

DÉBORA SGORLA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ÁCIDO HIALURÔNICO RETICULADO PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSOS DE REVESTIMENTO

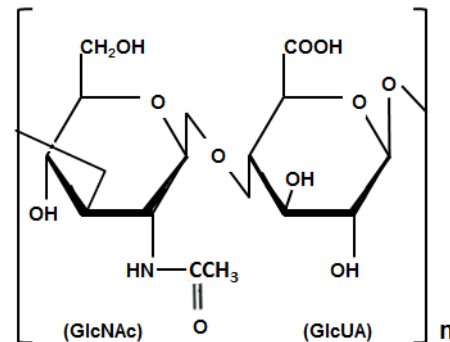
Orientador: Dr. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti

Co-orientadores: Drs. Bruno Sarmento e Élcio José Bunhak



Introdução

- Desafio: entrega de fármacos à regiões específicas do organismo.
- Associação de polímeros natural e sintético
- Polímero sintético – Etilcelulose (Surelease[®] e Aquacoat[®]):
 - material atóxico, incolor, sem cheiro ou sabor
 - pseudolátex - dispersão aquosa a partir do polímero insolúvel, plastificada
 - revestimentos para liberação modificada de fármacos
 - capacidade de formar filmes resistentes e flexíveis
- Polímero natural – Ácido Hialurônico:
 - polissacarídeo linear aniônico
 - biocompatível, atóxico e biodegradável
 - facilidade de modificação estrutural
 - afinidade por receptores (CD44)



Introdução

- Ácido Hialurônico
 - viscosuplementação do fluido sinovial
 - como meio hidratante
 - tratamento e diagnóstico de doenças
 - cirurgias oftalmológicas
 - liberação controlada de fármacos
 - cosméticos
- Elevada hidrofiliabilidade – expansão de até 1000X o seu volume sólido
- Membranas frágeis e quebradiças
- Liberação prematura do fármaco
- Modificação estrutural
- Agentes reticulantes – trimetafosfato trissódico
 - Sal de baixa toxicidade
 - Reage com grupos hidroxila do polissacarídeo

Objetivos

Geral

Pesquisa de novos materiais poliméricos candidatos à aplicação em sistemas para liberação modificada de fármacos, cujo emprego potencial está voltado ao revestimento de formas farmacêuticas sólidas orais

Específicos

Promover a reticulação do AH;
Propor a produção de novos materiais a partir de EC + AH;
Avaliar as características macroscópicas e espessura dos filmes;
Realizar testes de li% e TVA;
Determinar as propriedades físico-químicas do novo material.

Reticulação do AH

- Dispersão a 1% de AH em água (pH 12) → agitação por 2 h
- 20 mL de solução 30% TMFT em 200 mL da dispersão → agitação por 2 h
- Porções correspondentes às concentrações 5 e 10% do polissacarídeo modificado foram adicionadas aos meios contendo EC

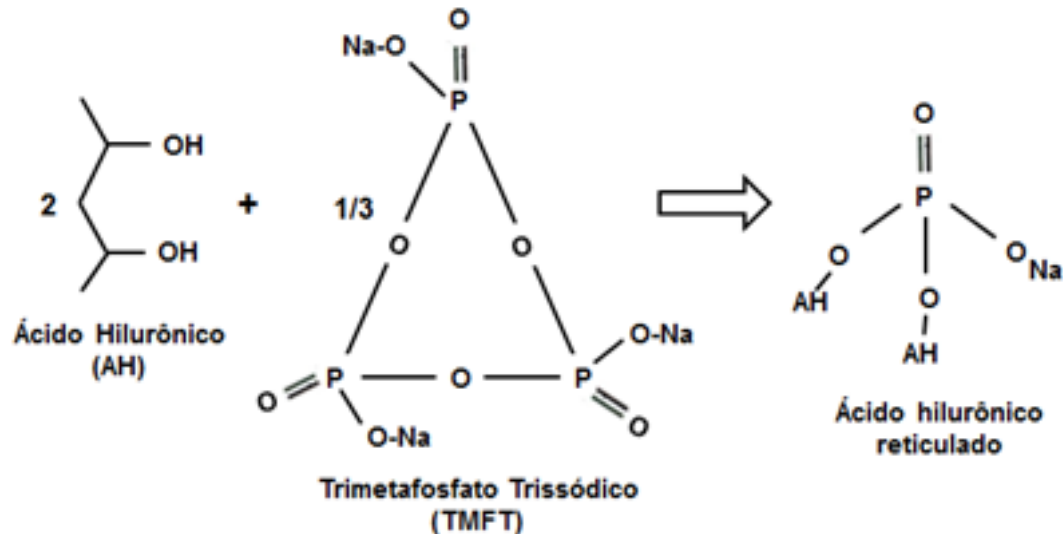
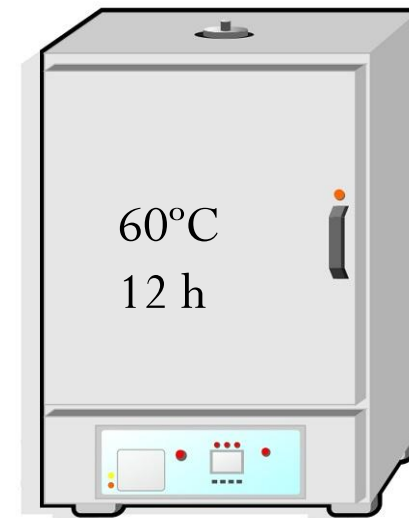
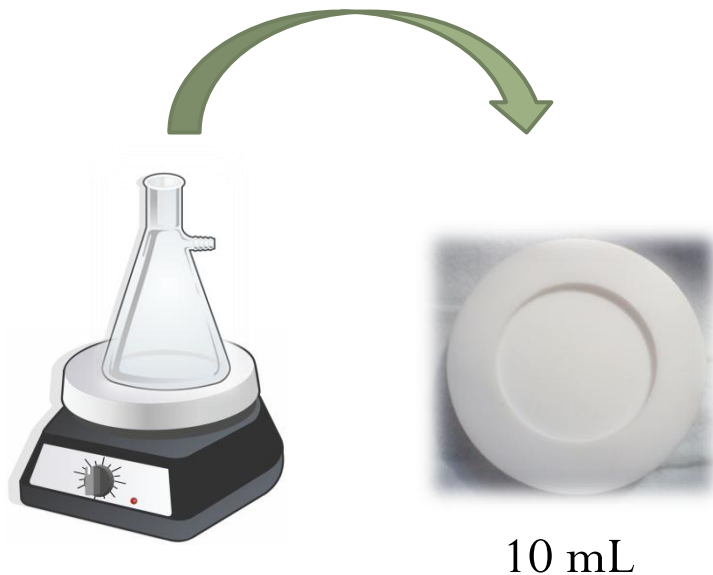


FIGURA 1 Reação entre ácido hialurônico e trimetafosfato trissódico.

Obtenção dos filmes

- Método “*Casting process*”
- Sete proporções
- Massa polimérica final 4% (m.v⁻¹)



Características macroscópicas e espessura

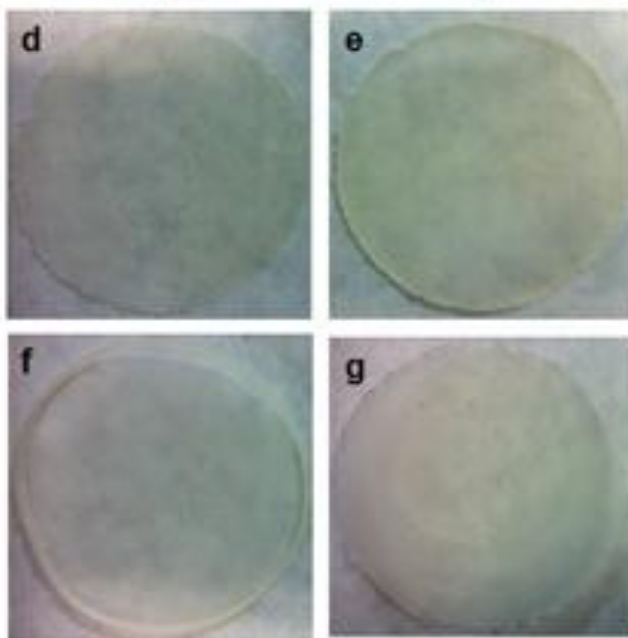
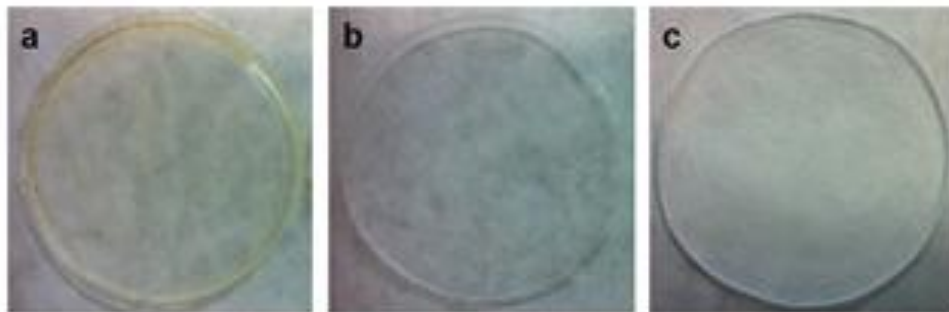
- Confiabilidade dos resultados dependem da integridade dos filmes
- As diferentes composições investigadas permitiram a formação de filmes
- ↑ [] ácido hialurônico = variações características macroscópicas

TABELA II Avaliação morfológica macroscópica das membranas poliméricas.

Associação polimérica	Homogeneidade	Rachaduras	Bolhas de ar	Transparência	Flexibilidade
EC 100:00 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AHR	0	0	0	+	++
EC 95:05 AH	0	0	0	++	++
EC 90:10 AH	0	0	0	+	+
EC 95:05 AHR	0	0	0	+	++
EC 90:10 AHR	0	0	0	+	+

0: ausência de alterações visíveis, +: fracamente presente, ++: moderadamente presente, +++: fortemente presente.

Características macroscópicas e espessura



Imagens das diferentes associações poliméricas:

- a) Filme controle EC 100:00 AH
- b) Filme controle EC 00:100 AH
- c) Filme controle EC 00:100 AHR
- d) EC 95:05 AH
- e) EC 95:05 AHR
- f) EC 90:10 AH
- g) EC 90:10 AHR.

Características macroscópicas e espessura

- Confiabilidade dos resultados dependem da integridade dos filmes
- As diferentes composições investigadas permitiram a formação de filmes
- ↑ [] ácido hialurônico = variações características macroscópicas

TABELA II Avaliação morfológica macroscópica das membranas poliméricas.

Associação polimérica	Homogeneidade	Rachaduras	Bolhas de ar	Transparência	Flexibilidade
EC 100:00 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AH	0	0	0	+++	+++
EC 00:100 AHR	0	0	0	+	++
EC 95:05 AH	0	0	0	++	++
EC 90:10 AH	0	0	0	+	+
EC 95:05 AHR	0	0	0	+	++
EC 90:10 AHR	0	0	0	+	+

0: ausência de alterações visíveis, +: fracamente presente, ++: moderadamente presente, +++: fortemente presente.

