

# ESTUDO DE VIABILIDADE DE WAFERS BUCAIS PARA VEICULAÇÃO DE FICOCIANINA E AÇÃO LOCAL

Palavras-Chave: WAFER BUCAL, FICOCIANINA, POLÍMEROS

Autores(as):

MARIA TERESA IORIO DE MORAES, FCF, UNICAMP

ELINA SAWA AKIOKA ISHIKAWA (doutoranda), FCF, UNICAMP

ANA LAURA VIEIRA JULIO (aluna de iniciação científica), FCF, UNICAMP

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO (orientadora), FCF, UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

No tratamento de inflamações bucais decorridas de lesões na mucosa, cabe-se o desenvolvimento de formulações farmacêuticas mucoadesivas e de liberação local sustentada. Assim, filmes liofilizados (ou wafers) surgem como alternativa à terapia via oral por serem mucoadesivos, porosos, flexíveis, biocompatíveis e de entrega local. Além disso, barram fisicamente a entrada de patógenos e podem estancar sangramentos.

Neste cenário, a proteína ficocianina (PC) da *Spirulina platensis*, de ação anti-inflamatória <sup>1</sup> e obtenção sustentável, pode ser carregada por wafers e constituir tratamento inovador para afecções bucais e profilaxia pós-cirúrgica. A PC é adequada para administração bucal, visto que é hidrossolúvel e estável em pH da saliva humana (pH 6,8 - 7,2). Ademais, apresenta certa segurança contra efeitos sistêmicos caso ingerida, uma vez que sofre desnaturação no estômago em virtude do pH ácido e da ação de pepsinas <sup>2</sup>.

Os wafers são estruturas sólidas porosas formadas através do processo de liofilização de géis poliméricos, no caso deste trabalho, à base de quitosana (CH) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Esse processo de secagem sob vácuo e por sublimação retira solventes a temperaturas amenas e preserva compostos de uma formulação que podem ser sensíveis à degradação térmica, como no caso do ativo PC. A secagem também favorece a estabilidade da formulação, uma vez que reduz riscos de proliferação microbiana, facilita o armazenamento e distribuição, e torna menos suscetível à desnaturação da ficocianina, tendo-se em vista que, em meio aquoso, agitações e mudanças de temperatura e pH são mais drásticas <sup>3</sup>.

A fim de potencializar o tratamento e prolongar a integridade do wafer na boca, a forma farmacêutica pode ter uma camada oclusiva (*backlayer*), de modo que apenas a superfície em contato com a mucosa inflamada possa liberar o ativo, ocorrendo uma liberação unidirecional. Assim, a matriz do wafer tem maior tempo de desintegração, além de minimizar perdas do ativo por deglutição, degradação por substâncias ingeridas, ação mecânica e variações de pH do meio <sup>2</sup>.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar físico-quimicamente wafers bucais à base de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose para veiculação sustentada do ativo anti-inflamatório ficocianina.

## METODOLOGIA:

### I. Material

Os insumos utilizados foram quitosana (CH) de médio peso molecular (CHm, grau de desacetilação entre 75 a 85%, *Sigma*), CH de baixo peso molecular (CHb, 50-190 kDa, grau de desacetilação > 75%, *Sigma*), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) de alto peso molecular (1200 kDa) e HPMC de baixo peso molecular (400 kDa) doados pela *Ashland*. A etilcelulose foi doada pela *Kerry*, Irlanda. A ficocianina (PC) utilizada foi de grau alimentício (*Zhejiang Binmei Biotechnology Co., Ltd, Taozhou, China*).

### II. Preparo dos hidrogéis pré-liofilização:

A CH foi solubilizada em ácido acético diluído (0,8% v/v) e os polímeros de celulose em água ultrapurificada. Foram formulados géis de CH isolada e blends de CH com os polímeros de celulose (1:1 e 1:2, formulações na Tabela 1, seção de resultados). Os polímeros foram a 2% e 1,5% m/m do gel para estudar as diferentes características dos wafers resultantes. Após, o glicerol, como agente plastificante, foi adicionado sempre na mesma concentração dos polímeros (2% e 1,5% m/m, respectivamente). Os wafers com ativo foram adicionados de 5 mg de PC para cada 2g de gel ou 7 mg de PC para cada 2,8g de gel.

