a eficiência de incorporação da furosemida na partícula. Esse aumento pode ser atribuído às características estruturais da sericina, que contem fortes grupos polares, como a carboxila e a hidroxila (Zhang, 2002). Quanto ao carregamento de fármaco, as formulações contendo somente alginato apresentam médias

maiores do que as formulações F2 e F4. Esse resultado já era esperado, uma vez que o carregamento é resultado da razão entre a massa do fármaco na partícula e a massa da partícula, que é aumentada com a adição da sericina.

A formulação contendo o agente reticulante proantocianidina (FPA) apresentou eficiência de incorporação maior que a formulação F2, que apresenta a mesma concentração de sericina, alginato e furosemida. Essa melhoria pode ser explicada pela formação de complexos insolúveis compostos pela proantocianidina com carboidratos e proteínas (Kim *et al.*, 2005). A formação desses complexos pode aprisionar o fármaco em seu interior, aumentando a sua incorporação. O carregamento de fármaco dessa partícula foi maior que na formulação F2, resultado da maior massa de fármaco incorporada na partícula.

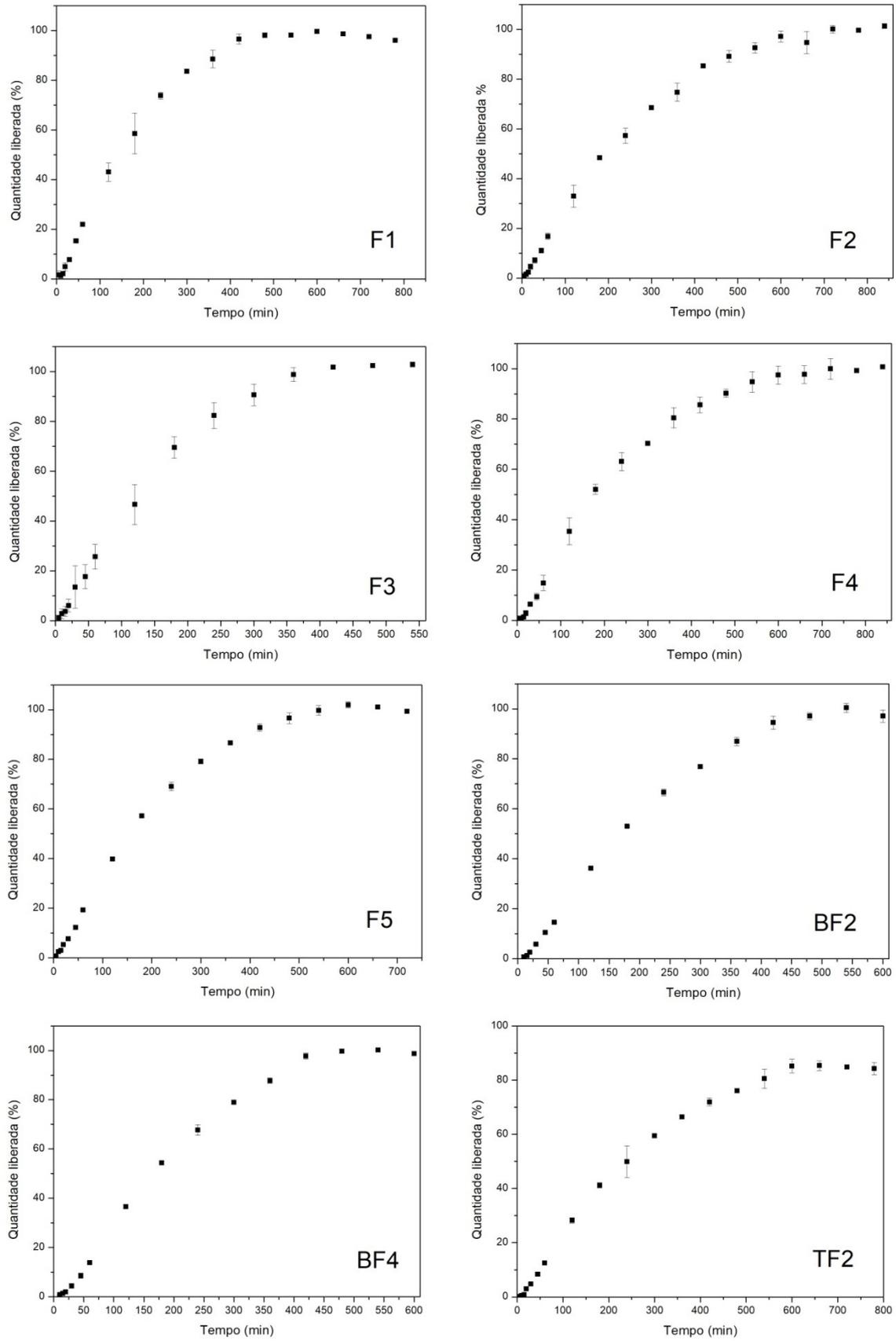
As formulações modificadas por reticulação térmica (TF2 e TF4) também apresentaram eficiência de incorporação superior às suas equivalentes. Segundo Aramwit *et al.* (2011), o aquecimento favorece a reticulação de proteínas, expondo os seus grupos sulfidrílicos, grupo funcional que consiste numa ligação entre átomos de enxofre e hidrogênio, resultando na formação de pontes dissulfetos. Com isso, forma-se uma barreira física que aprisiona o fármaco no interior da blenda. Apesar de estatisticamente iguais a 95% de confiança, as médias de eficiência de incorporação das partículas reticuladas termicamente são maiores que aquelas reticuladas por ligações covalentes, o que indica que esse tipo de reticulação é mais eficaz no aumento de incorporação do fármaco. A quantidade de fármaco nas partículas é maior, logo a sua proporção na partícula também é maior quando comparado com as partículas de mesma concentração de sericina, alginato e furosemida sem reticulação térmica.

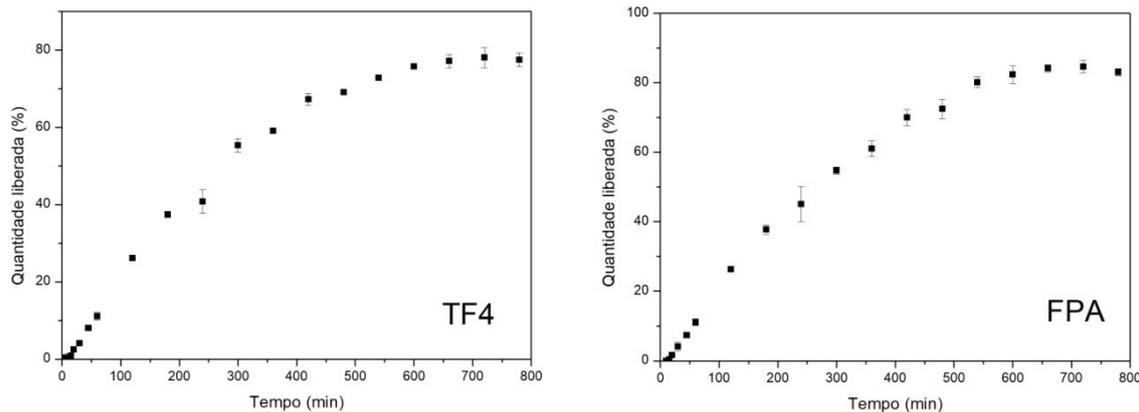
4.2. Dissolução *In Vitro* e Modelagem da Cinética de Liberação

4.2.1. Perfil de liberação *In Vitro*

A dissolução *in vitro* da furosemida foi realizada em solução tampão fosfato pH 5,8, que simula o meio entérico. As formulações foram deixadas em solução conforme condições descritas anteriormente no item 3.4 até que a concentração de droga liberada atingisse o equilíbrio. Os perfis de liberação obtidos são apresentados na Figura 4.1.

Figura 4.1- Perfil de liberação da furosemida nas formulações estudadas





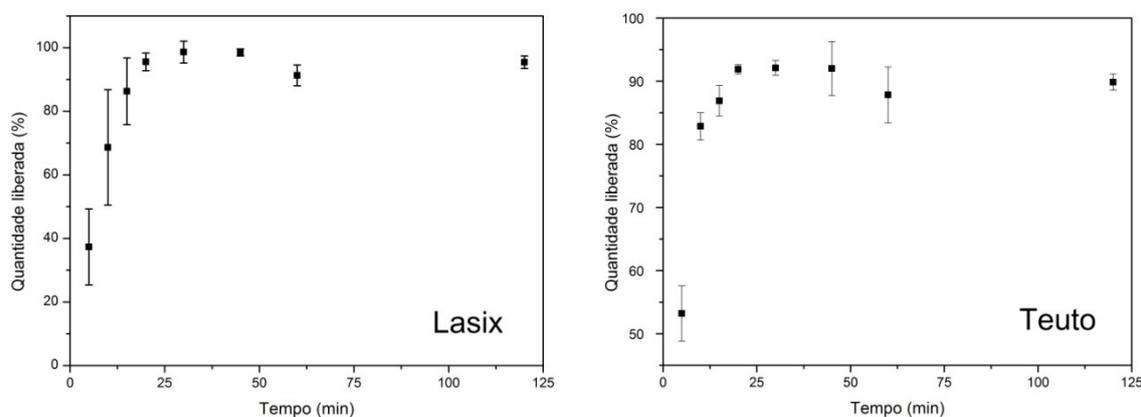
Das formulações F1-F5, aquelas que contêm maior quantidade de furosemida na fórmula (F2 e F4) apresentaram resultados superiores em relação às demais. Essas partículas tiveram sua maior concentração de fármaco por volta dos 720 minutos. As formulações F1 e F5 atingiram o equilíbrio em torno de 600 minutos ao passo que a formulação F3 apresentou o pior resultado entre o grupo de partículas mencionado, alcançando o equilíbrio aos 420 minutos. A formulação F3 é, dentre essas partículas, a que possui a menor proporção de furosemida em sua composição, o que pode ter levado ao seu desempenho inferior em relação às demais. As formulações TF2, TF4 e FPA chegaram ao equilíbrio em torno de 720 minutos, mesmo resultado obtido pelas partículas F2 e F4, o que pode indicar que as reticulações térmica e covalente não afetam o tempo de liberação do fármaco. No caso das formulações reticuladas térmica e covalentemente, a dose do fármaco não foi liberada em sua totalidade, o que pode ser atribuído a um maior aprisionamento do fármaco na blenda.