Características macroscópicas e espessura

5 pontos
Triplicata



- Dependente do $\uparrow$ da [] e tipo do polissacarídeo
- $p < 0,05$
- Bunhak *et. al.* (2007)/ Souto-Maior *et. al.* (2010)

TABELA III Valores das médias das espessuras dos filmes isolados.

Associação polimérica	Espessura (mm)
EC 100:00 AH	0,0607 ($\pm 0,0011$)
EC 95:05 AH	0,0822 ($\pm 0,0059$)
EC 90:10 AH	0,0912 ($\pm 0,0090$)
EC 95:05 AHR	0,1076 ($\pm 0,0205$)
EC 90:10 AHR	0,1260 ($\pm 0,0109$)

Estudo da TVA

- Pesagens nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas



$$TVA = \frac{g.24}{t.a}$$

- Análise estatística ($p < 0,05$):
 - ANOVA – diferentes associações em relação ao controle
 - Teste de múltipla comparação de Tukey: EC 90:10 AH x EC 100:00 AH, EC 95:05 AH e AHR e EC 90:10 AHR, EC 95:05 AH x EC 95:05 AHR e EC 95:05 AHR x EC 90:10 AHR

Estudo da TVA

TABELA IV Valores de perda de massa e taxa de TVA das diferentes associações poliméricas.

Associação polimérica	Valores perdas de peso (g/120h)	TVA (g/m ² 24h)	g/h
EC 100:00 AH	1,6767 (±0,0488)	335,34	0,0139
EC 95:05 AH	2,1517 (±0,1557)	430,34	0,0179
EC 90:10 AH	2,9004 (±0,0766)	580,08	0,0241
EC 95:05 AHR	1,6016 (±0,2614)	320,32	0,0133
EC 90:10 AHR	2,1372 (±0,2118)	427,44	0,0178

- Bunhak *et. al.* (2007): sulfato de condroitina/etilcelulose
- Wei *et. al.* (2009): pectina adicionada ao Kollicoat SR30D
- Oliveira *et. al* (2011): β -ciclodextrina + polímero acrílico (Eudragit[®] FS30D)

↑ na TVA proporcional e dependente
do aumento da concentração do polissacarídeo.

Estudo da TVA

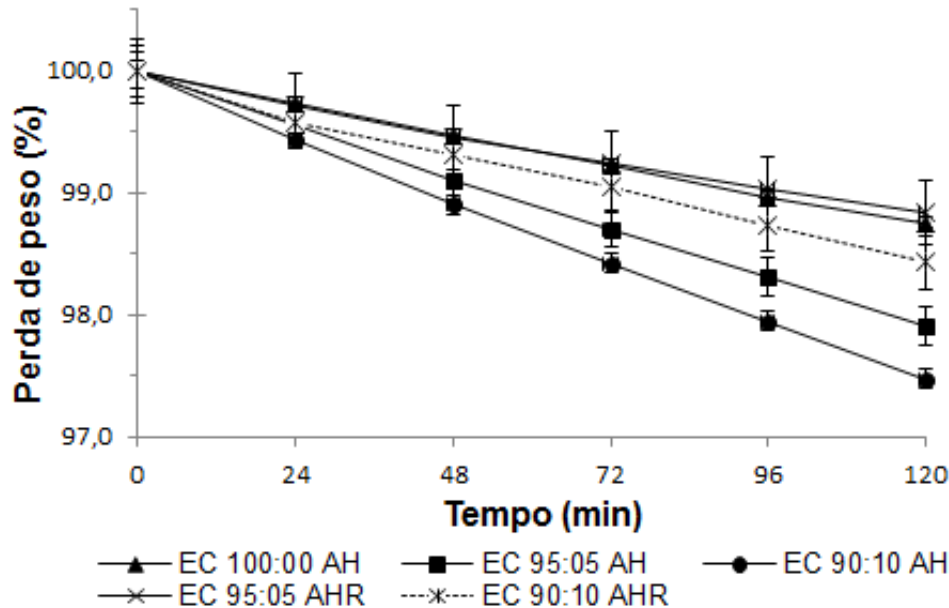
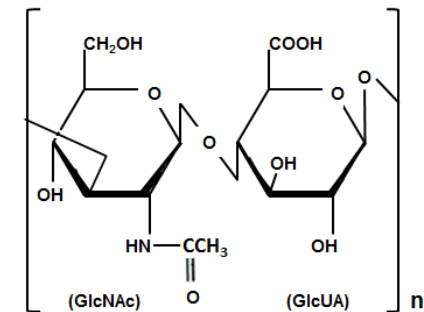


FIGURA 4 Perda de massa de filmes isolados em estudo de transmissão de vapor d'água.

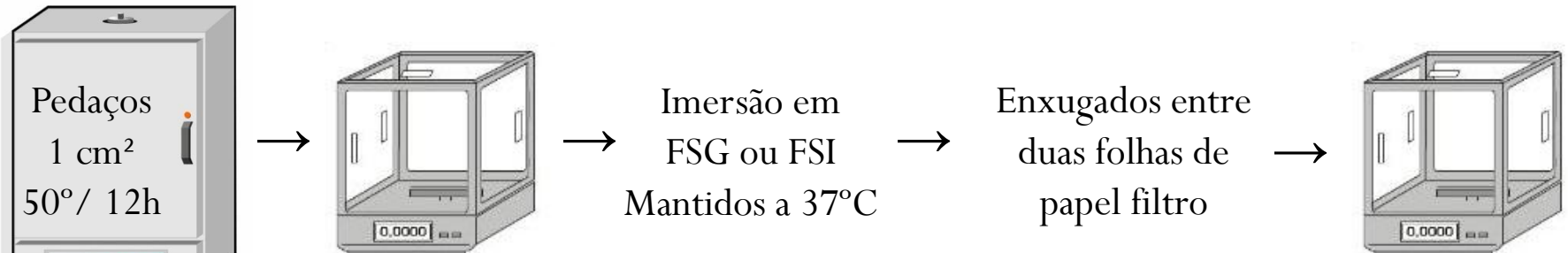
- Aumento na hidrofiliicidade do sistema
- Grupos hidroxila (-OH) que interagem com as moléculas de água



Ácido hialurônico

- Souto-Maior *et. al* (2010): pectina associada ao Eudragit[®] FS30D
- (-OH) + TMFT = ↓ hidrofília dos filmes
- Controle da difusão de fluidos e fármacos

Determinação do li%



$$I.i\% = \frac{(M_i - M_s) \times 100}{M_s}$$

- Análise estatística ($p < 0,05$):
 - ANOVA – diferentes associações em relação ao controle
 - Teste de múltipla comparação de Tukey:
 - FSG - EC 100:00 AH X EC 95:05 AHR, EC 90:10 AH e AHR e EC 95:05 AH X ambas associações reticuladas
 - FSI - EC 100:00 AH X EC 90:10 AH e AHR, EC 95:05 AH X EC 90:10 AH e AHR e EC 95:05 AHR X EC 90:10 AH e AHR

Determinação do li%

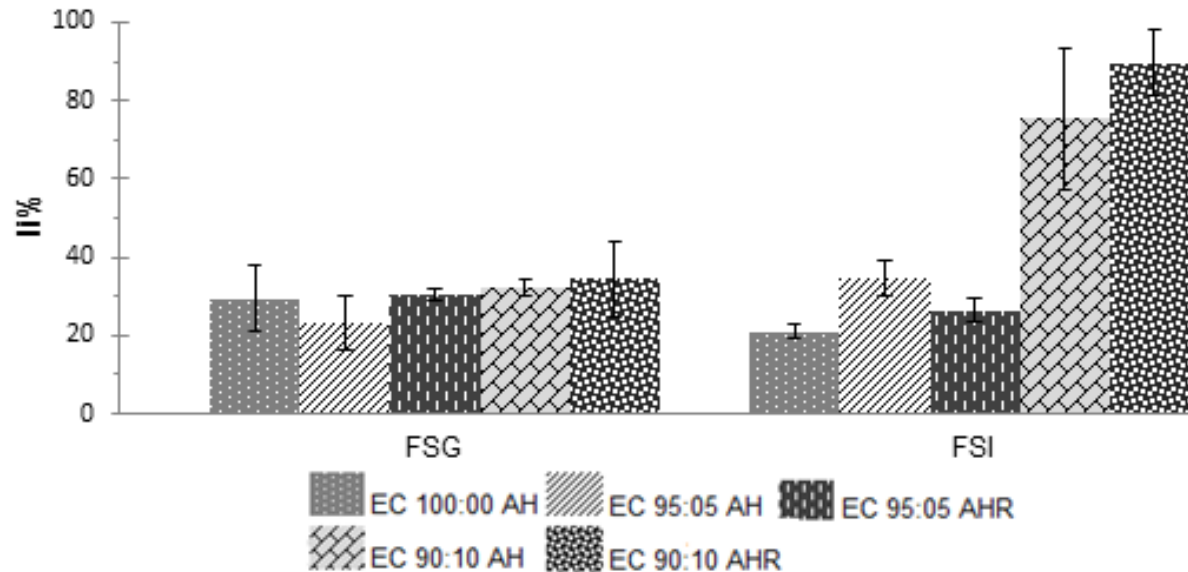


FIGURA 5 Índice de intumescimento dos filmes isolados após imersão de 150 minutos em FSG (pH 1,2) e FSI (pH 6,8).