Cada wafer foi feito a partir de 2g de gel, quando feitos em béqueres de 10 mL (2,2 cm de diâmetro, previamente siliconados), e a partir de 2,8g de gel, quando feitos em formas de silicone quadradas. As massas foram definidas de modo que as formulações fossem equivalentes em altura. Previamente à adição de gel, ao fundo de cada recipiente foi preparado uma *backlayer*, composta por solução de 3% m/v de etilcelulose e 1,5% v/v de óleo de rícino em etanol, e seca em estufa a 37°C/1h.

### III. Liofilização:

Os géis preparados foram liofilizados no *Lyostar 3 (SP scientific)*, com prateleiras com controle computacional de pressão e temperatura. Configurou-se o liofilizador para congelamento a -30°C / 14 horas, secagem primária a -30°C / 16 h e secagem secundária a 0°C / 22 h, seguida de 10°C / 8 h, sob vácuo de 100 mTorr e rampas de 1°C/min em cada mudança de fase<sup>4</sup>. Ao fim do processo, os wafers foram guardados em geladeira para as análises.

### IV. Caracterização dos wafers:

Os wafers foram caracterizados quanto ao aspecto macroscópico e microscópico, umidade residual, resistência mecânica e perfil de desintegração e liberação.

A avaliação macroscópica incluiu morfologia, cor, homogeneidade e altura medida com paquímetro (altura das bordas e centro). Já o aspecto microscópico foi avaliado em microscópio invertido, comparando qualitativamente a homogeneidade e tamanhos dos poros.

A umidade residual foi medida por perda por secagem em estufa a 40°C e pesagem após 24h e 48h.

A resistência mecânica foi avaliada em função da resistência à perfuração e alongamento de cada wafer em texturômetro (*TA-Xt plus - Stable Micro Systems, UK*). Os resultados foram obtidos através de gráficos força/distância e força/tempo (software *Exponent - Stable Micro Systems, UK*).

O perfil de desintegração e liberação dos wafers foi feito em béquer com 5 mL de saliva artificial (pH 6,8) em *orbital shaker* com agitação de 60 rpm em 37° C. Amostras para avaliar a liberação foram coletadas em 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h, sendo posteriormente filtradas em papel de filtro e lidas em espectrofotômetro UV a 620 nm. A partir da absorbância foi calculada a quantidade de PC liberada frente a curva de calibração. A cada tempo de coleta foi feita a avaliação visual da desintegração. A saliva artificial foi composta por NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, uréia e lisozima<sup>5,6</sup>, além de água ultrapura e o conservante metilparabeno para evitar contaminação<sup>7</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