As partículas com ausência de sericina, BF2 e BF4, chegaram ao equilíbrio aos 540 minutos. Essas partículas têm as mesmas concentrações de alginato e furosemida em sua formulação que as partículas F2 e F4, respectivamente. Comparando o tempo em que essas formulações atingiram a liberação máxima de furosemida, é possível afirmar que a presença de sericina diminui a taxa de liberação de fármaco, prolongando o tempo de liberação. O aumento do tempo de liberação da dosagem de furosemida contida no medicamento diminui o número de dosagens diárias, uma vez que o fármaco é disponibilizado para o organismo por um período de tempo prolongado. Com isso, a adesão do paciente ao tratamento pode ser maior, já que são necessárias menos doses durante o dia.

Para efeito de comparação, dois medicamentos comerciais foram submetidos a testes de dissolução sob as mesmas condições das partículas com sericina e alginato. Os perfis de

liberação resultantes são apresentados na Figura 4.2. Os medicamentos escolhidos foram o Lasix[®] e Furosemida 40 mg do Laboratório Teuto Brasileiro. Esses medicamentos não são considerados de liberação modificada, porém não existe no mercado nacional comprimidos de furosemida para este propósito. Em ambos os casos, os medicamentos comerciais apresentaram liberação do fármaco em períodos de tempo bem mais curtos do que aqueles observados nas partículas de sericina e alginato. Além disso, os erros entre as medidas obtidas são bem maiores do que os apresentados pelas partículas da blenda polimérica.

Figura 4.2 – Perfil de liberação da furosemida em medicamentos comerciais



As partículas F2, F4, BF2, BF4, TF2, TF4 e FPA foram avaliadas quanto a sua gastrorresistência por dissolução em solução de HCl 0,1 M por um período de duas horas. O resultado está apresentado na Tabela 4.3.

A liberação de furosemida no meio ácido, que simula o ambiente gástrico, atingiu valores próximos de 2% para as formulações estudadas, indicando a natureza gastrorresistente das partículas, comparada da Farmacopéia Brasileira (2010) que considera as formulações que atingem liberação de até 10% da sua dose total na etapa de dissolução em meio ácido como gastrorresistente. As formulações F2 e F4 foram as únicas que apresentaram liberação da droga. O caráter gastrorresistente das partículas, responsável pelo adiamento da liberação do fármaco, é atribuído à presença dos grupos carboxílicos livres na molécula de alginato que contribuem para a solubilidade dependente do pH (Czarnocka e Alhnan, 2015), o que justifica a maior gastrorresistência das formulações BF2 e BF4. A maior gastrorresistência observada nas formulações TF2, TF4 e FPA pode ser atribuída aos processos de reticulação térmica e covalente, que fortalecem as estruturas do tipo “caixa-de-ovo” do alginato, dificultado a passagem dos cristais de fármaco.

Tabela 4.3 – Quantidade de furosemida liberada em meio ácido

Formulação	Qualidade liberada em meio ácido (%)
F2	2,12±0,67
F4	1,19±0,27
BF2	0,02±0,03
BF4	0,04±0,07
TF2	0,10±0,12
TF4	0,17±0,30
FPA	0,10±0,17

4.2.2. Modelagem matemática da cinética de liberação

Para se conhecer o mecanismo de liberação da furosemida nas formulações estudadas, foi feito o ajuste matemático aos dados obtidos para os perfis de liberação pelos modelos de ordem zero, primeira ordem, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hopfenberg para sistemas cilíndricos ($n=2$) e esféricos ($n=3$). Esses modelos foram previamente discutidos na seção 2.3.2 deste trabalho. Os critérios utilizados para a avaliação dos ajustes foi o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) e o critério de Akaike (AIC). Apesar do coeficiente de determinação (R^2) ser amplamente utilizado como critério de comparação entre dois modelos, esse fator tende a aumentar seu valor com o aumento do número de parâmetros. Como os modelos avaliados não têm o mesmo número de parâmetros, o uso do R^2_{aj} é mais adequado. Já o critério de Akaike é uma medida de adequação baseada na máxima verossimilhança, o modelo associado ao menor valor de AIC é considerado como o que melhor se adéqua ao conjunto de dados (Costa e Lobo, 2001). Os ajustes são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Ajuste dos modelos matemáticos para as formulações estudadas

Modelo	Parâmetro	Formulação									
		F1	F2	F3	F4	F5	BF2	BF4	TF2	TF4	FPA
Ordem zero	K_0	0,211	0,169	0,288	0,155	0,208	0,220	0,223	0,139	0,126	0,135
	R^2_{aj}	0,823	0,862	0,900	0,783	0,929	0,911	0,904	0,834	0,841	0,858
	AIC	103,192	141,901	93,702	172,599	124,977	99,623	101,282	150,158	145,404	136,781
Primeira ordem	K_1	0,0053	0,0039	0,0063	0,0042	0,0049	0,0046	0,0047	0,0029	0,0024	0,0026
	R^2_{aj}	0,965	0,976	0,943	0,973	0,963	0,925	0,904	0,989	0,983	0,985
	AIC	96,248	102,96	80,895	120,255	97,054	91,598	95,491	92,609	97,727	89,742
Weibull	a	929,892	961,737	904,124	1131,59	1068,04	2338,31	3449,15	489,917	376,941	661,53
	b	1,303	1,236	1,346	1,281	1,310	1,440	1,519	1,059	0,981	1,095
	R^2_{aj}	0,998	0,996	0,994	0,998	0,997	0,997	0,995	0,990	0,982	0,990
	AIC	56,732	73,016	56,240	75,7328	58,985	51,688	57,409	91,470	99,493	84,808
Higuchi	K_H	4,299	3,772	4,813	3,773	4,216	4,166	4,232	3,231	2,928	3,212
	R^2_{aj}	0,845	0,874	0,890	0,870	0,849	0,753	0,730	0,863	0,861	0,837
	AIC	119,287	130,576	96,803	150,7	118,23	107,349	109,344	136,237	132,875	129,384

Continuação da Tabela 4.4 – Ajuste dos modelos matemáticos para as formulações estudadas

Modelos	Parâmetros	Formulações									
		F1	F2	F3	F4	F5	BF2	BF4	TF2	TF4	FPA
Korsmeyer-Peppas	K_{KP}	0,323	0,358	0,396	0,178	0,258	0,149	0,102	0,272	0,324	0,276
	n	1,004	0,930	0,997	1,085	1,040	1,127	1,205	0,948	0,890	0,926
	R^2_{aj}	0,981	0,985	0,988	0,981	0,993	0,985	0,983	0,982	0,973	0,969
	AIC	40,897	43,4592	30,166	40,008	31,227	33,575	35,455	50,604	61,146	50,596
Hopfenberg; n=2	k_2	0,0019	0,0014	0,0024	0,0014	0,0018	0,0017	0,0018	0,0011	0,0009	0,0010
	R^2_{aj}	0,994	0,995	0,994	0,989	0,995	0,988	0,990	0,963	0,946	0,969
	AIC	70,031	76,939	52,726	105,043	65,839	67,940	75,692	118,479	122,375	106,071
Hopfenberg; n=3	k_3	0,0014	0,0011	0,0017	0,0011	0,0013	0,0012	0,0013	0,0008	0,0007	0,0007
	R^2_{aj}	0,992	0,996	0,986	0,993	0,993	0,976	0,963	0,978	0,964	0,982
	AIC	74,319	72,445	64,154	94,957	72,240	77,210	83,378	106,938	113,696	95,508

Diferentes modelos se ajustaram adequadamente às formulações estudadas, conforme destacado na Tabela 4.4. De maneira geral, o modelo de Weibull apresentou melhor ajuste para todas as formulações avaliadas. Esse modelo empírico se ajusta adequadamente a diversos tipos de curvas de dissolução. Por ser empírico, o modelo de Weibull não é capaz de caracterizar as propriedades cinéticas da liberação de fármacos. Apesar disso, esse modelo indica o formato da curva de dissolução a partir da análise do seu parâmetro de forma b . Quando $b = 1$, a curva é exponencial. Para $b > 1$, a curva é classificada como sigmoide (formato de S) e, para $b < 1$, a curva tem comportamento parabólico (Goldsmith *et al.*, 1978; Costa e Lobo, 2001). Todas as formulações estudadas têm suas curvas de dissolução em formato de S, exceto a formulação TF4, que apresenta perfil parabólico.

O modelo Korsmeyer-Peppas apresentou o menor valor de AIC para todas as formulações, o que indica que esse modelo também se ajusta bem aos dados. Ele é aplicado a formas farmacêuticas poliméricas quando o seu mecanismo de liberação não é conhecido ou quando ocorre mais de um tipo de fenômeno de liberação (Costa e Lobo, 2001). Os expoentes de liberação (n) de todas as formulações estudadas apresentam valores acima de $n > 0,89$ (formas cilíndricas) e $n > 0,85$ (formas esféricas), o que implica que o mecanismo de liberação das formulações estudadas é do tipo super transporte caso II, para formato esférico ou cilíndrico, respectivamente. Esse tipo de mecanismo é controlado pelo processo de relaxamento das macromoléculas pela absorção de água no sistema (Siepmann e Peppas, 2001).

O modelo de Hopfenberg para partículas cilíndricas e esféricas apresentou ajuste apropriado para as formulações F2 e F3. Este modelo assume que a etapa limitante da liberação do fármaco é a erosão da matriz polimérica e que as resistências difusionais dependentes do tempo, internas ou externas à matriz em erosão, não a influenciam. O modelo de primeira ordem se ajusta mais adequadamente à formulação TF4, ou seja, o fármaco é liberado de maneira proporcional à quantidade de droga remanescente em seu interior, de tal forma que a quantidade de droga liberada pela unidade de tempo diminui (Costa e Lobo, 2001).

Os modelos que apresentaram menor ajuste para todas as formulações foram o de ordem zero e o de Higuchi. No modelo de ordem zero, a mesma quantidade de droga é liberada por unidade de tempo. Já o modelo de Higuchi sugere que o mecanismo de liberação é regido pela

lei de Fick. De acordo com os modelos estudados, o mecanismo de liberação de furosemida nas partículas poliméricas, de modo geral, se dá pelo relaxamento e erosão das moléculas.

4.3. Caracterização das partículas carregadas com fármaco

4.3.1. Diâmetro, Distribuição de Tamanho e Análise Morfológica das Partículas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas foram analisados por microscopia óptica através da medida do diâmetro de 500 partículas. O diâmetro médio e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}) da distribuição normal (Gauss) são mostrados na Tabela 4.5 e os gráficos de distribuição de tamanho são mostrados na Figura 4.3.