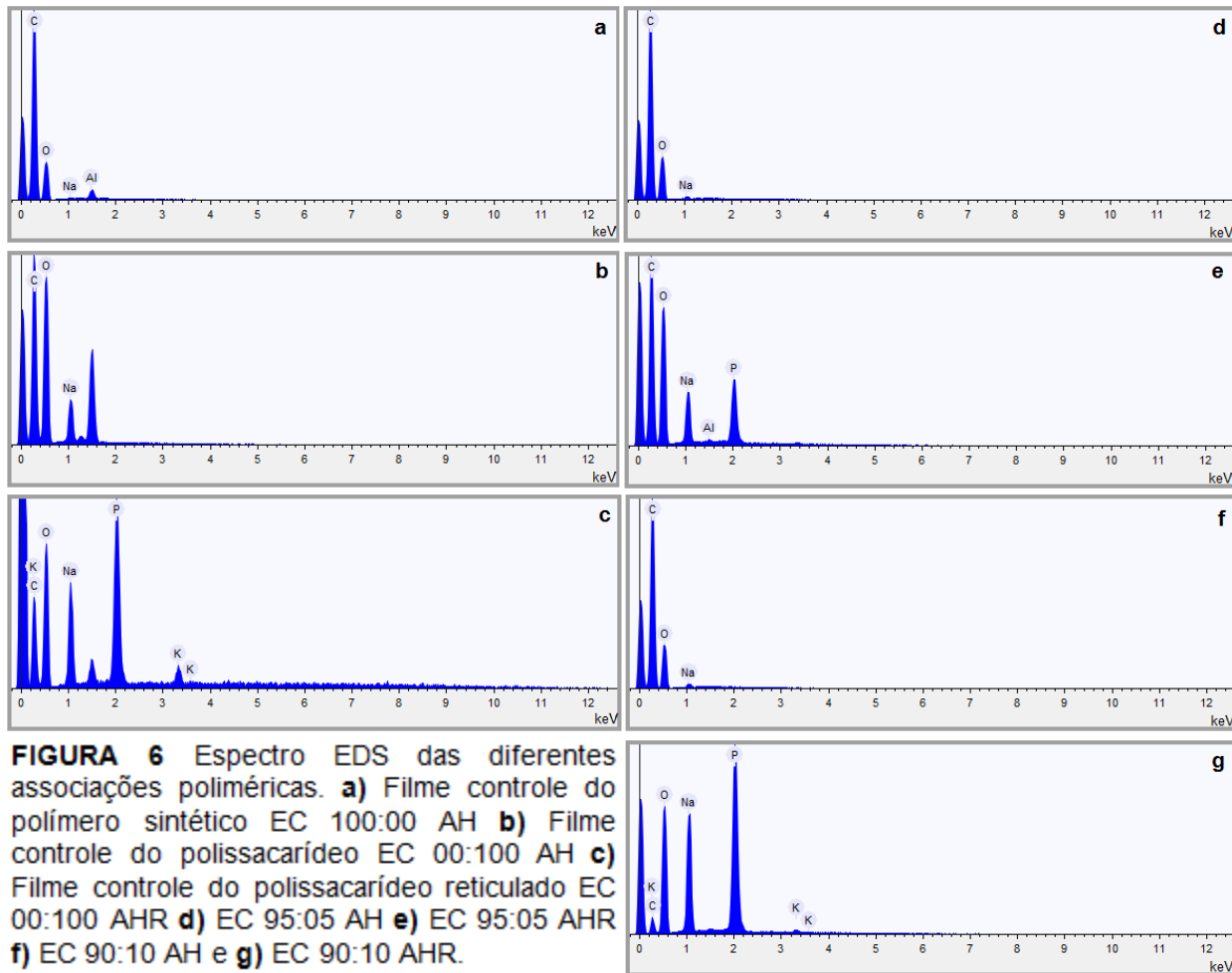
- FSG as membranas associados ao ácido hialurônico apresentaram uma ↓ hidratação
- FSI (pH mais elevado) ocorre ionização dos grupos carboxilatos
- Souto-Maior *et. al.*: pectina fosfatada/ α -Glucooligossacarídeo + Eudragit[®] FS30D
- Rabito *et. al.* → relação entre o li%, composição dos filmes e pH do meio

Determinação do li%

- Intumescimentos pH-dependente
 - porções superiores do TGI ($\downarrow$ pH)
 - porção distal do TGI ($\uparrow$ pH) - Maior *et. al.* (2008)
- FSI $\rightarrow$ películas da proporção EC 90:10 AH apresentaram desintegração parcial
- Expansão polimérica e elevada hidrossolubilidade do AH
- Avaliação de filmes contendo etilcelulose e sulfato de condritina - Bunhak *et. al.* (2007)
- Proporção EC 90:10 AHR $\rightarrow$ menor grau de desintegração
- Atuação do TMTS

Técnicas de caracterização

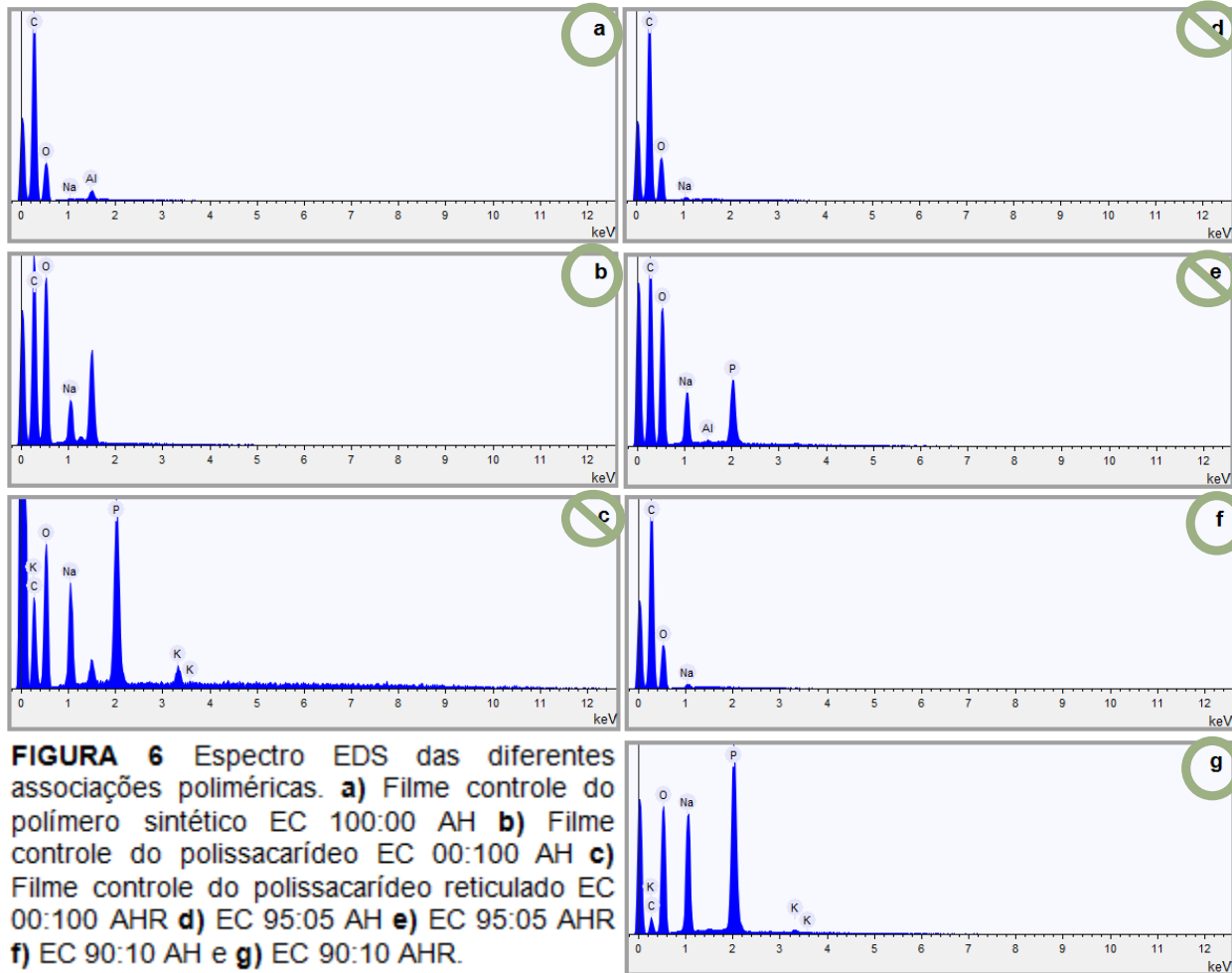
- Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS):



Técnicas de caracterização

- Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS):

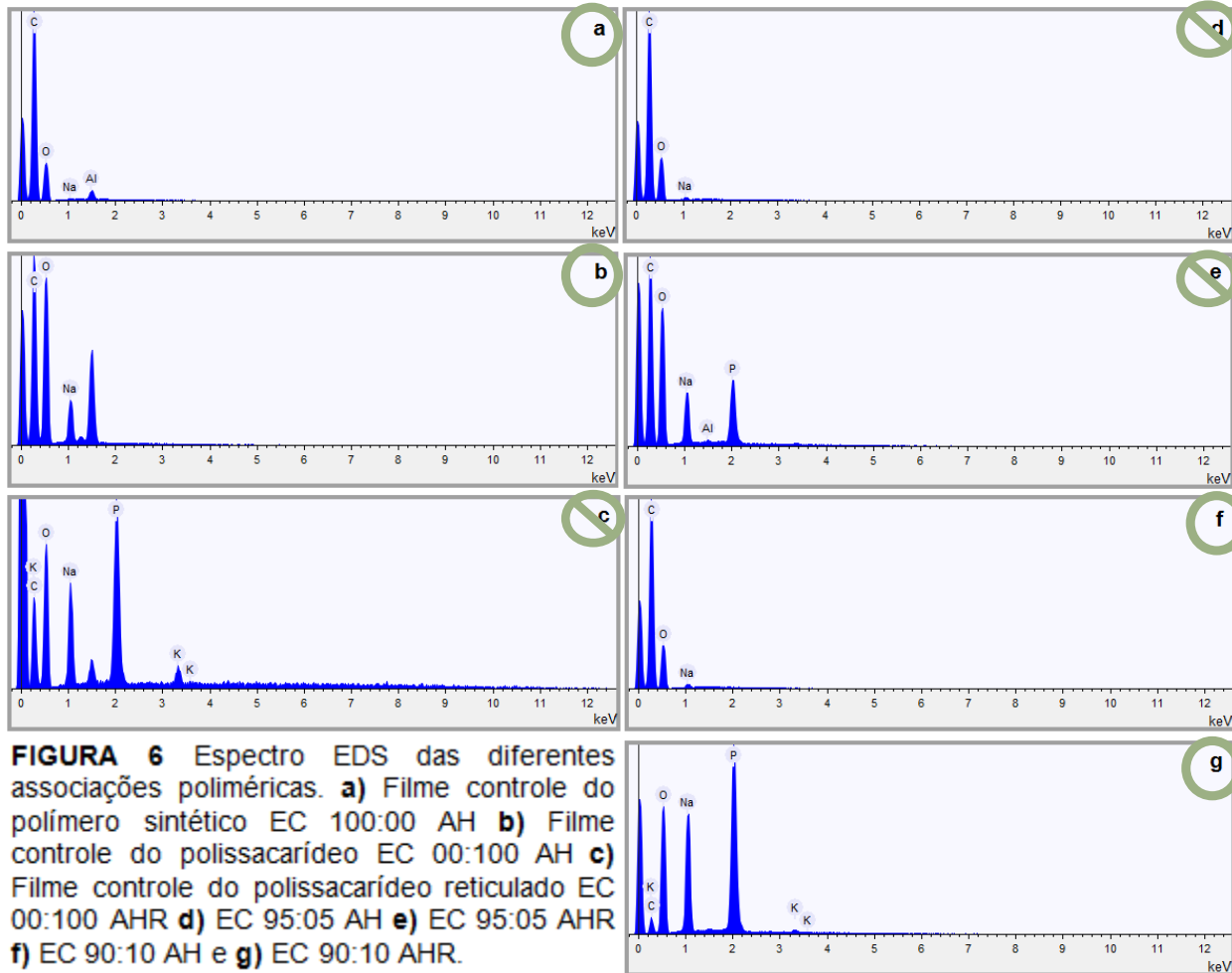
✓ Carbono



Técnicas de caracterização

- Espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS):

- ✓ Carbono
- ✓ Fósforo
- ✓ Sódio



Técnicas de caracterização

- Difratometria de raios-X (DRX):