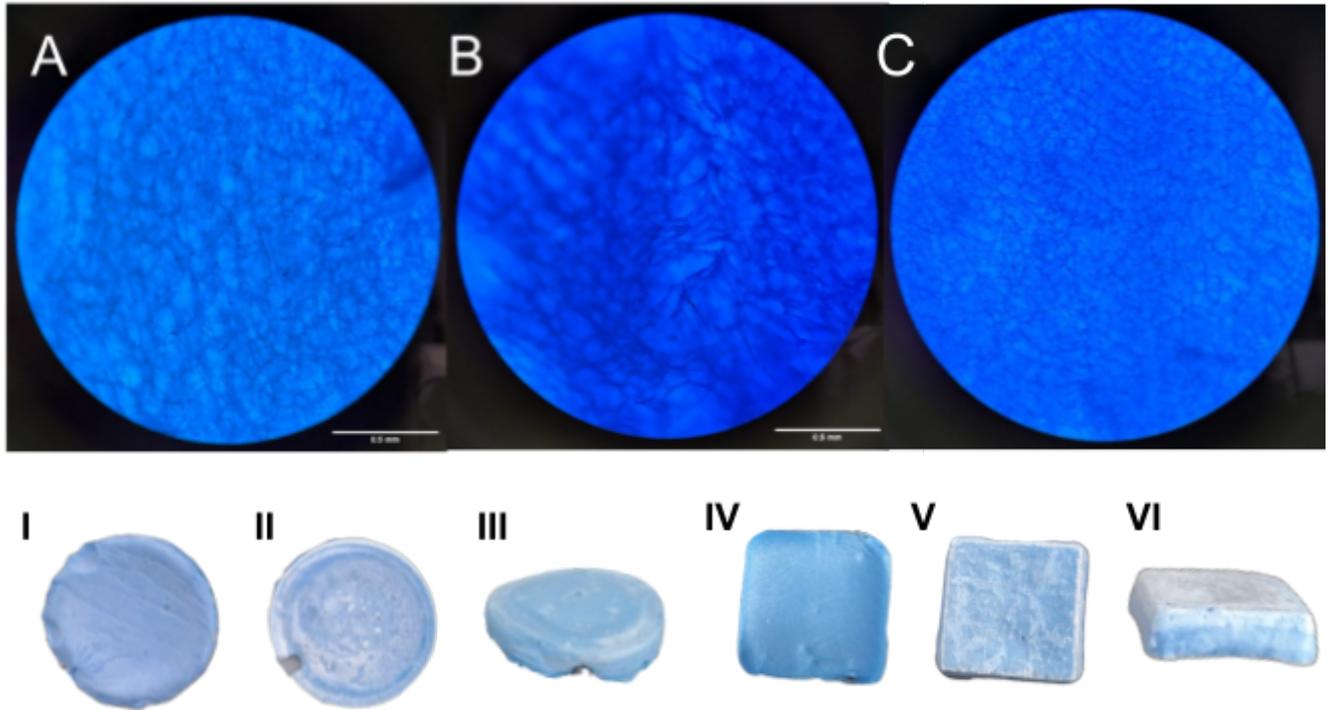
Os wafers produzidos apresentaram altura de  $2,67 \pm 1,37$  mm, umidade residual abaixo de 5%, e sem encolhimento aparente ou heterogeneidade na distribuição do ativo PC, de coloração azul (aspecto macroscópico na figura 1, I-VI). A *backlayer* aderiu uniformemente e foi capaz de reduzir o tamanho dos poros na superfície a qual é aplicada (aspecto microscópico na figura 1, C). Na superfície sem *backlayer*, wafers de CH revelaram poros menores e simétricos, comparados aos poros alongados e de parede densa das blendas de CH:HPMC (aspecto microscópico na figura 1, A e B). Quanto à desintegração, todos resistiram a mais de 48h em ambiente bucal simulado, o que favorece o propósito de uso bucal prolongado e se torna útil no quesito de promover barreira física. Em relação a resistência mecânica (resultados na tabela 1), verifica-se que alterações na matriz impactam nos resultados de desempenho, como é possível destacar comparando os lotes de quitosana de médio peso molecular (tabela 1, A-F), que apresentaram resistência à perfuração maior que os wafers de quitosana de baixo peso molecular (tabela 1, G-K).