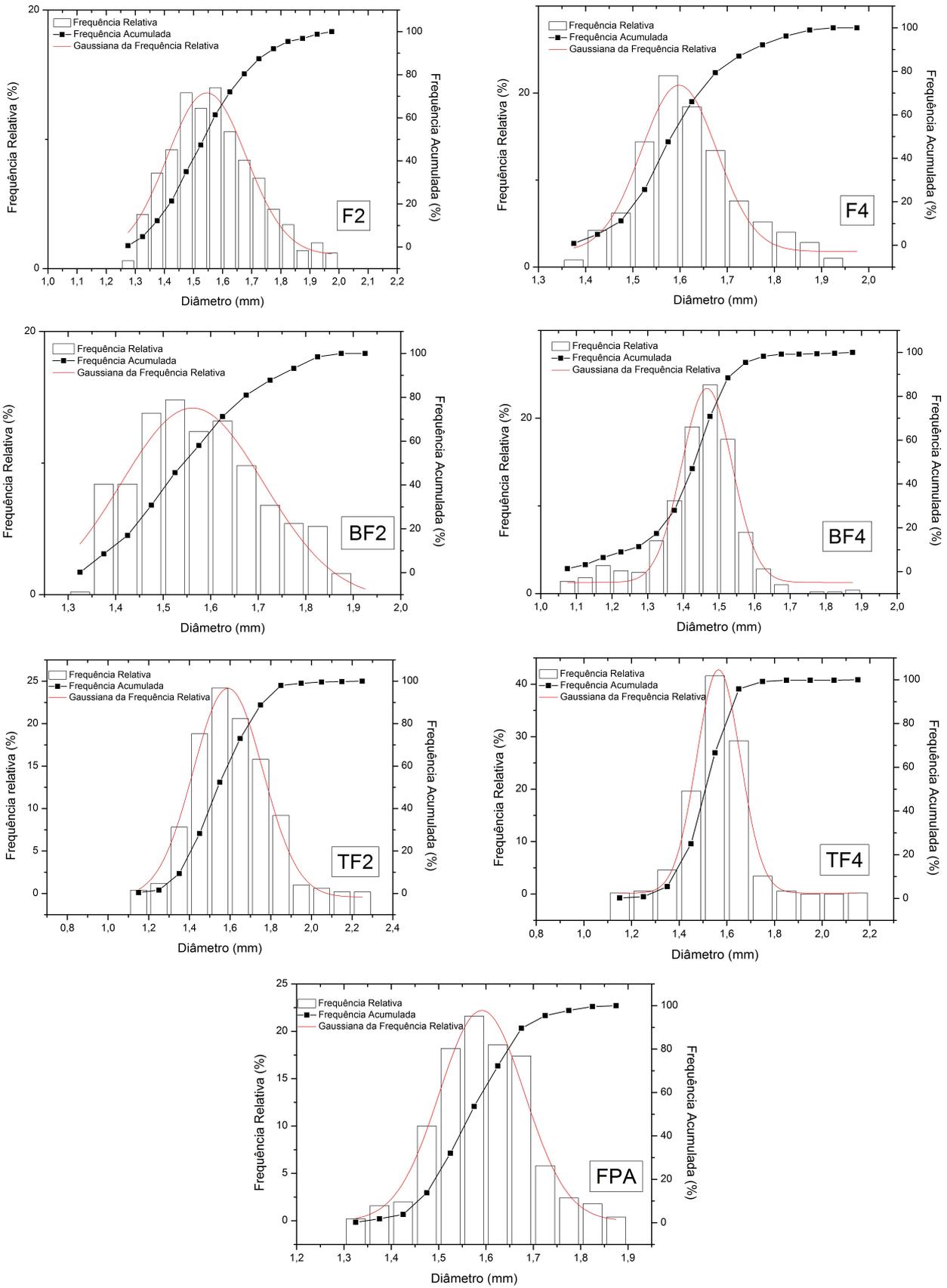
Tabela 4.5 – Diâmetro médio e coeficiente de determinação ajustado

Formulação	Diâmetro médio (mm)	R^2_{adj}
F2	1,572±0,148 ^a	0,945
F4	1,620±0,108 ^a	0,953
BF2	1,579±0,129 ^a	0,856
BF4	1,438±0,121 ^a	0,977
TF2	1,597±0,157 ^a	0,974
TF4	1,559±0,094 ^a	0,993
FPA	1,595±0,089 ^a	0,958

* Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança

O diâmetro médio das partículas variou de 1,438±0,121 a 1,620±0,108 mm. Quando avaliados pelo Teste de Tukey com limite de confiança de 95%, os diâmetros médios das formulações não apresentaram diferença estatística entre si, sugerindo que a presença/ausência da sericina na partícula, assim como o tipo de reticulação, não interfere no seu tamanho. O diâmetro das partículas estudadas é pequeno o suficiente para que elas possam ser armazenadas em cápsulas farmacêuticas, o que faz com que as mesmas sejam de fácil aplicação em sistemas multiparticulados. Além disso, o tamanho das partículas pode influenciar no tempo de liberação do fármaco, principalmente para os casos em que a liberação tem como etapas limitantes a difusão do fármaco pela matriz ou ainda a erosão da blenda polimérica.

Figura 4.3 – Perfil de distribuição de tamanho



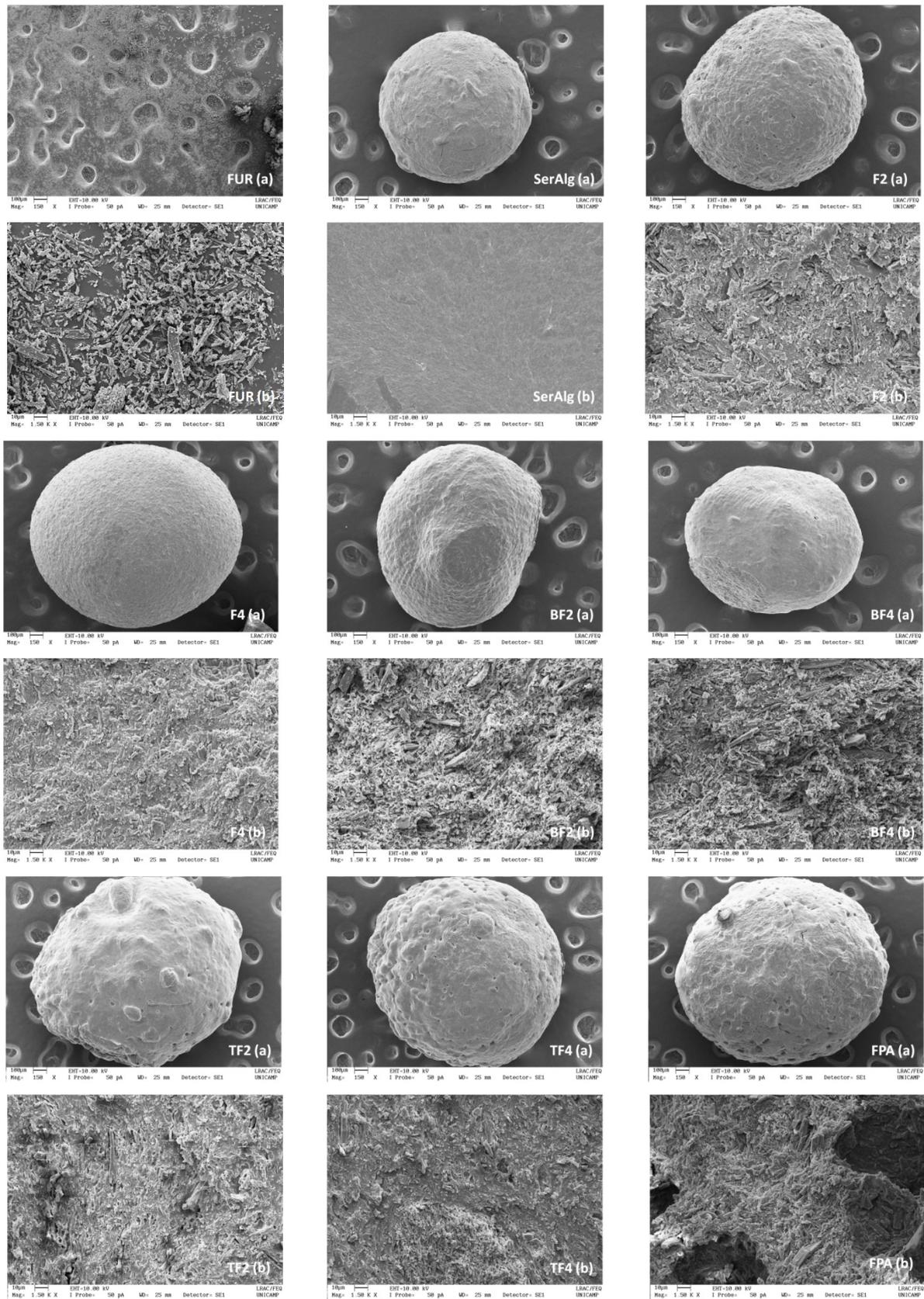
Os coeficientes de determinação apresentados na Tabela 4.5 são fornecidos pelo ajuste normal da Figura 4.3. Todas as formulações seguem a distribuição normal com valores elevados de R^2_{adj} , sendo que os melhores ajustes são encontrados em formulações com maior concentração de alginato (F4, BF4, TF4). Essa tendência é notada tanto em partículas contendo sericina como naquelas produzidas somente com alginato e fármaco. Isso indica que o alginato aumenta a homogeneidade de tamanho entre as partículas.

Estudos anteriores mostram que a adição de sericina na partícula melhora o ajuste Gaussiano da distribuição de tamanho das partículas (Vidart *et al.*, 2018), neste caso, isso não foi observado para as partículas F2 e F4. Um dos possíveis motivos é a alta viscosidade da solução de sericina/alginato/furosemida, que causa dificuldade na etapa de gotejamento, levando a produção de partículas com diferentes tamanhos. O ajuste Gaussiano foi mais adequado para as partículas da blenda que foram reticuladas por etapas térmicas e covalentes do que para as formulações gelificadas apenas por reticulação iônica, o que indica que a reticulação pode melhorar o ajuste de Gauss da distribuição de tamanho.

A análise morfológica das partículas foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as partículas de sericina e alginato carregadas com furosemida, partículas de alginato e furosemida e ainda para partículas de alginato e sericina, sem fármaco incorporado. Além disso, foram feitas imagens da furosemida pura. As micrografias estão apresentadas na Figura 4.4 com ampliação de 150 e 1500x, obtidas a partir do corte transversal das partículas a fim de mostrar seu interior.

