Desenvolvimento de formulação em pó de ficocianina para ação pulmonar anti-inflamatória por via inalatória

Palavras-Chave: FICOCIANINA, SECAGEM, DRY POWDER INHALER (DPI)

Autores:

GUSTAVO ROSA BARBOSA, FCF – UNICAMP

SAMIRA ELISA ALVES GERALDO (coorientadora), FCM - UNICAMP

Profª. Drª. LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO (orientadora), FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As cianobactérias ou algas são procariotos fotossintetizantes gram-negativos (ANDERSON; MCINTOSH, 1991; ARMSTRONG, 1997). Sua coloração se dá pela presença de ficobiliproteínas, sendo a C-ficocianina (CPC) a principal encontrada nos gêneros Nostoc, Spirulina, Alphanizomenon entre outros (KUDDUS et al., 2013). A estrutura da CPC (Figura 1) é formada por dois hexâmeros que apresentam uma parte proteica (formada por subunidades α e β) e um grupo prostético cromóforo (PCB).

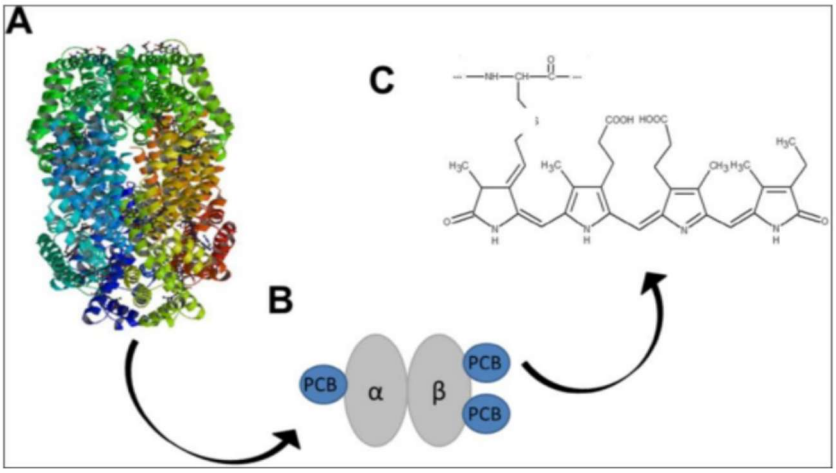


Figura 1 (A) Estrutura cristalina da proteína C-Ficocianina de Spirulina plantesis em sua forma hexamérica, imagem PDB ID 1GH0. (B) Esquema representativo da organização ficobiliproteinas ligadas a suas respectivas subunidades, sendo uma PCB associada à subunidade alfa e duas associadas à subunidade beta. (C) Estrutura química do cromóforo PCB, responsável pela cor ciano da CPC (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014).

O crescente interesse na CPC se justifica pelo seu potencial como agente anti-inflamatório. Em relação a afecções pulmonares, estudos in vitro apontaram melhora da lesão pulmonar aguda após tratamento com a CPC. A sua administração resultou na diminuição de fatores como IL-6, IL-1β e TNF-α e aumento da expressão de HO-1 (DA-LI et al., 2014). No que se refere a ação anti-inflamatória in vivo pulmonar, (LI et al., 2017) conduziram um estudo sobre a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em ratos. Após tratamento de 28 dias com CPC, tanto camundongos selvagens e deficientes em receptores do tipo TLR 2 apresentaram menos lesões, indicando efeitos anti-fibróticos da CPC.

A ação antiinflamatória de bioativos no pulmão pode ser mais direcionada e com rápido in[icio de ação através da via inalatória. Os pós secos inalatórios em altas doses (DPIs) possuem vantagens como baixo risco de contaminação microbiana e maior estabilidade físico-química quando equiparado a formulações líquidas usadas em inaladores e nebulizadores. Embora tenha resultados positivos no tratamento, os DPIs possuem um desafio farmacotécnico em relação a estreita faixa de tamanho de

partículas para deposição pulmonar efetiva e das forças de interação entre elas. Para superar esses desafios, a adição de aminoácidos hidrofóbicos e cristalinos podem dispersar partículas durante a inalação. Açucares também tem sua função: foi demonstrado que a adição de rafinose, em formulações de *Spray Drying*, quando em seu estado amorfo, promove menor degradação de proteínas durante o processo de secagem, porém, apresenta possíveis desafios quanto a estabilidade do produto, devido a recristalização inerente do açúcar, resultando na perda de efeito bioprotetor. Para retardar o processo de recristalização e aprimorar a estabilidade da formulação, a adição de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) (Amaro et al., 2015).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver formulação em pó com CPC para uso inalatório, comparando os resultados produzidos por técnicas de secagemcomo Spray Drying, avaliando características físico-químicas dos pós e mensurando o possível impacto da adição dos excipientes rafinose e HPβCD em aspectos relevantes para formulações de uso inalatório. Em adição, a formulação foi seca também por liofilização, utilizando a técnica de *Lyobeads,* visto a maior facilidade de desagregar partículas macroscópicas do que o *cake* ou pastilha tradicional da liofilização.