**Tabela 1.** Composição polimérica e resultados da avaliação dos wafers de ficocianina

Formulação	Tipo de Polímero*	Quantidade de polímero (% m/m)	Quantidade de glicerol (% m/m)	Texturômetro		Perfil de liberação de PC (% em 48h)
				Resistência à perfuração (MPa)	Alongamento (%)	
<b>A</b>	CHm	2	2	11,63	50,92	1,43
<b>B</b>	1:1 CHm:HPMCb	2	2	14,62	49,15	0,93
<b>C</b>	1:1 CHm:HPMCa	2	2	14,49	52,70	0,66
<b>D</b>	CHm	1,5	1,5	12,42	44,73	Sem liberação
<b>E</b>	1:1 CHm:HPMCb	1,5	1,5	11,37	41,95	0,47
<b>F</b>	1:1 CHm:HPMCa	1,5	1,5	13,00	40,83	1,93
<b>G</b>	CHb	1,5	1,5	8,70	40,83	Sem liberação
<b>H</b>	1:1 CHb:HPMCb	1,5	1,5	8,98	45,20	0,59
<b>I</b>	1:1 CHb:HPMCa	1,5	1,5	8,44	55,58	2,89
<b>J</b>	1:2 CHb:HPMCb	1,5	1,5	4,84	39,14	3,3
<b>K</b>	1:2 CHb:HPMCa	1,5	1,5	8,38	40,84	Sem liberação

\* CH: quitosana de médio (m) ou baixo (b) peso molecular, HPMC: hidroxipropilmetilcelulose de alto (a) ou baixo (b) peso molecular.

O perfil de liberação não se mostrou satisfatório, com concentrações máximas abaixo de 5%, o que implica na necessidade de procurar um ativo mais compatível à forma farmacêutica do wafer, como moléculas de menor tamanho, ou aprimoramento da formulação com adjuvantes para facilitar a liberação de ficocianina. A alta resistência do wafer à desintegração também pode ter influenciado nessa baixa liberação, de modo que modificar a matriz polimérica pode ser outro caminho para permitir a liberação sustentada de PC.



**Figura 1.** Aspecto microscópico da superfície sem *backlayer* dos wafers de CH (A) e CH:HPMC (B) e da superfície com *backlayer* (C). Aspecto macroscópico dos wafers feitos em béquer, em respeito à superfície sem (I), com *backlayer* (II) e lateral (III) versus wafers feitos em forma, em respeito à superfície sem (IV), com *backlayer* (V) e lateral (VI).

## CONCLUSÕES:

Wafers apresentaram características físico-químicas adequadas para atuarem como forma farmacêutica destinada à aplicação bucal de uso prolongado, visto que se mostraram resistentes e compatíveis com o ambiente bucal simulado. Quanto ao desempenho na liberação de ficocianina, percebe-se que, na maioria dos lotes, o HPMC foi uma adição que favoreceu a quantidade de PC liberada, porém, ainda em concentrações muito baixas, o que torna a formulação desenvolvida não adequada para veiculação desse ativo em questão. No entanto, a matriz de wafer formulada pode ser útil para carrear outros fármacos, de modo a inovar o tratamento de acometimentos bucais e promover profilaxia pós-cirúrgica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T. & Cai, Y. **Medical Application of Spirulina platensis Derived CPhycocyanin**. Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2016, (2016).
2. POMBAL, Rute; BARATA, Pedro; OLIVEIRA, Rita. **Estabilidade dos medicamentos manipulados**. 2010.
3. LAFFLEUR, Flavia. **Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery**. Drug development and industrial pharmacy, v. 40, n. 5, p. 591-598, 2014.
4. OHORI, Ryo; AKITA, Tomomi; YAMASHITA, Chikamasa. **Effect of temperature ramp rate during the primary drying process on the properties of amorphous-based lyophilized cake, Part 2: Successful lyophilization by adopting a fast ramp rate during primary drying in protein formulations**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 130, p. 83-95, 2018.
5. SARKAR, Anwesha; XU, Feng; LEE, Seunghwan. **Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases—similarities and differences**. Advances in Colloid and Interface Science, v. 273, p. 102034, 2019.
6. BILHAN, H. et al. **The effect of mucine, IgA, urea, and lysozyme on the corrosion behavior of various non-precious dental alloys and pure titanium in artificial saliva**. Journal of biomaterials applications, v. 22, n. 3, p. 197-221, 2007.
7. AMAL, Andi Sri Suriati et al. **Preparation of artificial saliva formulation**. 2015.