As partículas em geral apresentam forma esférica, sendo aquelas sem sericina na composição, as que mais se afastam da esfericidade, logo a proteína favorece a esfericidade das partículas. As partículas que apresentam maior concentração de alginato apresentam superfície menos rugosa do que aquelas que contem menos alginato. Isso pode ser atribuído à capacidade de reticulação do alginato que quando em maior quantidade, forma mais estruturas compactas do tipo “caixa de ovo”. As partículas que receberam tratamento térmico apresentam mais deformidades na superfície que as demais, o que pode ser justificado pela reticulação acelerada decorrente da ação da temperatura.

Figura 4.4 – Micrografias da furosemina pura (FUR), da partícula de sericina/alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemina. Ampliação de: (a) 150x e (b) 1500x

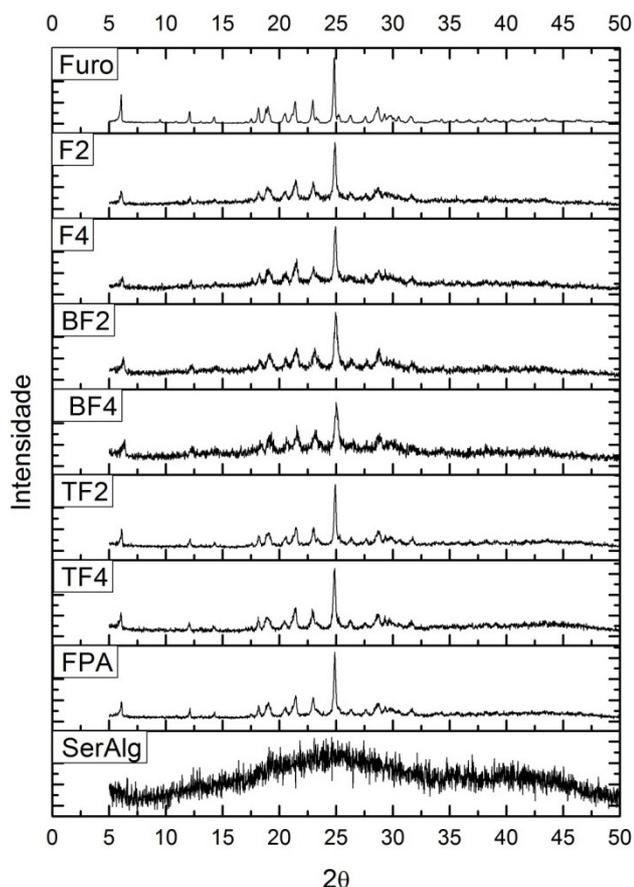


Comparando a micrografia do corte transversal da partícula contendo somente a blenda (SerAlg) com as demais, os cristais do fármaco podem ser facilmente observados, confirmando a presença da furosemida no interior da matriz polimérica. O corte transversal da formulação FPA mostra alguns poros, que podem ser resultado da incorporação de ar na matriz durante o processo de gotejamento.

4.3.2. Cristalinidade (DRX)

Os difratogramas de raio X da furosemida pura, da partícula de sericina e alginato e das partículas carregadas com fármaco são apresentados na Figura 4.5. Conforme apresentado por Vidart *et al.* (2018), tanto a sericina quanto o alginato apresentam estrutura amorfa, porém o difratograma da sericina pura apresentou um pico a 19° , resultado da conformação organizada folhas- β . A característica amorfa desses dois compostos foi confirmada pelo difratograma da partícula composta pela blenda (SerAlg).

Figura 4.5 – Difratogramas de raio X da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida



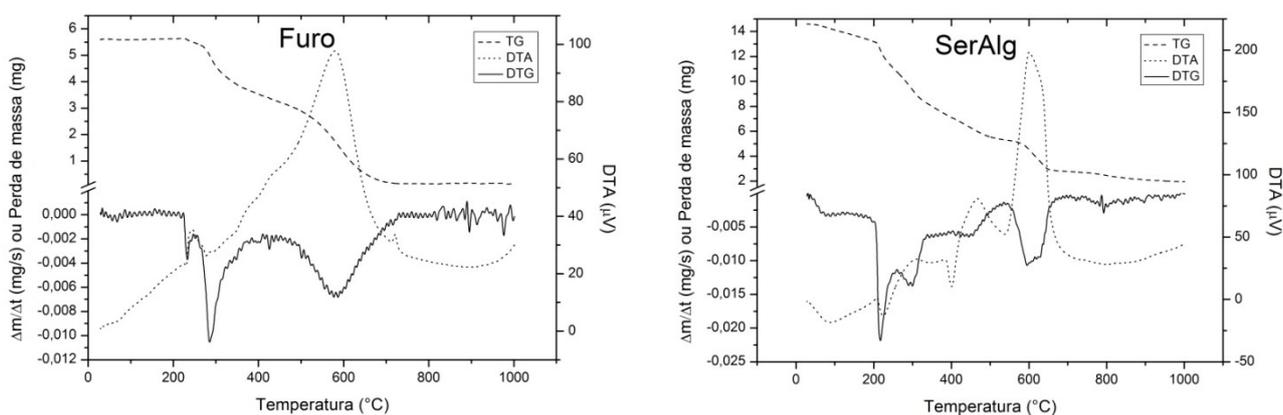
O difratograma da furosemida apresentou picos a $2\theta = 6,07^\circ, 18,15^\circ, 18,99^\circ, 21,39^\circ, 22,95^\circ, 24,83^\circ$ e $28,67^\circ$, indicando a natureza cristalina da droga. Os picos característicos da

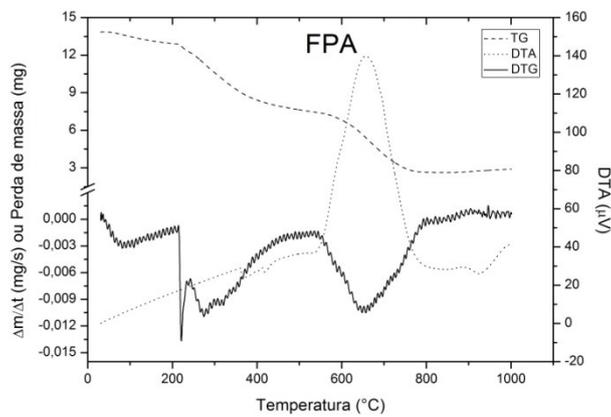
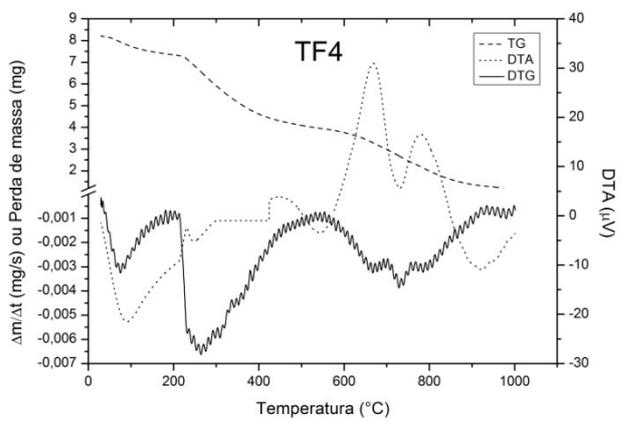
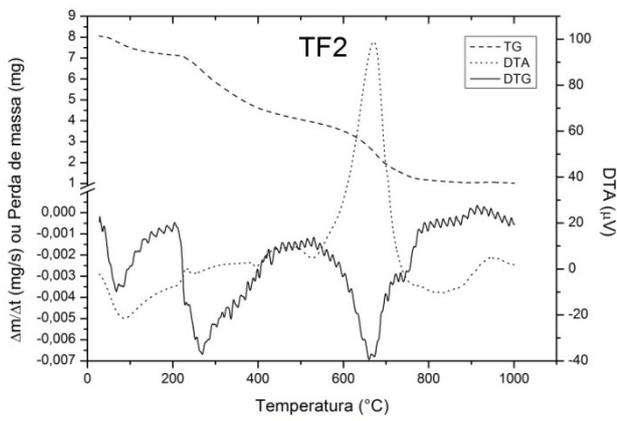
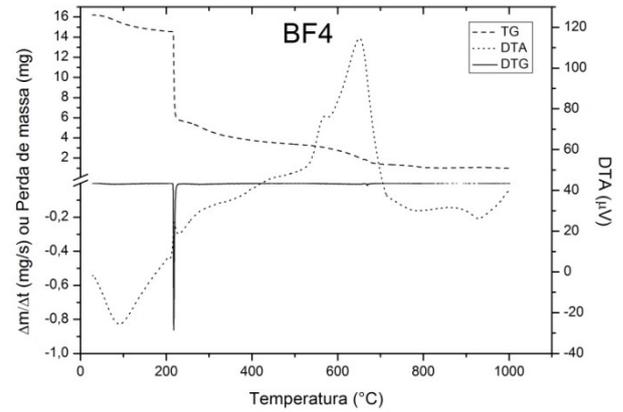
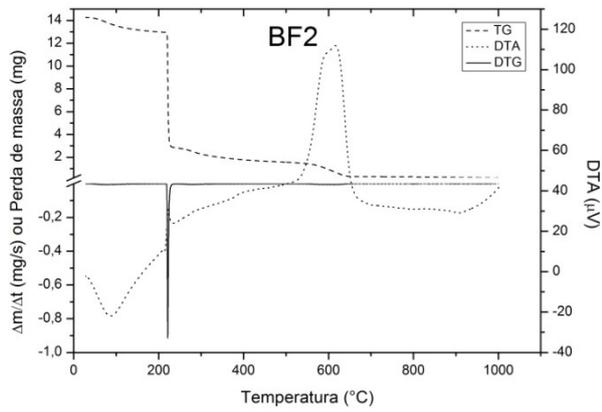
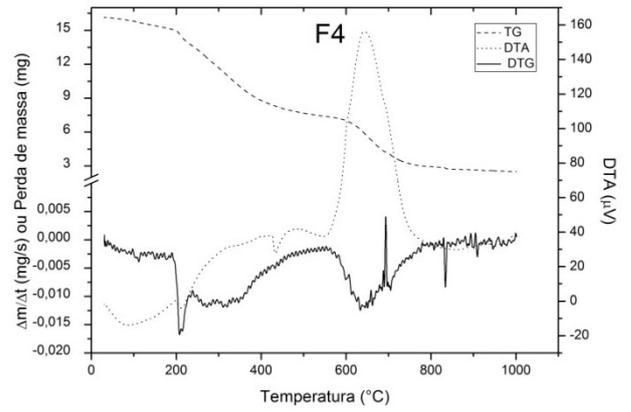
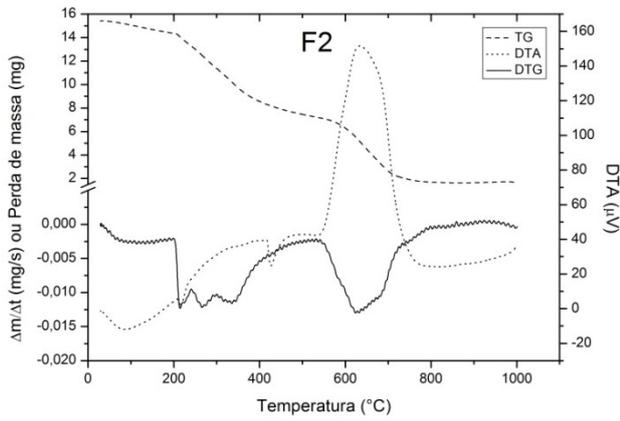
furosemida estão presentes em todas as formulações com diferentes intensidades de sinal. A diminuição da intensidade dos picos característicos da furosemida nas formulações apresentadas sugere uma amorfização da mesma quando incorporada na blenda polimérica. Além da presença da furosemida, os difratogramas das formulações apresentam maior cristalinidade que a partícula composta somente pela blenda de sericina e alginato, provavelmente por causa da forma cristalina dessa droga.