METODOLOGIA:

Preparo das soluções

Para o controle dissolveu-se CPC grau reagente (reagent grade C-phycocyanin, ZhejiangBinmei Biotechnology, China), na concentração final de 0,75% m/v, em tampão de histidina 5mM em pH6, pois a CPC se mostrou estável nesse tampão (etudo anterior do grupo de pesquisa). Nas soluções de formulação, acrescentaram-se os excipientes HPβCD:Rafinose (70:30) à 3% m/v.

Spray Drying

Para a obtenção de pó seco via *spray dryer* foi utilizado o equipamento *Hauroki SD-1.8L Mini Spray Dryer (Haurok Power & Expertise, Orlando, United States).* Os parâmetros de processo foram velocidade de alimentação de 8,5mL/min, fluxo de ar 7L/min, volume 480m^3/h e temperatura de entrada de ar 140ºC.

Liofilização

As soluções foram gotejadas em vial de liofilização contendo nitrogênio líquido com micropipeta, gotas no volume de 15µL. Após criocongelamento, os vials foram transferidos ao liofilizador LyoStar™3 (SP Scientific, Warminster, United States) e submetidos ao processo de secagem seguindo os seguintes parâmetros: congelamento (-40°C/240 min), secagem primária (-40°C/800min/100mTorr) e secagem secundária (5 °C/800min/100mTorr).

Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento TGA-50, Shimadzu, Japão. As amostras foram aquecidas de 25 a 500 °C em porta amostras de alumina, sob atmosfera de nitrogênio (50ml/min), com taxa de aquecimento de 10 °C/min. A porcentagem de água foi determinada pela perda de peso ao redor de 100 °C

Tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi acessado utilizando-se do analisador de tamanho de partículas por difração à laser MASTERSIZER-3000, modelo MAZ3000, com acessório AERO S (Worcestershire, U.K.). Os parâmetros utilizados foram pressão 0,5 – 4 bar, taxa de alimentação 70%, índice de refração 1,45, índice de absorção 0,1, tempo de background de 10 segundos, tempo e tempo de análise de 2 – 5 segundos.

Teor e pureza de CPC: A concentração de CPC foi avaliada pelo Método de Absorção no UV em 280nm, conforme descrito no "Método 1" da seção de "Ensaios de Proteínas Totais" da United States Pharmacopeia – USP. A concentração de CPC foi calculada a partir dos coeficientes de absorbância nos comprimentos de onda determinados (620nm, 652nm e 280nm), conforme [CPC] = (A_{615nm} – 0,474 x A_{652nm}) / 5,34. A pureza das amostras foi calculada a partir de [Pureza (%)] = (Conc. de CPC / Concentração de Proteínas Totais) X 100%. A avaliação de concentração e pureza das amostras foi efetuada antes e após o a secagem das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Aspectos visuais das formulações

O pó resultante da secagem por spray drying apresentou aspecto seco e fluido, o que indica que será facilmente dispersado, pois pouca movimentação do material promove sua suspensão no ar. Já os *Lyobeads* resultaram em esferas ocas que com pouco esforço se desagregavam em pequenos aglomerados de pó. Para esta formulação se adequar à dispositivos inalatórios, provavelmente será necessária uma etapa adicional de desagregação do sólido.

Figura 1 – Foto das amostras coletadas após processo de secagem (A: Lyobeads, B: pó seco obtido por spray drying)

Concentração de CPC e Pureza

A variação na concentração de CPC (tabela 1) para as formulações foi mais acentuada no processo de spray drying, que provocou queda de 26% em relação à medida antes da secagem.

Tabela 1 - Comparação da Concentração e Pureza em diferentes métodos de secagem. Resultados obtidos da análise dos coeficientes de absorbância nos comprimentos de onda 280nm, 620nm e 652nm, de amostras em triplicatas diluídas em tampão histidina 5mM ph6, com fator de diluição 1:2, em placas de 96 poços de fundo chato para análise UV.

	Concentração de CPC (mg/ml)		Pureza	
	Antes	**Depois**	**Antes**	**Depois**
Spray Drying	0,378	0,28	1,95	1,02
Controle Spray Drying	0,38	0,133	1,92	1,11
Lyobeads	0,38	0,37	2,0	2,1
Controle Lyobeads	0,381	0,362	2,1	1,7