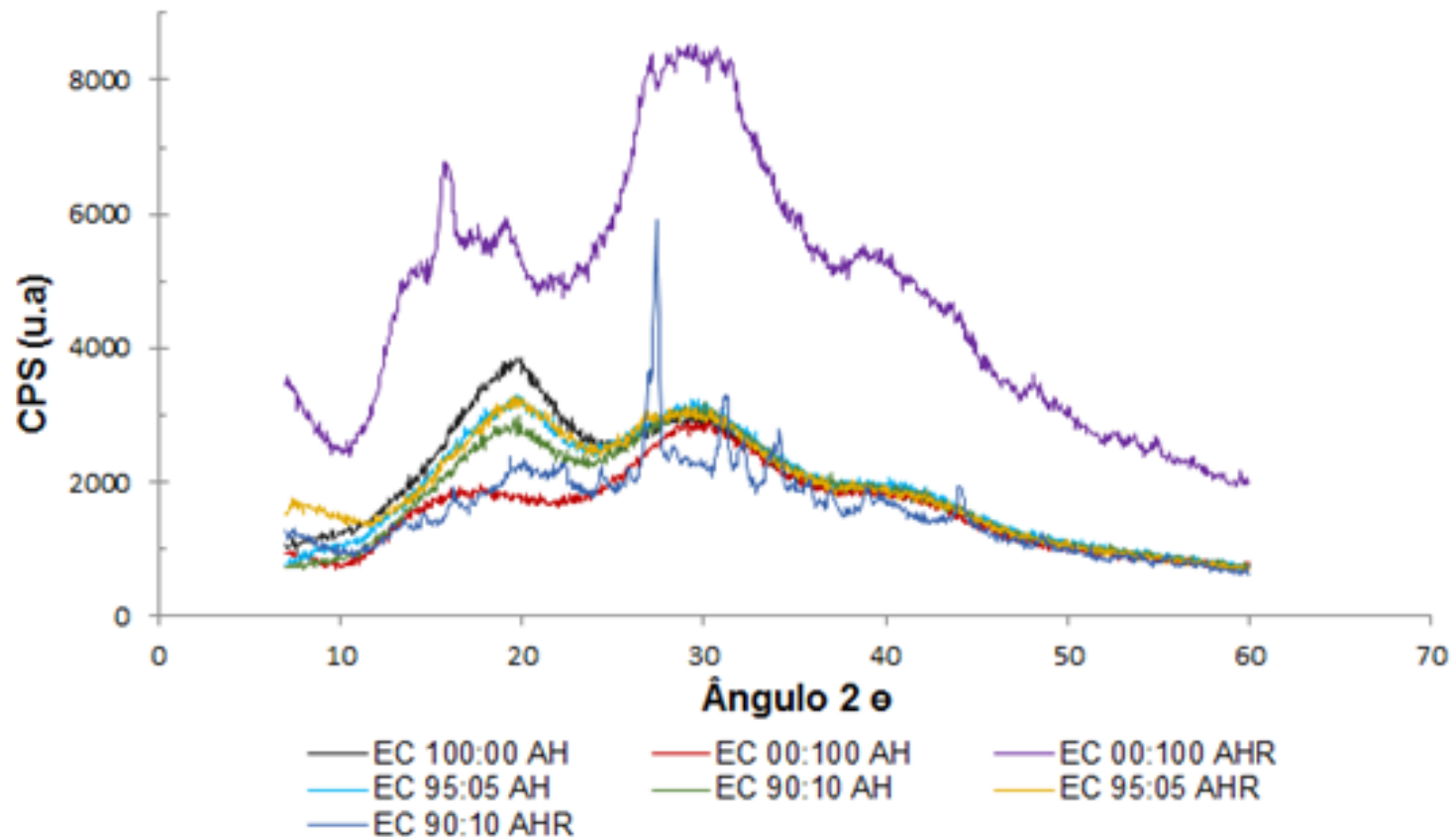


FIGURA 7 Difratoograma DRX das diferentes associações poliméricas.

Análises térmicas

- Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

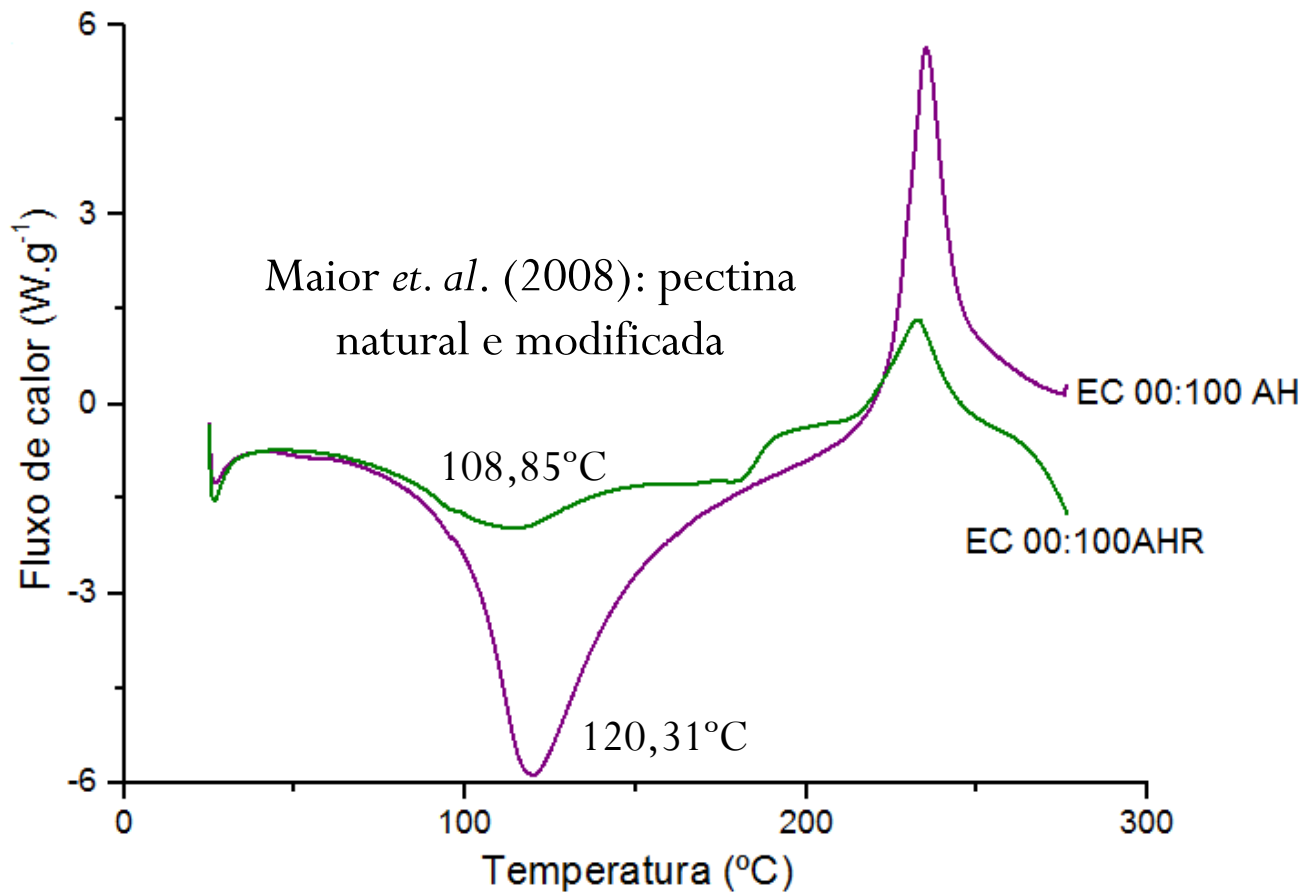


FIGURA 8a Curvas de DSC das diferentes associações poliméricas.

Análises térmicas

- Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

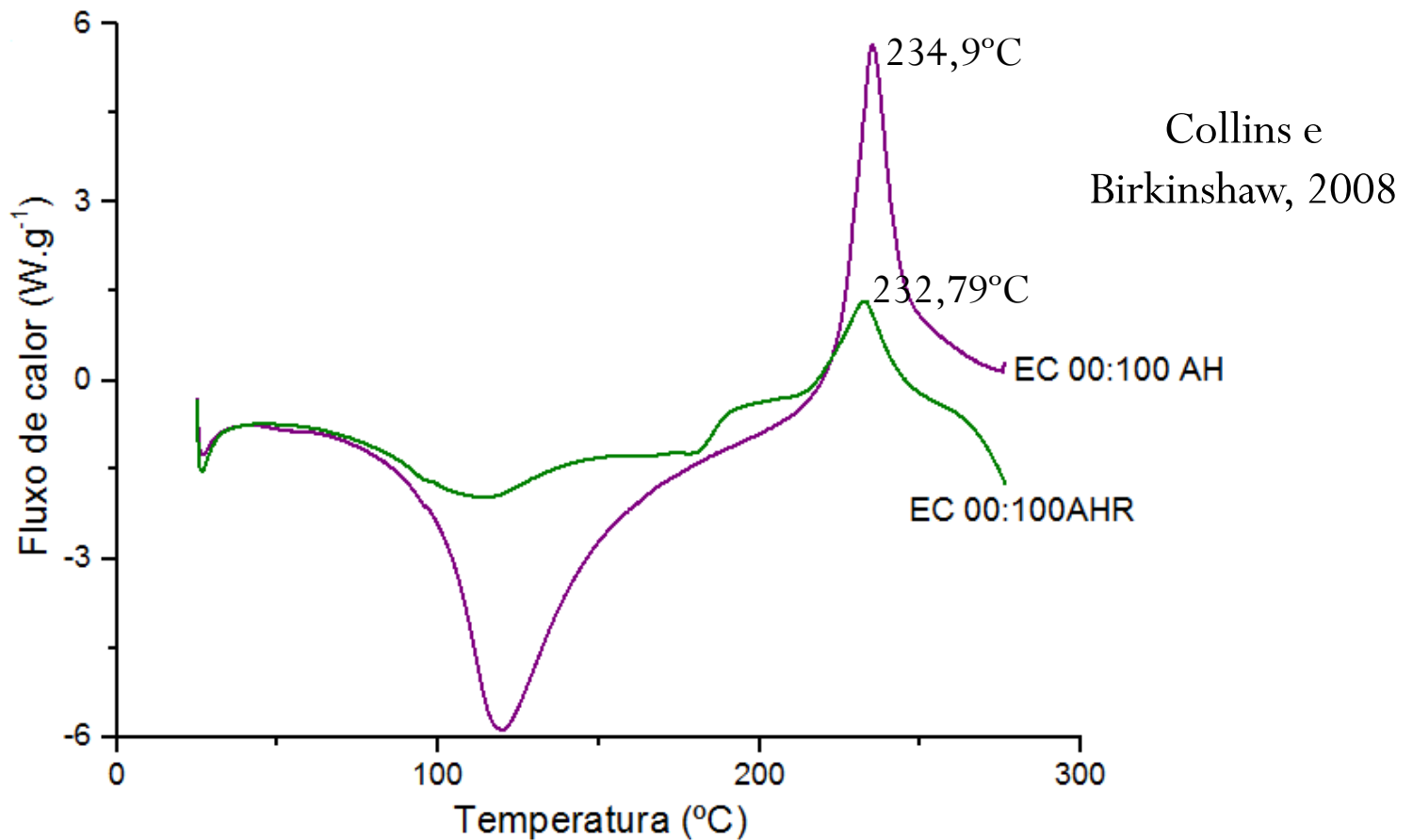


FIGURA 8a Curvas de DSC das diferentes associações poliméricas.