4.3.3. Análises Térmicas

A estabilidade e a decomposição térmica das partículas de sericina e alginato carregadas com furosemida, da furosemida e da partícula da blenda sem o fármaco foram analisadas por termogravimetria e efetuadas a avaliação das curvas de TG, DTG e DTA. A partir da curva de TG são obtidos dados de perda de massa em função da temperatura. As temperaturas nas quais ocorrem as perdas de massa mais significativas podem ser avaliadas pelas curvas de DTG, calculadas a partir da derivada da curva TG. É possível avaliar o número de eventos que ocasiona a perda de massa pelo número de picos da curva de DTG. A curva de DTA identifica se natureza das transformações ocorridas são endotérmicas ou exotérmicas. As amostras foram aquecidas de 30 a 1000 °C com taxa de aquecimento de 20 °C/min em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 ml/min. As curvas resultantes são apresentadas na Figura 4.6.

Figura 4.6 – TG, DTG e DTA da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida





A análise das curvas de TG e DTG indica que a estabilidade térmica da furosemida (Furo) se encontra em torno de 200 °C. A decomposição térmica deste composto ocorre em três etapas consecutivas. A primeira ocorre na faixa de 225-275 °C (\approx 0,266 mg), a segunda entre 275-520 °C (\approx 2,436 mg) e a terceira entre 520-720 °C (\approx 2,605 mg). A curva de DTG mostra que as perdas de massa estão associadas com três eventos distintos, os dois primeiros podem ser resultado da eliminação dos grupos NH_2SO_2 e COOH , substituintes do anel benzênico. O terceiro pico pode ser atribuído a pirólise final do fármaco, que tem como produto um resíduo carbonoso (Valladao *et al.*, 1996). A curva de DTA da furosemida apresenta três picos exotérmicos, sendo que o mais pronunciado corresponde à pirólise final do produto.

A partícula contendo somente a blenda de sericina e alginato (SerAlg) apresenta sua primeira perda de massa entre 50 e 200 °C, que pode ser atribuído à eliminação da umidade da partícula. A sericina, quando pura, apresenta evaporação de água até 110 °C, enquanto o alginato de sódio perde umidade entre 26 e 202 °C. A curva de TG apresenta uma etapa acentuada de perda de massa na faixa de 200-570 °C que, como mostrado na curva de DTG, é associada a eventos diversos, como a degradação de grupos aminas e a clivagem de ligações peptídicas da sericina e/ou a decomposição térmica do alginato (Soares *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). A curva de DTA apresentou tanto picos endotérmicos quanto exotérmicos. A perda inicial de massa (até 200 °C) apresentou picos endotérmicos suaves, resultado da evaporação da água. A sericina pura apresenta picos endotérmicos de DTA próximos a 212 e 319 °C, relacionados com o movimento molecular e a degradação térmica (Anghileri *et al.*, 2007). Na partícula estudada, esses picos aparecem com deslocamento em 216 e 297 °C, respectivamente. Os picos exotérmicos da curva de DTA que ocorrem na região de 470 e 600 °C podem ser atribuídos à degradação do alginato em Na_2CO_3 e à decomposição desse material (Patel *et al.*, 2016).

As análises térmicas das formulações F2, F4 e FPA apresentam resultados semelhantes entre si. As curvas de DTA das formulações citadas apresentam picos endotérmicos por volta de 200 °C que, assim como na partícula SerAlg, pode ser resultado da completa eliminação de umidade. Além disso, pode ser observado um evento exotérmico por volta de 600 °C em todas as formulações, devido à formação de Na_2CO_3 . Assim como para a furosemida, as curvas DTG das formulações F2, F4 e FPA apresentam picos decorrentes da eliminação dos grupos substituintes do anel benzênico por volta de 275 °C, sendo que o pico é mais pronunciado em partículas que apresentam melhor eficiência de incorporação do fármaco. As

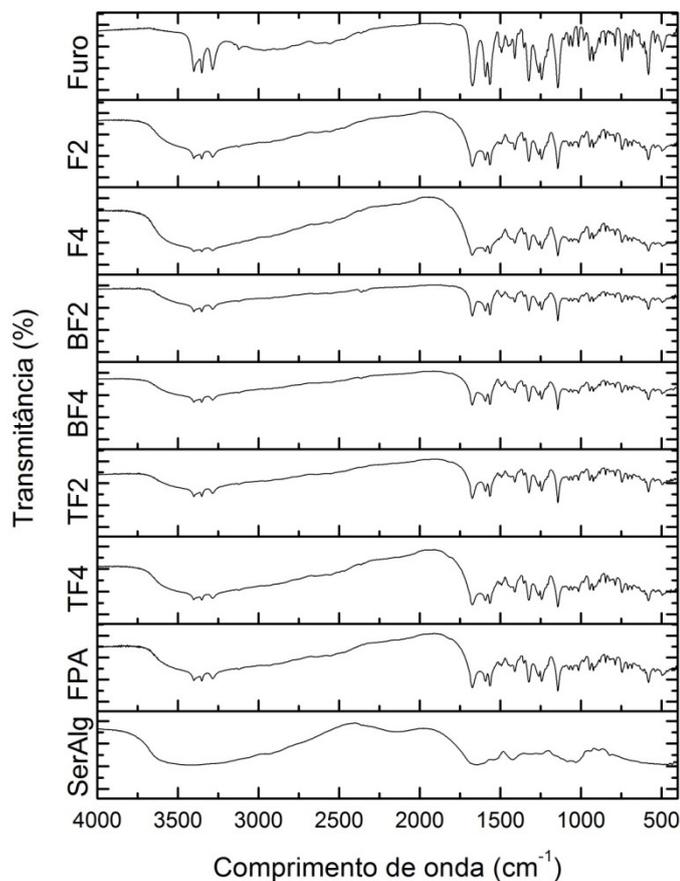
curvas de DTA das formulações TF2 e TF4 também mostram o caráter exotérmico por volta dos 600 °C. A perda de massa nessas partículas, diferentes das demais, ocorre em uma única etapa que pode ser resultado da combinação da eliminação dos grupos NH_2SO_2 e COOH da furosemida.

As partículas com ausência de sericina em sua composição (BF2 e BF4) apresentam comportamento similar. As curvas TG/DTG apresentam perda de massa elevada por volta de 220 °C, logo, quando comparadas com as formulações que contêm sericina, as formulações BF2 e BF4 apresentam estabilidade térmica inferior. Essa perda de massa acentuada pode ser resultado da combinação da degradação térmica do alginato e da eliminação dos grupos NH_2SO_2 e COOH da furosemida, que ocorrem por volta da mesma faixa de temperatura. A curva de DTA de ambas as formulações apresentou o comportamento exotérmico característico de degradação do alginato em torno de 600 °C.

4.3.4. Grupos funcionais

Os grupos funcionais presentes nos materiais foram avaliados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Os espectros de FT-IR da furosemida pura, da partícula de sericina e alginato e das partículas carregadas com fármaco são apresentados na Figura 4.7. O espectro da partícula sem o fármaco (SerAlg) apresenta as bandas características do polímeros que a compõe. As bandas relacionadas com os estiramentos das ligações $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$ dos grupos carboxílicos são observadas à 1580 e 1510 cm^{-1} , respectivamente. Além dessas, é possível observar bandas ligadas ao grupo $\text{N}-\text{H}$ em 1530 cm^{-1} . Na região entre 1200 e 1000 cm^{-1} são encontrados bandas de absorção relacionadas com a absorção característica de polissacarídeos por sacarídeos (Vidart *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2018a).

Figura 4.7 – Espectro FTIR da furosemida pura (Furo), da partícula de sericina e alginato (SerAlg) e das partículas carregadas com furosemida



Os espectros da furosemida pura e das formulações que a contem são similares. As bandas características da furosemida são verificadas em todos os espectros, o que confirma a incorporação da mesma. As bandas nas regiões de 3400 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos das ligações N–H, no primeiro caso especificamente da sulfonamida primária. As bandas em 1670 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos das ligações C=O e C=C do benzeno, respectivamente. Em 1672 cm^{-1} encontra-se uma banda característica da deformação angular da ligação N–H. O alongamento assimétrico do grupo S=O é representado pela banda em 1260 cm^{-1} (Agarwal *et al.*, 2008; Sahu e Das, 2014).

Os espectros das formulações contendo furosemida apresentam bastante similaridade com o espectro da furosemida pura, sugerindo que não há interação entre a furosemida e a blenda de sericina e alginato, o que confirma a compatibilidade do fármaco com a blenda.

4.4. Estudo de Estabilidade

As formulações F2 e F4 foram avaliadas a partir do estudo de estabilidade acelerada. O teste foi realizado em estufa climática a 40 °C e com umidade relativa de 75% UR por 180

dias, com uma retirada aos 90 dias de experimento. O objetivo desse estudo foi detectar mudanças de natureza química e/ou física das formulações, que foram avaliadas por análises de eficiência de incorporação e carregamento do fármaco na partícula, teste de dissolução e observação das características físicas da partícula. Os resultados foram comparados com as partículas não submetidas às condições forçadas de temperatura e umidade.

As eficiências de incorporação e o carregamento de fármaco nas partículas são mostrados na Tabela 4.6. Assim como anteriormente, foi realizado o teste de Tukey a fim de verificar as equivalências estatísticas a 95% de confiança entre as medidas. Tanto a eficiência de incorporação como o carregamento de fármaco na partícula se mantiveram estatisticamente equivalentes após 90 dias de armazenamento em câmara climática para ambas as formulações. Após 180 dias de teste houve uma redução estatisticamente significativa na eficiência de incorporação e no carregamento de fármaco da formulação F2. Para a formulação F4, o carregamento de fármaco se manteve constante, segundo análise estatística, e a eficiência de incorporação, assim como para F2, diminuiu. A diminuição na eficiência de incorporação das partículas pode ter sido causada pela perda de fármaco durante o processo devido às transformações físicas ocorridas, conforme Figura 4.9.

Tabela 4.6 – Eficiência de incorporação e carregamento de fármaco das partículas F2 e F4 após teste de estabilidade acelerado

Formulação	Tempo de armazenamento	Eficiência de incorporação (%) [*]	Carregamento (%) [*]
F2	-	84,68±2,92 ^a	39,85±1,37 ^A
	90 dias	86,51±1,44 ^a	40,71±0,68 ^A
	180 dias	71,44±1,81 ^c	33,62±0,85 ^B
F4	-	77,31±0,56 ^b	33,25±0,24 ^B
	90 dias	82,73±0,00 ^{a,b}	35,58±0,00 ^{A,B}
	180 dias	65,60±1,58 ^c	28,22±0,68 ^B

* Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança

Os perfis de liberação das formulações F2 e F4 após o teste de estabilidade é mostrado na Figura 4.8, as formulações foram avaliadas depois de 90 e 180 dias. Após 90 dias de armazenamento as partículas avaliadas pelo teste de dissolução apresentaram desempenho semelhante àquelas testadas anteriormente. Ambas as formulações atingiram máxima concentração por volta de 840 minutos, tempo superior ao atingido pelas partículas não armazenadas em estufa. Após 180 dias de teste, os perfis de liberação das formulações

apresentaram mudanças mais pronunciadas quando comparados com as partículas armazenadas por 90 dias e antes do armazenamento, atingindo concentração máxima por volta de 960 minutos. Devido às mudanças físicas ocorridas durante o teste de estabilidade, as dissoluções foram realizadas com as partículas no interior das cápsulas de gelatina, o que pode ter acarretado o aumento no tempo de dissolução.

No teste de dissolução em meio que simula o ambiente gástrico as formulações mantiveram a sua liberação em torno de 2% após 90 e 180 dias, assim como observado anteriormente. Os dados desse teste estão apresentados na Tabela 4.7.

Figura 4.8 – Perfil de liberação das partículas F2 e F4 após estudo de estabilidade

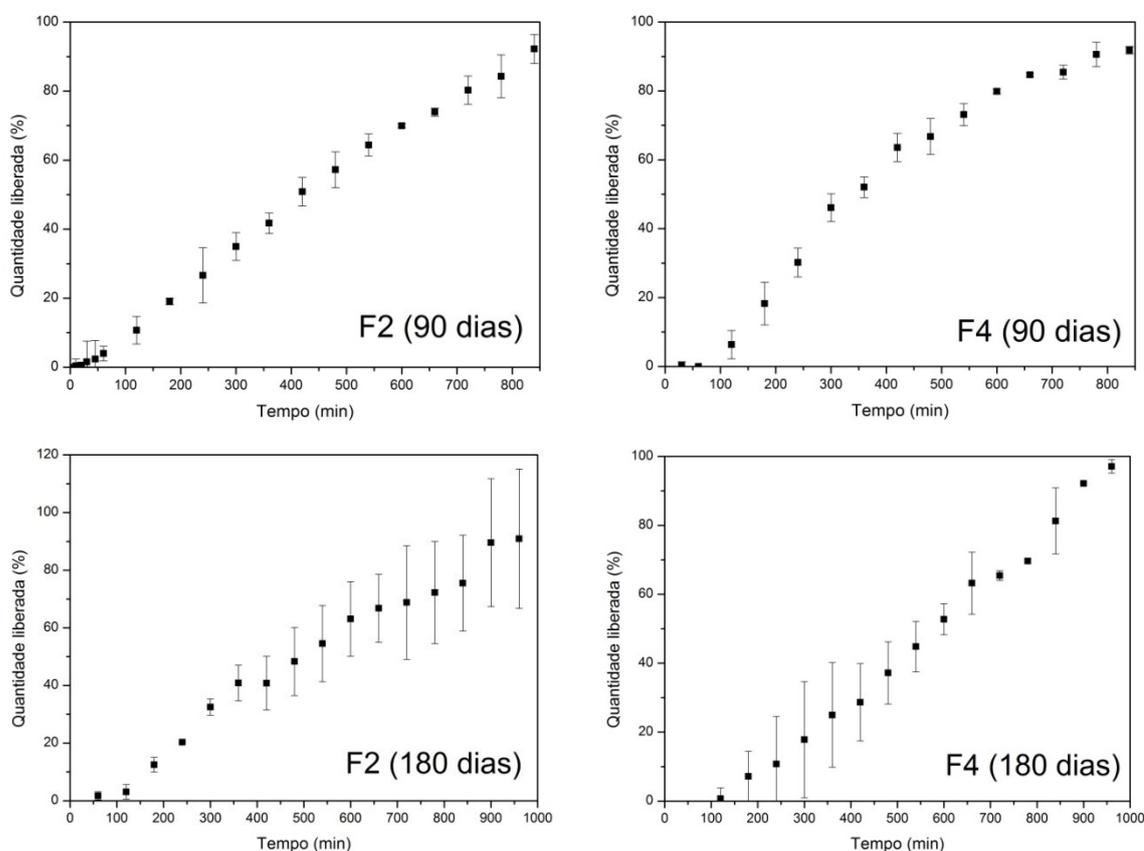


Tabela 4.7 – Quantidade de furosemida liberada em meio ácido pelas formulações F2 e F4 após estudo de estabilidade

Formulação	Tempo de armazenamento	Quantidade liberada (%) [*]
F2	-	2,12±0,67
	90 dias	0,99±0,16
	180 dias	1,55±0,12
F4	-	1,19±0,27
	90 dias	1,66±0,37
	180 dias	1,63±0,25

Os ajustes dos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hopfenberg aos dados obtidos a partir das curvas de dissolução das partículas avaliadas pelo teste de estabilidade acelerada (Tabela 4.8) apresentaram comportamentos similares aos observados anteriormente.

Os modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull apresentaram ajuste adequado ao perfil de liberação fornecido pela formulação F2 após 3 meses de teste. Assim como discutido anteriormente, esses modelos caracterizam o mecanismo de dissolução como sendo principalmente regido pelo processo de relaxamento das macromoléculas pela absorção de água no sistema (Siepmann e Peppas, 2001). A partir da análise do parâmetro b do modelo de Weibull sabe-se que a curva de dissolução dessa formulação é uma sigmoide, já que $b > 1$. Após 6 meses de armazenamento, os modelos de Weibull e ordem zero apresentaram melhor ajuste ao perfil de liberação da formulação F2, onde a quantidade de droga liberada por unidade de tempo é constante.

Os modelos de Weibull e Hopfenberg com $n=2$ se ajustaram adequadamente aos dados de dissolução da formulação F4, após 90 dias de armazenamento em estufa. Assim como F2, essa formulação também tem perfil de dissolução do tipo sigmoide. O bom ajuste do modelo de Hopfenberg sugere que a etapa limitante da liberação do fármaco seja a erosão da blenda polimérica de sericina e alginato. O ajuste do modelo de Korsmeyer-Peppas para essa formulação apresenta R^2_{aj} negativo, isso ocorre quando o número de pontos observados é menor que o número de parâmetros estimados. Apesar disso, esse modelo apresenta o segundo menor AIC entre os modelos avaliados, o que pode ser um indicativo de um bom ajuste. Passados 6 meses, os modelos que melhor se ajustaram foram Weibull e ordem zero.

Tabela 4.8 – Ajuste dos modelos matemáticos para as formulações F2 e F4 após teste de estabilidade acelerado

Modelo	Parâmetro	Formulação			
		F2		F4	
		90 dias	180 dias	90 dias	180 dias
Ordem zero	K_0	0,113	0,096	0,125	0,091
	R^2_{aj}	0,988	0,955	0,901	0,827
	AIC	79,313	91,430	93,690	103,213
Primeira ordem	K_1	0,002	1,000	1,000	1,000
	R^2_{aj}	0,877	0,189	0,161	0,186
	AIC	115,146	176,448	150,211	166,268
Weibull	a	15068,6	20021,9	16178,4	2,34e6
	b	1,536	1,542	1,589	2,255
	R^2_{aj}	0,995	0,967	0,985	0,972
	AIC	64,814	87,917	67,025	81,809
Higuchi	K_H	2,632	2,433	2,976	2,252
	R^2_{aj}	0,598	0,433	0,550	0,154
	AIC	133,756	126,458	108,228	128,745
Korsmeyer-Peppas	K_{KP}	0,047	-0,053	-1,072	-0,860
	n	1,154	2,18e-13	1,303	9,21e-15
	R^2_{aj}	0,995	0,070	-0,002	0,068
	AIC	33,659	99,411	68,604	98,095
Hopfenberg; n=2	k_2	0,0007	0,0006	0,0008	0,0005
	R^2_{aj}	0,964	0,904	0,923	0,600
	AIC	95,939	100,175	85,879	114,581
Hopfenberg; n=3	k_3	0,0005	0,0004	0,006	0,0003
	R^2_{aj}	0,940	0,864	0,889	0,526
	AIC	103,991	104,933	90,059	117,092

Além de ter eficiência de incorporação, carregamento de fármaco e perfil de dissolução afetados pelo estudo de estabilidade acelerado, as formulações apresentaram mudanças físicas significativas que impediriam a sua comercialização, como mostrado na Figura 4.9. As partículas da blenda polimérica carregadas com furosemida aderiram à superfície da cápsula de gelatina. Um possível motivo desse problema é a umidade remanescente nas partículas.

Uma provável solução seria a adição de uma etapa de reticulação térmica, de modo que toda a umidade contida na partícula fosse eliminada.