Análises térmicas

- Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

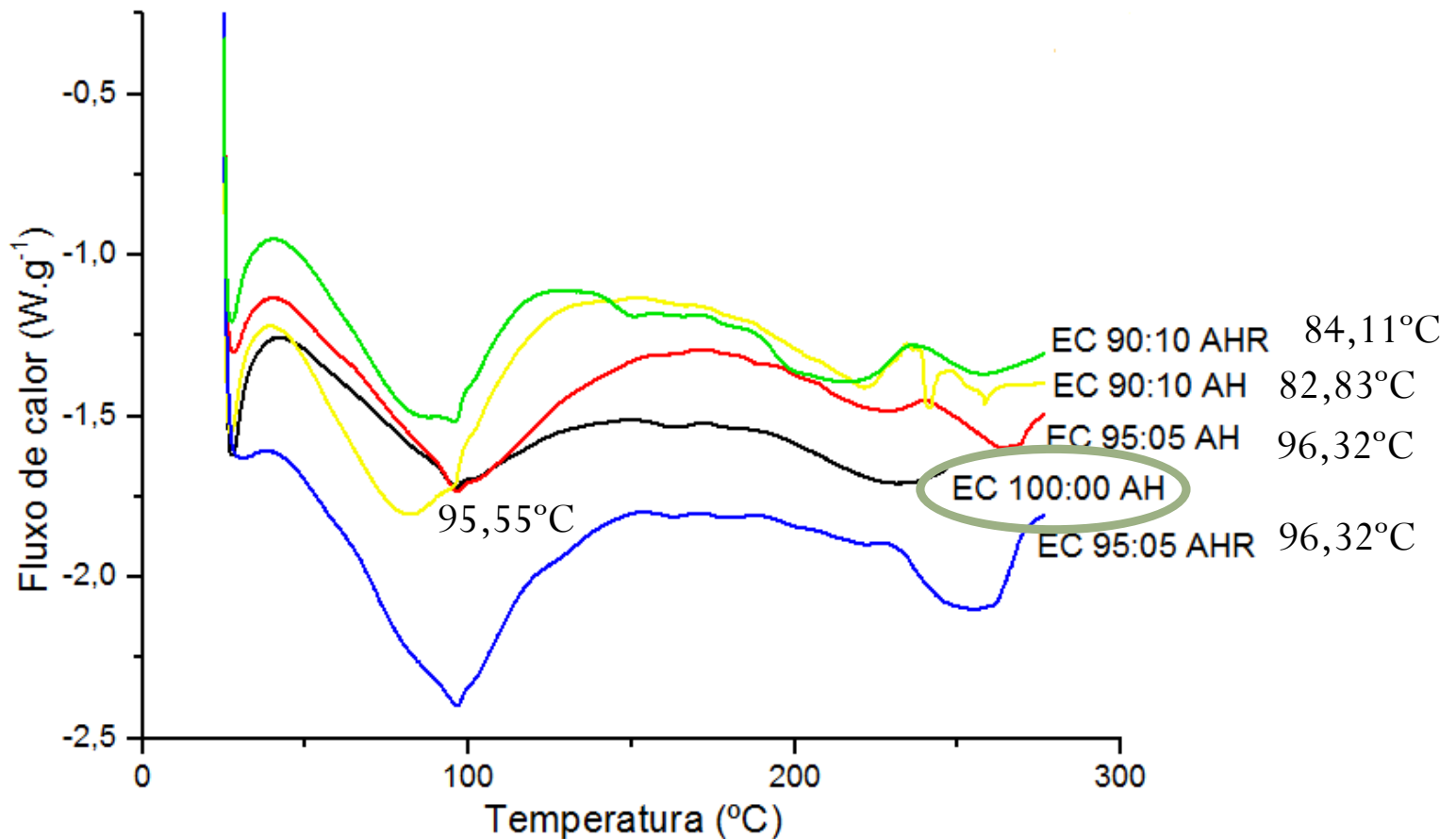


FIGURA 8b Curvas de DSC das diferentes associações poliméricas.

Análises térmicas

- Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

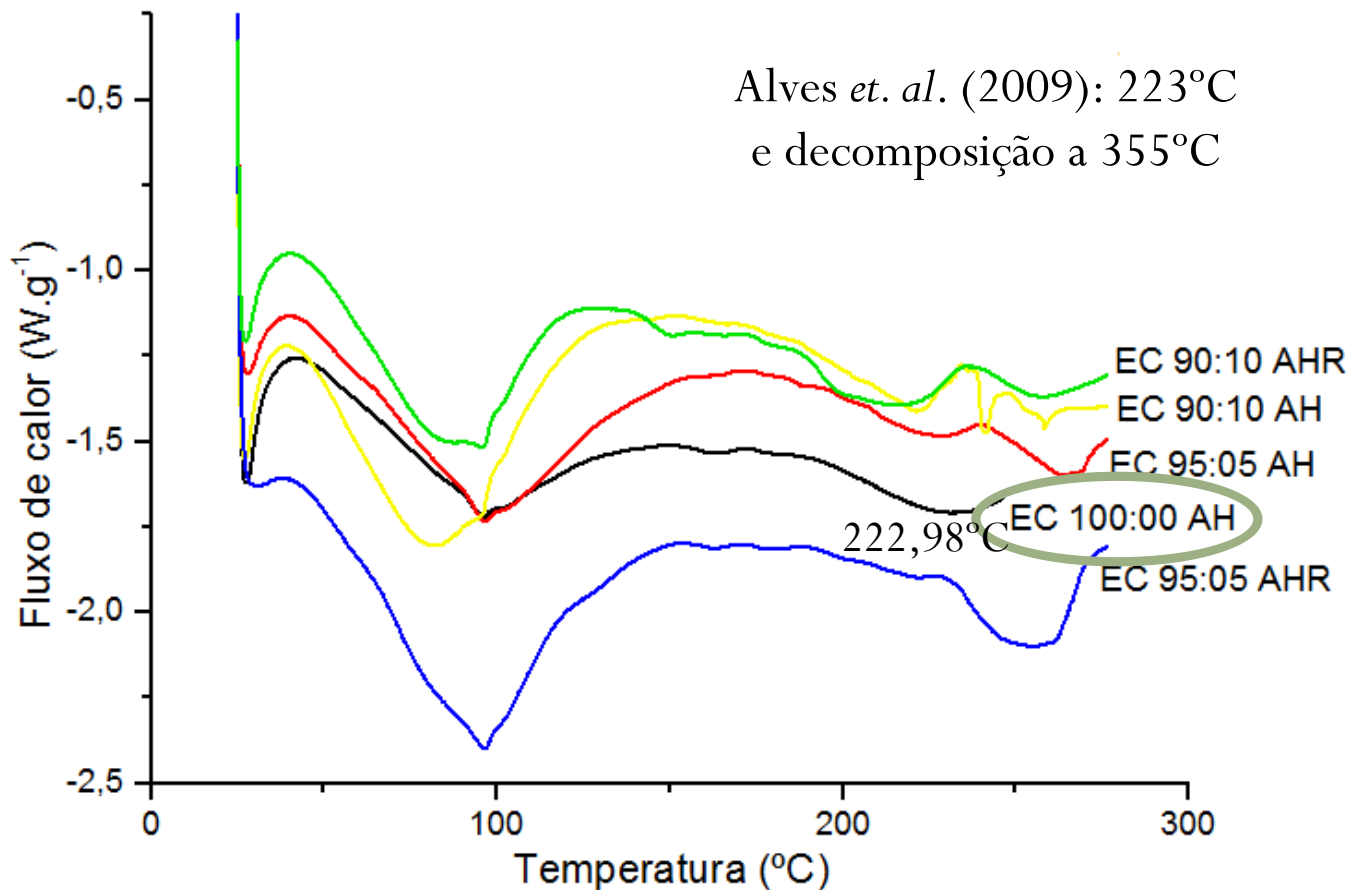
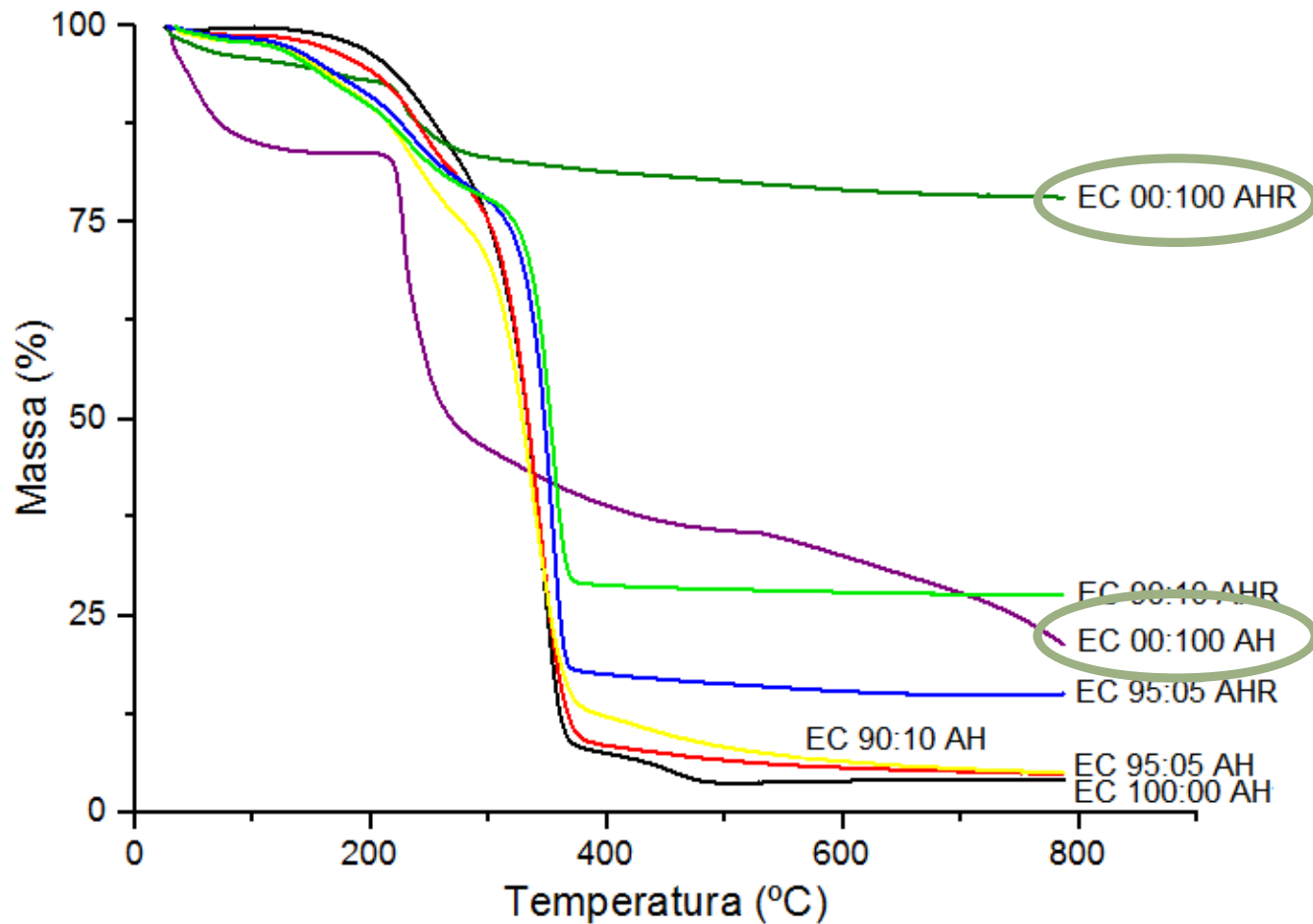


FIGURA 8b Curvas de DSC das diferentes associações poliméricas.