Figura 4.9 – Cápsulas de F2 e F4 após estudo de estabilidade acelerada



4.5. Considerações sobre os resultados obtidos

Este capítulo apresentou os resultados obtidos nessa pesquisa e também a análise crítica do que foi apresentado em cada etapa. Primeiramente, foram abordados os resultados do estudo de eficiência de incorporação e carregamento do fármaco na partícula. A partir desta etapa foi possível determinar a massa de partículas necessária para atingir 40 mg de fármaco, dose adotada comercialmente. Foi feito o estudo de dissolução para avaliar o perfil de liberação da furosemida em cada formulação e a sua modelagem cinética. Por último, foram apresentadas as análises de caracterização das formulações que apresentaram melhor desempenho nas etapas anteriores. Todos os resultados discutidos nesse capítulo indicaram que a furosemida foi incorporada com sucesso na matriz polimérica e que a dose do fármaco foi liberada em tempo superior ao apresentado pelos medicamentos comerciais. Também foi verificado que a utilização da sericina na composição na blenda pode prolongar o tempo de liberação do fármaco estudado.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foi investigada a capacidade de incorporação de furosemida pela blenda polimérica de sericina e alginato bem como a possibilidade de modificação do perfil de liberação dessa droga. Esse estudo poderá servir de base para outros que tenham como propósito a liberação modificada de fármacos por matrizes poliméricas naturais e também auxiliar no entendimento dos mecanismos de liberação de fármaco através da matriz de sericina e alginato. As conclusões mais significativas e algumas sugestões para estudos futuros são apresentados a seguir.

5.1. Conclusões

A blenda polimérica de sericina e alginato foi investigada como uma matriz alternativa para liberação modificada de furosemida. As partículas contendo o fármaco foram produzidas com sucesso pela técnica de gelificação iônica. As formulações estudadas apresentaram eficiência de incorporação entre $73,39\% \pm 2,92\%$ e $99,84\% \pm 0,20\%$, considerada satisfatória em todos os casos. De maneira geral, as partículas compostas pela blenda de sericina e alginato apresentaram eficiência maior que aquelas cuja matriz tinha como base somente o alginato de sódio. As partículas que passaram pelos processos de reticulação térmica ou covalente apresentaram as maiores eficiências de incorporação, uma vez que as mesmas aprisionaram o fármaco na matriz de forma mais eficiente.

Foram realizados estudos de dissolução em ambiente que simula o meio entérico a fim de conhecer o perfil de liberação da furosemida nas diferentes formulações, bem como o seu mecanismo de liberação. O tempo de liberação da dose de furosemida em cada formulação variou entre 420 e 720 minutos. Os medicamentos atualmente comercializados apresentam liberação da mesma quantidade de furosemida em torno de 120 minutos, tempo bem menor que o apresentado pelas partículas desenvolvidas para esse estudo. O teste de dissolução em meio ácido confirmou a gastrorresistência das partículas, característica atribuída à presença do alginato, logo a liberação da furosemida nas partículas estudadas pode ser classificada como prolongada e retardada, uma vez que o fármaco quase não é liberado em meio ácido. O estudo dos modelos da cinética de liberação da furosemida sugere que o seu mecanismo seja regido pelo processo de relaxamento das macromoléculas, pela absorção de água no sistema e pela erosão da matriz.

O diâmetro médio das partículas foi avaliado por microscopia óptica e variou entre $1,438 \pm 0,121$ a $1,620 \pm 0,108$ mm, tamanho adequado para aplicação em sistemas multiparticulados. A presença da furosemida nas formulações foi comprovada a partir das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde os cristais da droga são facilmente identificados no corte transversal das partículas avaliadas. A análise de difração de raio X (DRX) mostra os picos característicos da furosemida nas formulações avaliadas, o que também indica a presença do fármaco na partícula. O espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) confirma a compatibilidade entre o fármaco e os componentes da matriz polimérica, uma vez que nenhuma interação foi identificada. A estabilidade térmica da furosemida não foi alterada após a sua incorporação na blenda de sericina e alginato.

O estudo de estabilidade acelerado mostrou que as partículas armazenadas ainda necessitam de ajustes para atender as necessidades do mercado, uma vez que as mesmas apresentaram mudanças nas análises de eficiência de incorporação, carregamento de fármaco, perfil de liberação e, além disso, alterações físicas.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

A metodologia utilizada neste trabalho foi elaborada para que os experimentos fossem concluídos no prazo de um ano. Futuramente, estudos similares poderão adaptar a metodologia utilizada para a incorporação de diferentes fármacos. Sugere-se a adição dos testes de citotoxicidade, visando verificar se o material promove ou não alteração metabólica nas células cultivadas, e ainda, recomenda-se o estudo de dissolução *in vivo*, a fim de obter perfis de dissolução cada vez mais próximos dos reais.

Em relação à estabilidade das formulações, recomenda-se a sua avaliação a partir do teste de estabilidade acelerado e de longa duração para as formulações que foram reticuladas por via térmica ou covalente. O estudo de estabilidade de longa duração também é indicado para as formulações que já foram avaliadas pelo teste de curta duração neste trabalho.

A fim de avaliar a viabilidade da aplicação prática/comercial do aprisionamento da furosemida em matriz de sericina e alginato, sugere-se uma análise econômica do processo. Propõe-se também a substituição do agente gelificante alginato de sódio por outros compostos que tem propriedades similares, como a quitosana.

REFERÊNCIAS

ABDUL, S.; PODDAR, S. S. A flexible technology for modified release of drugs: multi layered tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 393-405, 2004/07/07/ 2004. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904001865> >.

AGARWAL, S. P.; ANWER, M. K.; AQIL, M. Complexation of Furosemide with Fulvic Acid Extracted from Shilajit: A Novel Approach. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 5, p. 506-511, 2008/01/01 2008. ISSN 0363-9045. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/03639040701744053> >.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A.; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, F. **Farmacopeia Brasileira - Monografias**. 5ª. Brasília: 2010.

ALBARGHOUTH, M. et al. Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, n. 1, p. 23-34, 2000/09/25/ 2000. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300004701> >.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A. J. Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 431-439, 2004/07/07/ 2004. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904001476> >.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. Respiração e excreção. In: (Ed.). **Biologia dos organismos**. 2. São Paulo: Editora Moderna, 2004. p.512-530.

ANGHILERI, A. et al. Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 508-519, 2007. ISSN 0168-1656.

ANVISA, A. N. D. V. S.-. **Lei nº 5.991 de 17 de dezembro de 1973**. . Brasília 1973.

_____. **RE nº 1 - Guia para realização de estudos de estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União 2005.

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, 2012/03/01 2011. ISSN 0734-242X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1177/0734242X11404733> >. Acesso em: 2018/04/10.

ASHFORD, M. Bioavailability - physicochemical and dosage form factors. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Pharmaceuticals: The science of dosage form design**: Churchill Livingstone, 2001a. p.234 - 252.

ASHFORD, M. Assessment of biopharmaceutical properties. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Pharmaceuticals: The science of dosage form design**: Churchill Livingstone, 2001b. p.253 - 274.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010. ISSN 1549-9634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007> >. Acesso em: 2018/04/21.

BARAJAS-GAMBOA, J. A. et al. Aplicaciones de la sericina: una proteína globular proveniente de la seda. **Ingeniería y Competitividad**, v. 18, n. 2, p. 193-206, 2016. ISSN 2027-8284.

BHAGWAT, R.; VAIDHYA, I. Novel drug delivery systems: An overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 970, 2013. ISSN 0975-8232.

BOURNE, D. W. A. Pharmacokinetics. In: BANKER, G. S. e RHODES, C. T. (Ed.). **Modern Pharmaceutics**. 4. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.

BRASIL, M. D. S. **Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Política Nacional de Medicamentos**. 1998.

BUXTON, I. L. O.; BENET, L. Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A., et al (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**: McGraw Hill, 2012.

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, 2008/12/01/ 2008. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738808008387> >.

CHAULANG, G. et al. Formulation and evaluation of solid dispersions of furosemide in sodium starch glycolate. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 43-51, 2009. ISSN 1596-9827.

COLLETT, J. H.; MORETON, C. Modified-release peroral dosage forms. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Pharmaceuticals: The science of dosage form design**: Churchill Livingstone, 2001. p.289 - 305.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001/05/01/ 2001. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701000951> >.

CZARNOCKA, J. K.; ALHNAN, M. A. Gastro-resistant characteristics of GRAS-grade enteric coatings for pharmaceutical and nutraceutical products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1, p. 167-174, 2015/05/30/ 2015. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315002550> >.

DAS, M.; SENAPATI, P. Furosemide-loaded alginate microspheres prepared by ionic cross-linking technique: Morphology and release characteristics. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 70, n. 1, p. 77, 2008.

DASH, B. C.; MANDAL, B. B.; KUNDU, S. C. Silk gland sericin protein membranes: Fabrication and characterization for potential biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 4, p. 321-329, 2009/12/01/ 2009. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816560900426X> >.

DASH, S. et al. **Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems**. 2010. 217-23.

DEY, N.; MAJUMDAR, S.; RAO, M. Multiparticulate drug delivery systems for controlled release. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1067-1075, 2008. ISSN 1596-9827.

DUCHARME, M. P. Drug Elimination, Clearance, and Renal Clearance. In: SHARGEL, L. e YU, A. B. C. (Ed.). **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 7: McGraw-Hill, 2012.

FREDDI, G.; MOSSOTTI, R.; INNOCENTI, R. Degumming of silk fabric with several proteases. **Journal of Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 101-112, 2003/12/05/ 2003. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165603002475> >.

FREITAS, E. D. D. et al. Development of sericin/alginate beads of ketoprofen using experimental design: Formulation and in vitro dissolution evaluation. **Powder Technology**, 2018/05/17/ 2018b. ISSN 0032-5910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591018303802> >.

FREITAS, E. D. D. et al. Development of mucoadhesive sericin/alginate particles loaded with ibuprofen for sustained drug delivery. **Particuology**, 2018a. ISSN 1674-2001. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674200118300646> >.

GANDHI, R.; LAL KAUL, C.; 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, 1999/04/01/ 1999. ISSN 1461-5347. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1461534799001364> >.

GENÇ, G.; NARIN, G.; BAYRAKTAR, O. Spray drying as a method of producing silk sericin powders. **J. AMME**, v. 1, p. 78-86, 2009.

GERK, P. M.; YU, A. B. C.; SHARGEL, L. Physiologic Factors Related to Drug Absorption. In: SHARGEL, L. e YU, A. B. C. (Ed.). **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 7: McGraw-Hill, 2012.

GIANOTTO, E. A. D. S. et al. Dissolution test for glibenclamide tablets. **Química Nova**, v. 30, p. 1218-1221, 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000500031&nrm=iso >.

GIMENES, M. L. et al. 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, 2014. ISSN 2010-0221.