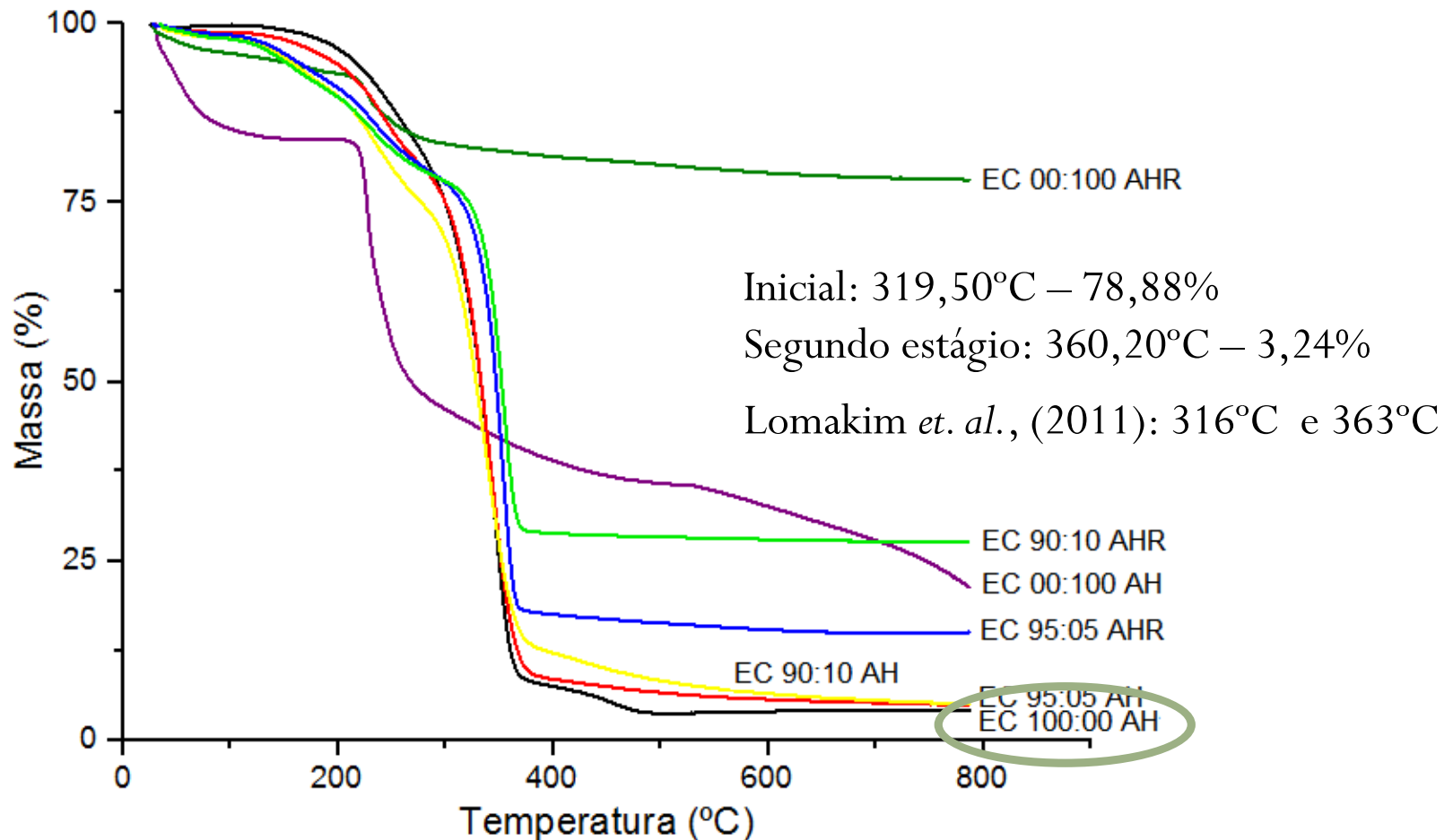
Análises térmicas

- Análise termogravimétrica (TGA):



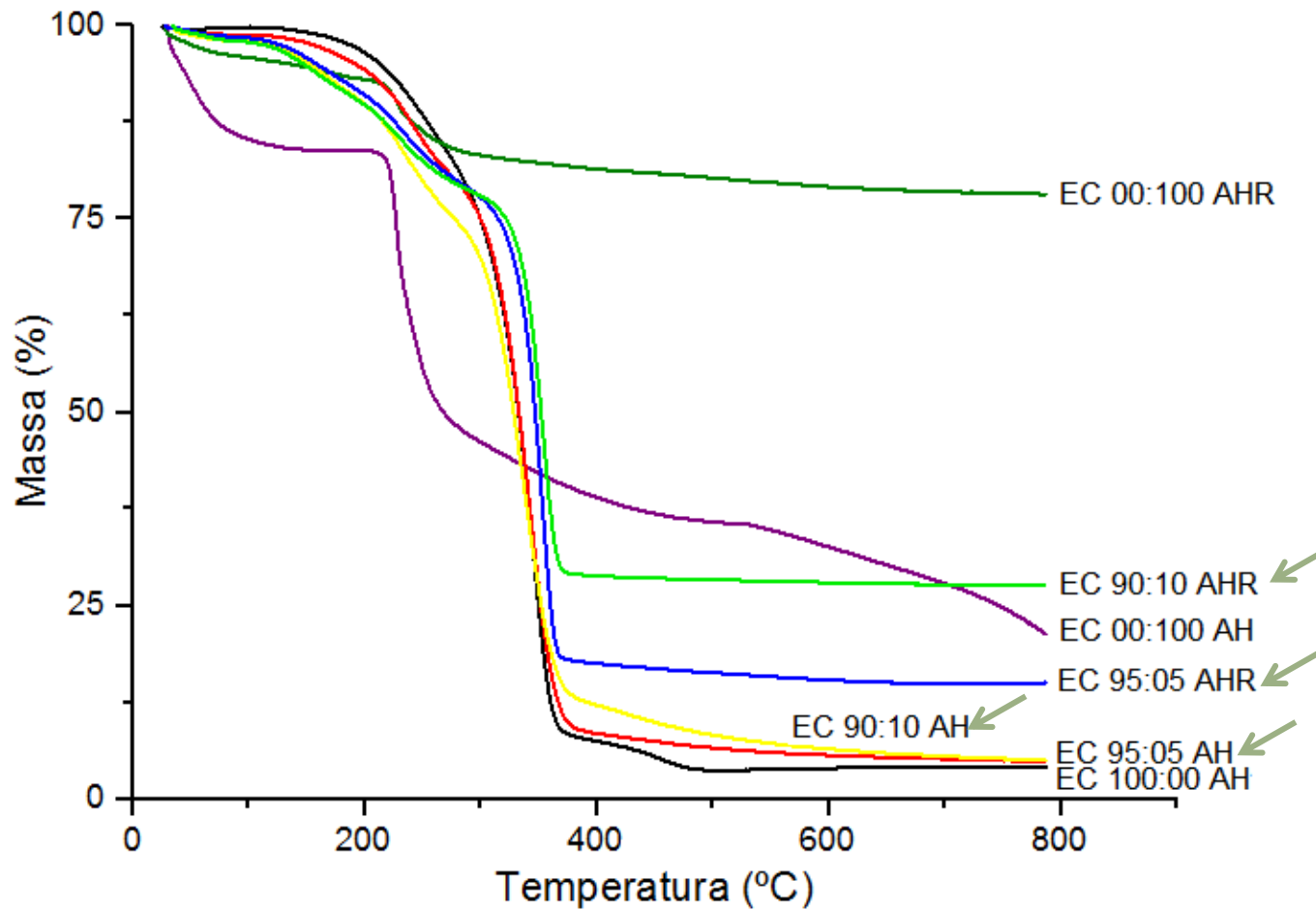
Análises térmicas

- Análise termogravimétrica (TGA):



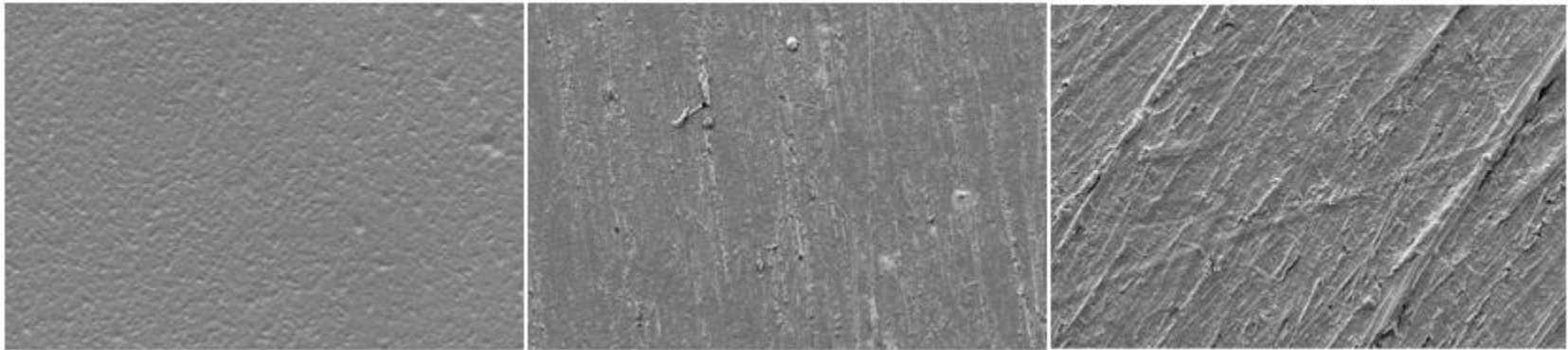
Análises térmicas

- Análise termogravimétrica (TGA):



Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

- EC 100:00 AH



Seco

FSG

FSI

- Praticamente sem alterações
- Aspecto mais liso e homogêneo
- Polissacarídeo → mudança nas características morfológicas

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

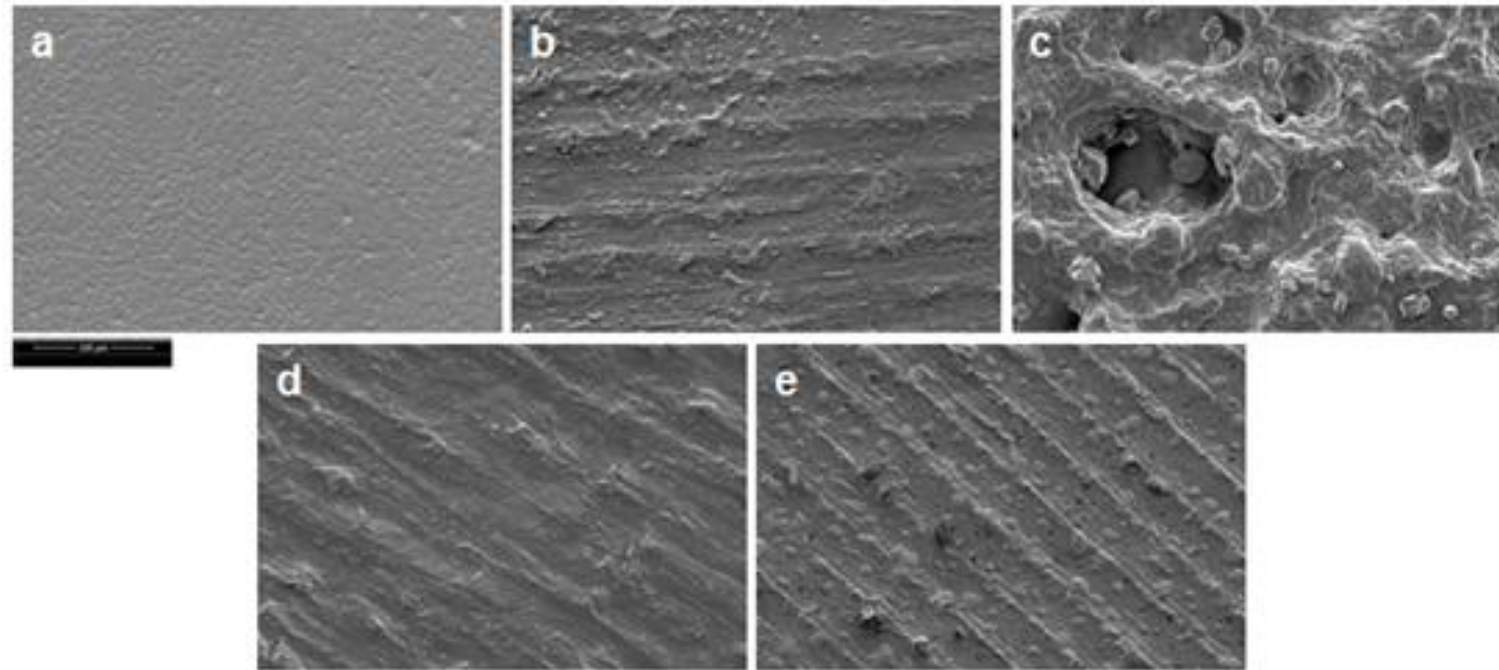


FIGURA 10 Micrografias das diferentes associações poliméricas secas. **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 95:05 AHR **d)** EC 90:10 AH e **e)** EC 90:10 AHR. Barra corresponde a 100 μm .

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

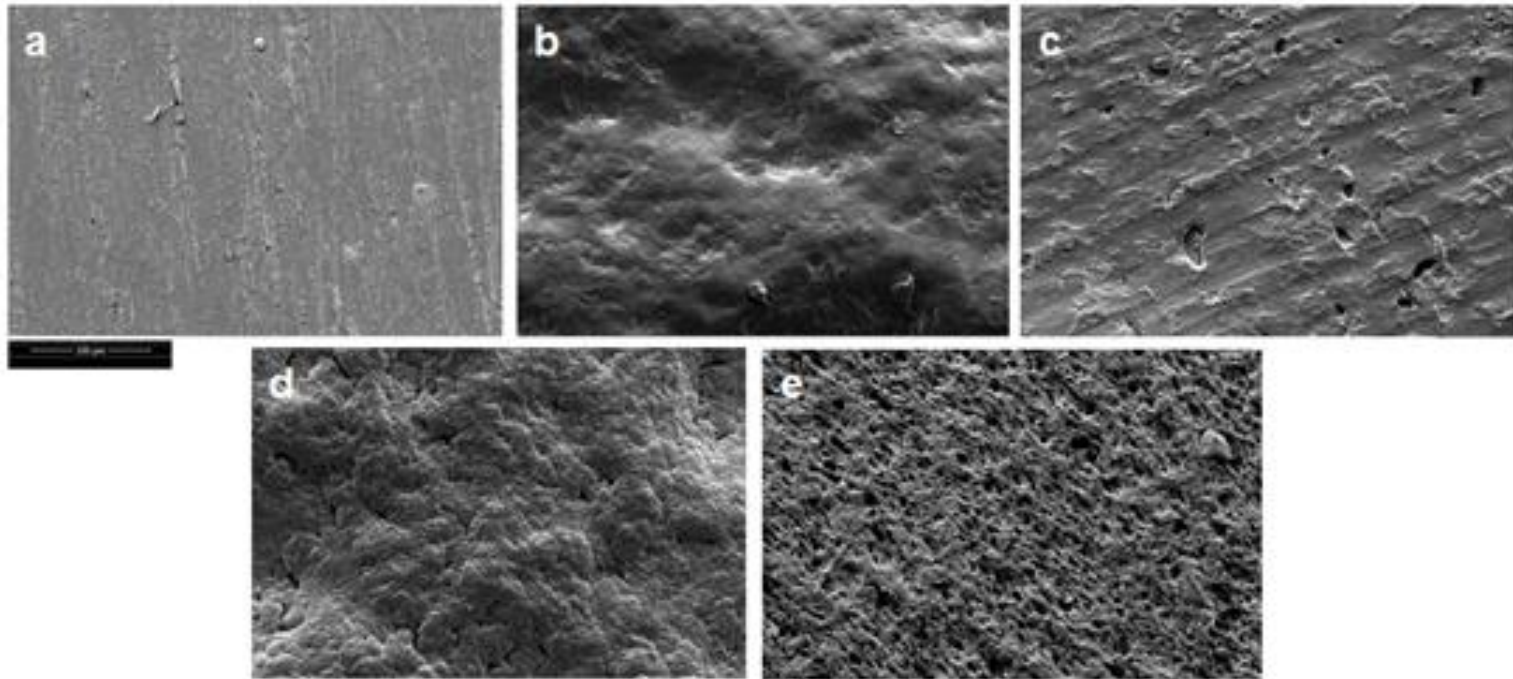


FIGURA 11 Micrografias das diferentes associações poliméricas após imersão em FSG (pH 1,2). **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 95:05 AHR **d)** EC 90:10 AH e **e)** EC 90:10 AHR. Barra corresponde a 100 μm .