GOLDSMITH, J. A.; RANDALL, N.; ROSS, S. D. On methods of expressing dissolution rate data. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 347-349, 1978. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-7158.1978.tb13253.x> >.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 194-205, 2012/12/01/ 2012. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002670> >.

GRANERO, G. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Furosemide. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 6, p. 2544-2556, 2010. ISSN 1520-6017.

GULRAJANI, M. Degumming of silk. **Coloration Technology**, v. 22, n. 1, p. 79-89, 1992. ISSN 1478-4408.

GULRAJANI, M. et al. Studies on structural and functional properties of sericin recovered from silk degumming liquor by membrane technology. **Journal of applied polymer science**, v. 113, n. 5, p. 2796-2804, 2009. ISSN 1097-4628.

GUPTA, D. et al. Cleaner process for extraction of sericin using infrared. **Journal of cleaner production**, v. 52, p. 488-494, 2013. ISSN 0959-6526.

GUPTA, D.; AGRAWAL, A.; RANGI, A. Extraction and characterization of silk sericin. **Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)**, v. 39, n. 4, p. 364-372, 2014. ISSN 0975-1025.

HAN, B. et al. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65A, n. 1, p. 118-124, 2003. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.10460> >.

HE, S.; HONG, Z. Drug Elimination and Hepatic Clearance. In: SHARGEL, L. e YU, A. B. C. (Ed.). **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 7: McGraw-Hill, 2012b.

HWANG, S.-J. et al. Release characteristics of ibuprofen from excipient-loaded alginate gel beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, n. 1, p. 125-128, 1995/03/14/ 1995. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517394002819> >.

JAFARINEJAD, S. et al. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. **Powder Technology**, v. 222, p. 65-70, 2012/05/01/ 2012. ISSN 0032-5910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591012000708> >.

JANTZEN, G. M.; ROBINSON, J. R. Sustained- and Controlled-Release Drug-Delivery Systems. In: (Ed.). **Modern Pharmaceutics**. 4. New York Marcel Dekker, Inc., 2002.

JĂTARIU, A. N. et al. Covalent and ionic co-cross-linking—An original way to prepare chitosan–gelatin hydrogels for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 98A, n. 3, p. 342-350, 2011. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.33122> >.

KASIM, N. A. et al. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004/01/01 2004. ISSN 1543-8384. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/mp034006h> >.

KATO, N. et al. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 145-147, 1998. ISSN 1347-6947.

KHAN, M. M. R. et al. Physical properties and dyeability of silk fibers degummed with citric acid. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8439-8445, 2010/11/01/ 2010. ISSN 0960-

8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410009582>>.

KHANDAI, M.; CHAKRABORTY, D. S.; NIRANJANPATRO, C. “Preparation and evaluation of algino-sericin mucoadhesive microspheres: An approach for sustained drug delivery” in **Journal of Advanced Pharmaceutical Research**, 1, 2010, 48-60. 2010. 48-60.

KIM, S. et al. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 75B, n. 2, p. 442-450, 2005. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.b.30324>>.

KUMAR, B. P. et al. Microparticulate drug delivery system: a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research**, v. 1, n. 1, p. 19 - 37, 2011.

KUMAR, D. et al. Design and Development of Sustained Release Matrix Tablets of Furosemide. **PharmaTutor**, v. 1, n. 2, p. 99-105, 2013. ISSN 2347-7881.

LAMBONI, L. et al. Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1855-1867, 2015/12/01/ 2015. ISSN 0734-9750. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300495>>.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012. ISSN 0079-6700. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3223967/>>.

LÜLLMANN, H. et al. **Color Atlas of Pharmacology**. 2. New York: Thieme Stuttgart, 2000.

MATSUMOTO, A. et al. Silk. In: LEWIN, M. (Ed.). **Handbook of Fiber Chemistry**. 3. M. Lewin: Taylor & Francis Group, 2007. p.383-404.

MELO, N. F. S. D. et al. Factorial design and characterization studies for articaine hydrochloride loaded alginate/chitosan nanoparticles. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 146-152, 2013. ISSN 2164-9634.

MENEZES, M. F. S. C. D. et al. MICROENCAPSULATION OF PROBIOTICS BY USING EXTERNAL IONIC GELLING PECTIN. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 30-37, 2015. ISSN 2179-460X.

MILADI, K. et al. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 28-57, 02/03

11/05/received

01/25/accepted 2014. ISSN 1611-2156. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464506/>>.

MONDAL, M.; TRIVEDY, K.; KUMAR, S. N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn.,-a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 223-238, 2002. ISSN 1415-5273. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732002000200011&nrm=iso>.

OH, H. et al. Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 32-37, 2011/01/01/2011. ISSN 0141-8130. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813010002886>>.

PADAMWAR, M.; PAWAR, A. Silk sericin and its applications: A review. 2004. ISSN 0975-1084.

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. ISSN 0168-3659.

PATEL, N. et al. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. **Progress in Biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 117-133, July 01 2016. ISSN 2194-0517. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1007/s40204-016-0051-9>>.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 4, n. 4, p. 27-32, 2012.

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, p. 491-502, 2007. ISSN 1516-9332. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400002&nrm=iso>.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447-451, 2001/08/01/ 2001. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593100002271> >.

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, 2011. ISSN 1079-6630.

RANGI, A.; JAJPURA, L. The biopolymer sericin: extraction and applications. **J Text Sci Eng**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2015.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 362-369, 2015/06/01/ 2015. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779915000700> >.

RHODES, C. T. Bioequivalency. In: RHODES, C. T. e BANKER, G. S. (Ed.). **Modern Pharmaceutics**. 4. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.

RODRIGUES, P. O. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de formas farmacêuticas de liberação prolongada do antiretroviral zidovudina (AZT). 2005.

SAHU, B. P.; DAS, M. K. Nanoprecipitation with sonication for enhancement of oral bioavailability of furosemide. **Acta Poloniae Pharmaceutica N Drug Research**, v. 71, n. 1, p. 129-137, 2014.

SANTOS, P. D. S. **Tecnologia de argilas aplicada às argilas brasileiras**. São Paulo: Editora E. Blücher, 1975. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=Mv1iAAAAMAAJ> >.

SETTY, C. M.; SAHOO, S. S.; SA, B. Alginate-Coated Alginate-Polyethyleneimine Beads for Prolonged Release of Furosemide in Simulated Intestinal Fluid. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 4-5, p. 435-446, 2005/01/01 2005. ISSN 0363-9045. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/03639040500214647> >.

SHAIKH, H. K.; KSHIRSAGAR, R.; PATIL, S. Mathematical models for drug release characterization: a review. **World J Pharm Pharm Sci**, v. 4, n. 4, p. 324-38, 2015.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2, p. 139-157, 2001/06/11/ 2001. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01001120> >.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 12-24, 2013/08/30/ 2013. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313003451> >.

SILVA, T. L. D. **Desenvolvimento e avaliação de partículas à base de blendas entre sericina e alginato para aplicação ambiental**. 2016. Doutorado (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, T. L. D. et al. 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, 2016/11/20/ 2016. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652615006228> >.

SILVA, T. L. D. et al. 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.

SILVA, T. L. D. et al. Evaluation of Incorporation of Diclofenac Sodium in Dried Sericin-Alginate Particles Prepared by Ionic Gelation. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 43, 2015.

SINGH, K.; JAYASOMU, R. Bombyx mori—a review of its potential as a medicinal insect. **Pharmaceutical biology**, v. 40, n. 1, p. 28-32, 2002. ISSN 1388-0209.

SOARES, J. P. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Eclética Química**, v. 29, p. 57-64, 2004. ISSN 0100-4670. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702004000200009&nrm=iso >.

SUN, H.; ZHAO, H. Physiologic Drug Distribution and Protein Binding. In: SHARGEL, L. e YU, A. B. C. (Ed.). **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 7: McGraw-Hill, 2012a.

TAKEDA, S. Bombyx mori. In: RESH, V. H. e CARDÉ, R. T. (Ed.). **Encyclopedia of insects**. 2: Elsevier, 2009. p.117 – 119.

TAO, W.; LI, M.; XIE, R. Preparation and Structure of Porous Silk Sericin Materials. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 290, n. 3, p. 188-194, 2005. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mame.200400306> >.

TATEMASTU, K.; SEZUTSU, H.; TAMURA, T. Utilization of transgenic silkworms for recombinant protein production. **J Biotechnol Biomaterial S**, v. 9, p. 1-8, 2012.

TIWARI, G. et al. 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. (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621-630, 2002/01/01 2002. ISSN 0363-9045. Disponível em: < <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853> >.

UDE, A. U. et al. Bombyx mori silk fibre and its composite: A review of contemporary developments. **Materials & Design**, v. 57, p. 298-305, 2014/05/01/ 2014. ISSN 0261-3069. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261306913011916> >.

UM, I. C. et al. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International journal of biological macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 2001. ISSN 0141-8130.

UMMADI, S. et al. Overview on controlled release dosage form. **System**, v. 7, n. 8, 2013.

VALLADAO, D. M. S. et al. Thermal decomposition of some diuretic agents. **Journal of thermal analysis**, v. 46, n. 5, p. 1291-1299, May 01 1996. ISSN 1572-8943. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/BF01979243> >.

VERMA, R. K.; KRISHNA, D. M.; GARG, S. Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1, p. 7-27, 2002/02/19/ 2002. ISSN 0168-3659. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901005508> >.

VIDART, J. M. M. et al. Development of sericin/alginate particles by ionic gelation technique for the controlled release of diclofenac sodium. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 12, 2018. ISSN 1097-4628.

VIDART, J. M. M. et al. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE DICLOFENACO DE SÓDIO EM PARTÍCULAS DE SERICINA E ALGINATO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1928-1935, 2015. ISSN 2359-1757.

WEI, Y. et al. Preparation and characterization of PEGDE crosslinked silk fibroin film. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 29, n. 5, p. 1083-1089, 2014. ISSN 1000-2413.

YAMAKOSHI, J. et al. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 142, n. 1, p. 139-149, 1999/01/03/ 1999. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915098002305> >.

ZERBINI, A. P. N. D. A.; FERRAZ, H. G. Sistemas multiparticulados: minicomprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 149-158, 2011. ISSN 2179-443X.

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. ISSN 0470640480.

ZHANG, X. et al. Fabrication of silk sericin nanofibers from a silk sericin-hope cocoon with electrospinning method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 337-347, 2012/03/01/ 2012. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813011004673> >.

ZHANG, Y.-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 91-100, 2002/05/01/ 2002. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000034> >.