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

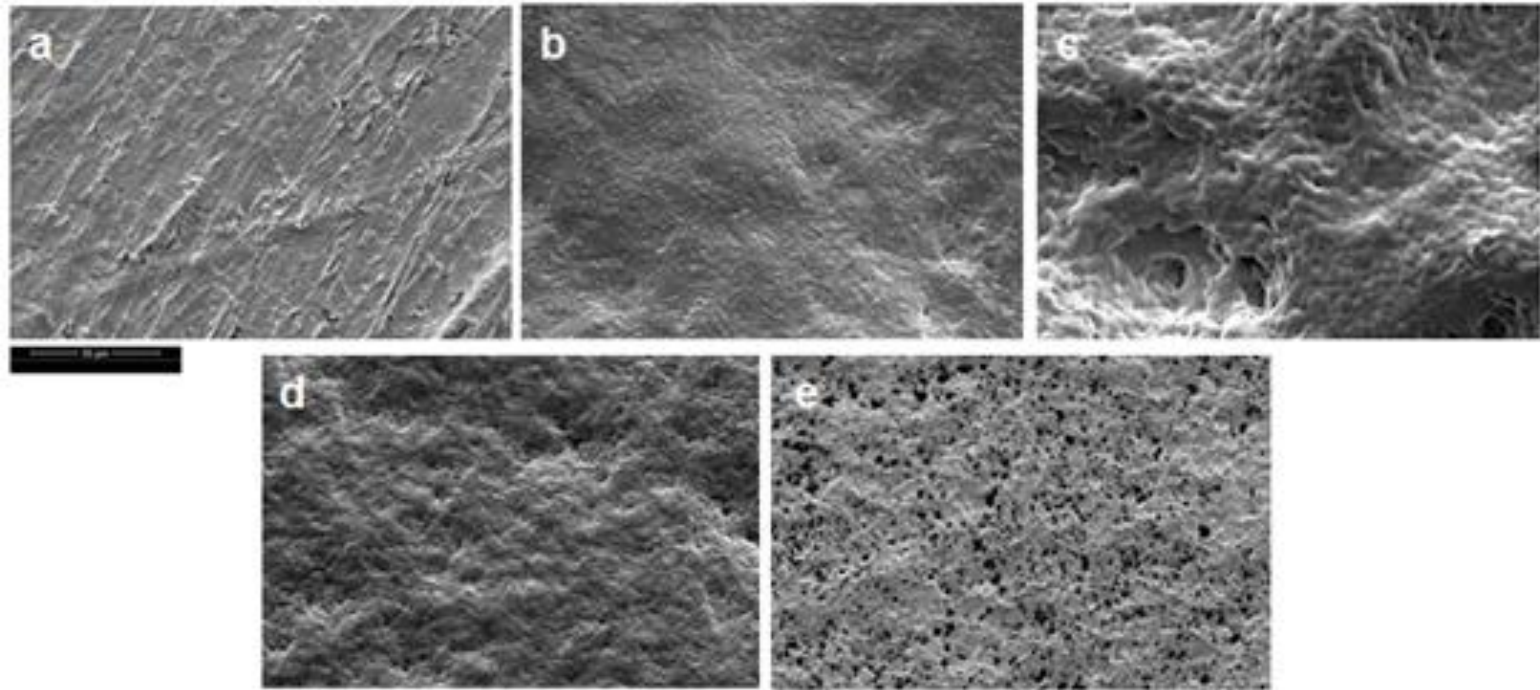


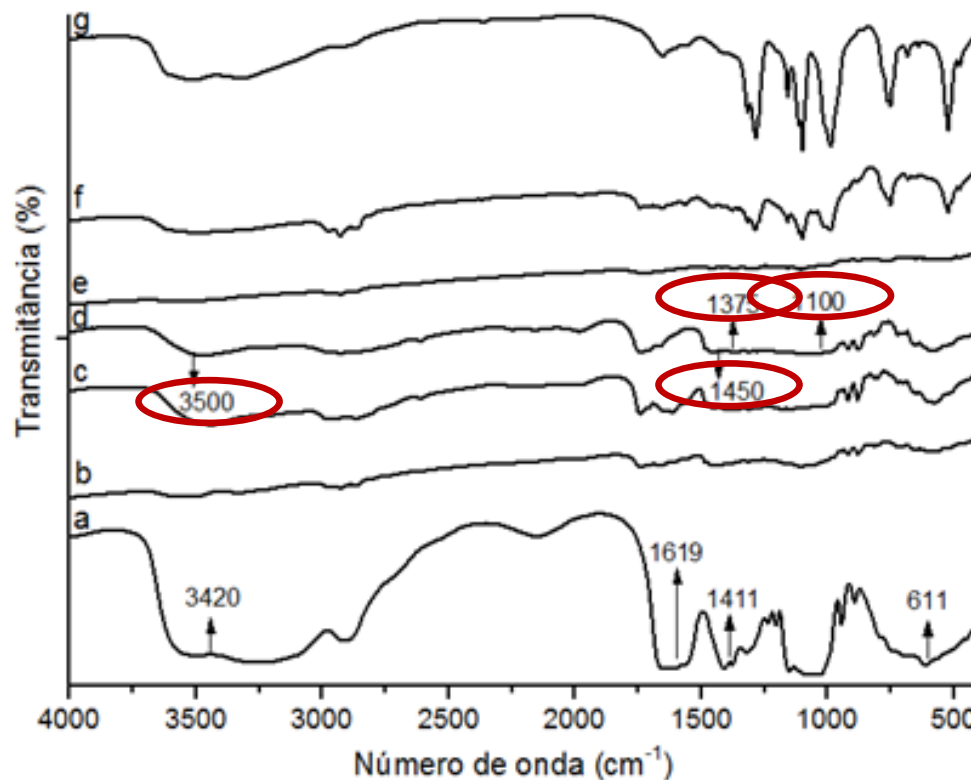
FIGURA 12 Micrografias das diferentes associações poliméricas após imersão em FSI (pH 6,8). **a)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 95:05 AHR **d)** EC 90:10 AH e **e)** EC 90:10 AHR. Barra corresponde a 50 µm.

Espectroscopia no infravermelho (IV-FT)

Estiramento OH

Vibrações do
complexo CH_3

Estiramento COC
do éter cíclico



Fernández-
Pérez *et al.*,
2011; Li *et al.*, 2015

FIGURA 13 Espectro de absorção IV-FT das diferentes associações poliméricas. **a)** Filme controle do polissacarídeo EC 00:100 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 90:10 AH **d)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **e)** EC 95:05 AHR **f)** EC 90:10 AHR e **g)** Filme controle do polissacarídeo reticulado EC 00:100 AHR.

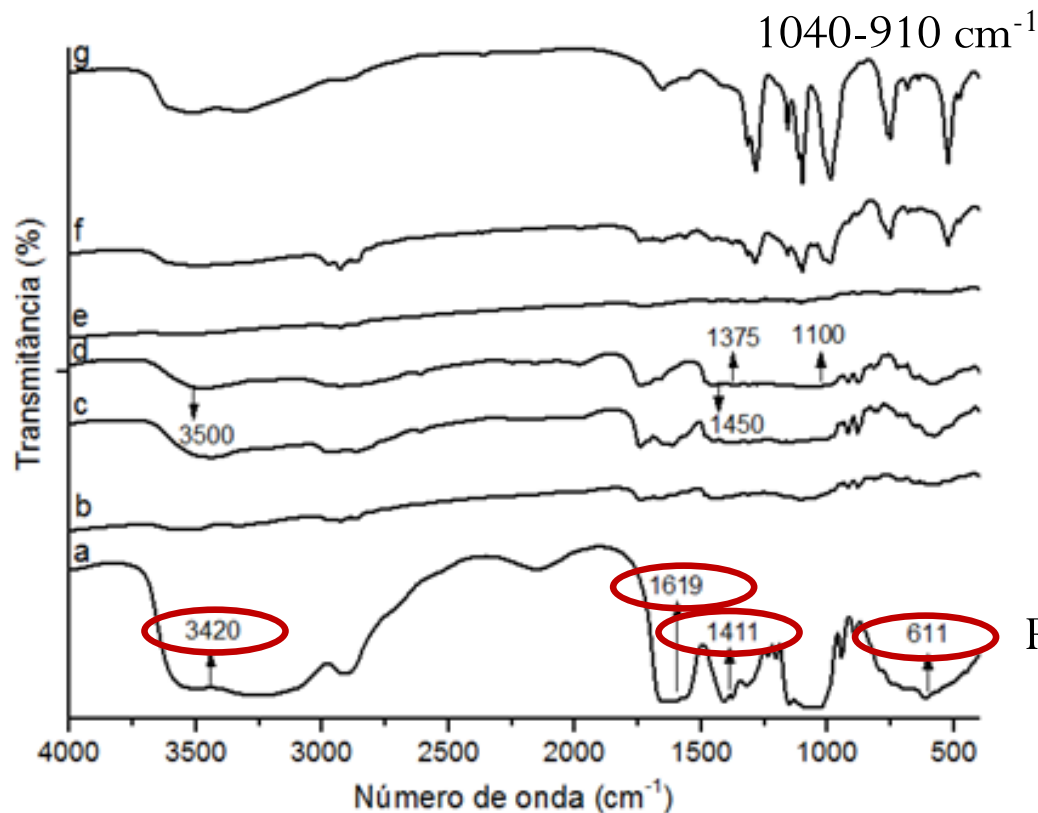
Espectroscopia no infravermelho (IV-FT)

Estiramento OH

Grupo amida
secundário

Grupo C-O em
combinação com
C=O

Estiramento C-O-C



Reddy e Karunakaran
(2013)

FIGURA 13 Espectro de absorção IV-FT das diferentes associações poliméricas. **a)** Filme controle do polissacarídeo EC 00:100 AH **b)** EC 95:05 AH **c)** EC 90:10 AH **d)** Filme controle do polímero sintético EC 100:00 AH **e)** EC 95:05 AHR **f)** EC 90:10 AHR e **g)** Filme controle do polissacarídeo reticulado EC 00:100 AHR.

Espectroscopia no infravermelho (IV-FT)

- Diferentes associações poliméricas apresentaram bandas semelhantes quando comparados aos filmes controle → mistura física
- Alves *et. al.* (2009): α -glucoligossacarídeo e/ou Tween[®] 80 + EC
- Conservação das propriedades/sinergismo
 - AH: sítio-alvo-especificidade do polissacarídeo
 - EC: tempo-dependência
 - Controle na liberação de fármacos

Estudo de citotocixidade

- Método MTT contra linhagens celulares intestinais
- Caco-2 e HT29-MTX - células de câncer colorretal
- 4 horas
- Controle negativo - 1% de Triton X-100
- Controle positivo - meio de incubação com células
- Diferentes associações
- Todos os filmes mostrarem-se seguros para as células epiteliais intestinais

Estudo de citototoxicidade

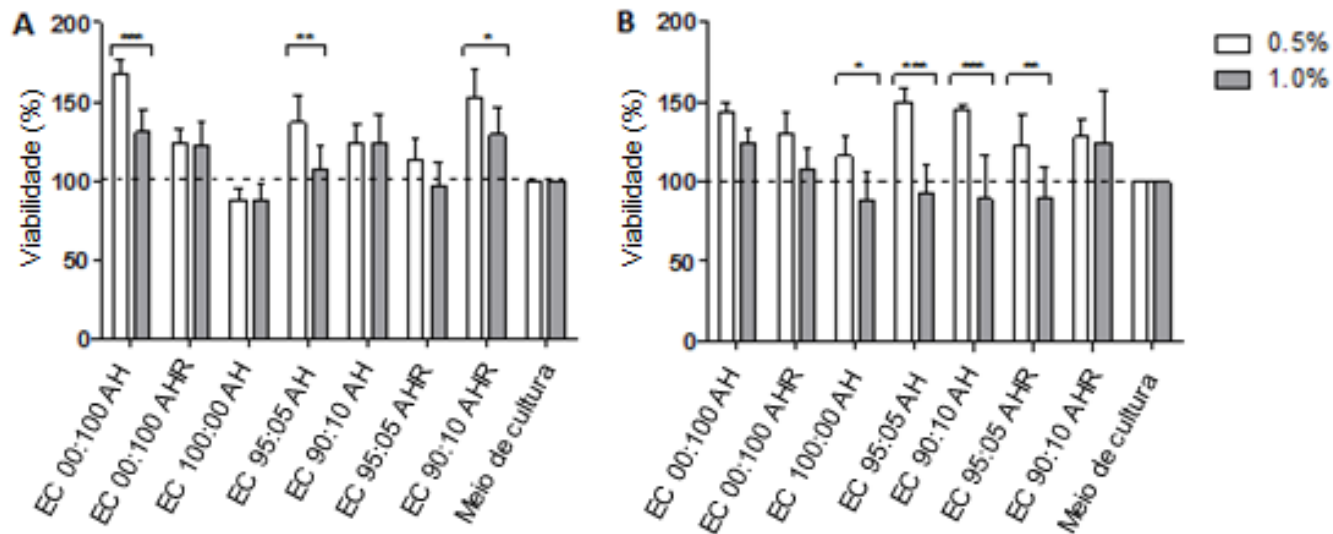


FIGURA 14 Viabilidade celular dos filmes EC 00:100 AH, EC 00:100 AHR, EC 100:00 AH, EC 95:05 AH, EC 90:10 AH, EC 95:05 AHR e EC 90:10 AHR contra linhagens celulares Caco-2 (A) e HT29-MTX (B), respectivamente, em concentrações de 0.5% e 1.0% após incubação durante 4 h. Os valores são representados como médias $\pm$ SD ($n = 6$). (*), (**) e (***) denotam diferença significativa ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$), respectivamente.

Conclusão

- Importância dos polímeros naturais
- Reticulação do AH
- Relação $\uparrow$ [] do polissacarídeo e permeabilidade
- FSG $\neq$ FSI, confirmado por micrografias
- Caracterização físico-química sugere estabilidade térmica das películas e interação física entre os constituintes da formulação
- Ausência de citotoxicidade à células intestinais

Liberação prematura em meio gástrico

- Estudos adicionais: dissolução e funcionalidade.

Conclusão

- Importância dos polímeros naturais
- Reticulação do AH
- Relação $\uparrow$ [] do polissacarídeo e permeabilidade
- FSG $\neq$ FSI, confirmado por micrografias
- Caracterização físico-química sugere estabilidade térmica das películas e interação física entre os constituintes da formulação
- Ausência de citotoxicidade à células intestinais

Liberação no meio gástrico

- Estudos adicionais: dissolução e funcionalidade.

DÉBORA SGORLA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAL ENVOLVENDO
POLÍMERO SINTÉTICO ASSOCIADO A POLISSACARÍDEO DESTINADO À
LIBERAÇÃO MODIFICADA DE ATIVOS FARMACOTERAPÊUTICOS

OBRIGADA!