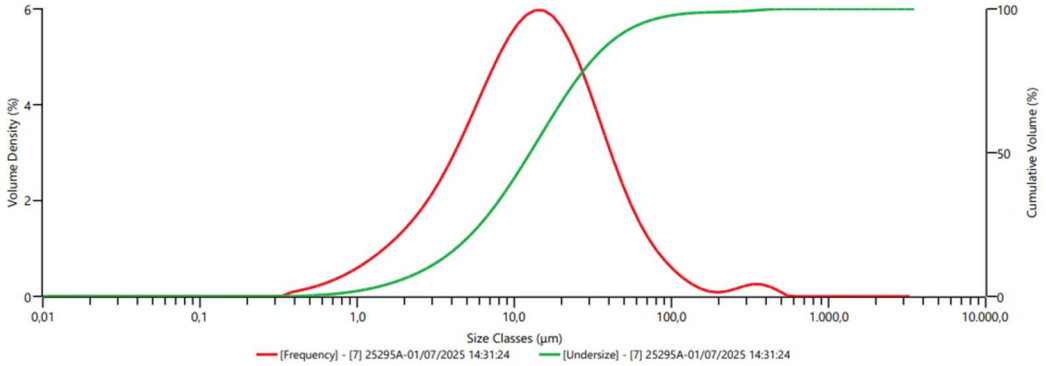
Vale destacar a manutenção da pureza da formulação liofilizada, que se manteve constante após o processo. Enquanto isso, a formulação por spray drying apresentou redução percentual de 48% em sua pureza, sendo menor que o próprio controle sem lioprotetores, que apresentou redução de 42%. Apesar disso, concentração e pureza não são os únicos parâmetros de qualidade de uma formulação

pulmonar, levaremos em conta também, o tamanho de partícula apropriado de cada formulação e sua deposição no pulmão.

Tamanho de partícula

Os resultados de tamanho de partícula para a formulação em Spray Drying estão sendo adquiridos, portanto são reportados apenas os resultados de tamanho de partícula para os *Lyobeads*.

Figura 2 - Distribuição de tamanho de partícula para formulação de *Lyobeads* contendo CPC 0,75% e HPβCD:Rafinose (70:30) à 3%.

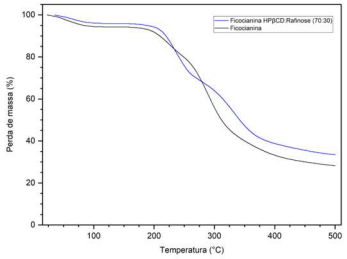


O alvo para formulações pulmonares é que a grande maioria das partículas esteja no intervalo 0,5 a 5µm, para que se alcance a deposição nas partes mais profundas do pulmão. Partículas maiores que 5µm tendem a se depositar nas vias aéreas superiores enquanto partículas muito pequenas permanecem suspensas por tempos longos no ar e são expelidas na expiração (POLITAKOS; GREGORIOU; CHOCHOS, 2024).

A figura 2 mostra a distribuição dos tamanhos de partícula para a formulação de *Lyobeads*, em que 50% das partículas possuem tamanho menor que 12,646 µm (D50), sendo necessário aprimorar o processo para produzir partículas menores. Uma segunda crista se formou na distribuição, com partículas acima de 100 µm, possivelmente devido ao método de dispersão das *Lyobeads*, que foram agitadas mecanicamente até se desintegrarem. Suspeita-se que neste processo tenham se formados aglomerados ou que a desintegração da *beads* não foi eficiente. Será implementado um novo método de desintegração para as próximas avaliações de tamanho de partícula, buscando reduzir a acentuada variabilidade no tamanho de partícula da formulação

Termogravimetria (TGA)

Figura 3 - Avaliação de Umidade Residual por TGA



A análise por TGA das amostras de *Lyobeads* estavam sendo realizadas durante a redação deste documento, portanto, nesta secção será apresentado apenas o resultado para pó do spray drying.

O controle da Umidade Residual (UR) é relevante em formulações farmacêuticas pois impacta na estabilidade do produto e, para pós de uso pulmonar, afeta a dispersão das partículas sólidas, sendo desejável reduzir a umidade residual a fim de aumentar a dispersão (PILCER e AMIGHI, 2010) A técnica de TGA foi utilizada para acessar a umidade residual das amostras após processo de secagem. Para garantir estabilidade e melhor performance aerodinâmica, valores de UR menores que 5% são desejáveis (WHITE et al., 2005). Neste sentido, A formulação seca em spray dryer seca, composta por Ficocianina HPβCD:Rafinose (70:30),

obteve melhores resultados apresentando UR de 4,0%, enquanto o controle, composto apenas por Ficocianina, UR de 5,6%.

CONCLUSÃO:

Os métodos de secagem de Spray Drying e liofilização demonstram-se promissores para o desenvolvimento de formulação pulmonar com CPC. Como demonstrado, os *Lyobeads* apresentaram maior concentração e pureza, sendo que a adição dos excipientes Rafinose e HPβCD promoveram maior estabilidade da proteína no processo de secagem.

Algumas alterações de parâmetro no processo devem ser realizadas a fim de otimizar o tamanho de partícula das *Lyobeads*, além de ser necessário aplicar novo método de dispersão para evitar aglomerados. Com os futuros resultados de tamanho de partícula para a formulação em Spray Drying será possível realizar comparativos mais apropriados entre os métodos de secagem. O mesmo vale para os resultados de TGA dos *Lyobeads.*

BIBLIOGRAFIA

AMARO, M. I.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HEALY, A. M. Co-Spray dried carbohydrate microparticles: Crystallisation delay/inhibition and improved aerosolization characteristics through the incorporation of hydroxypropyl-β-cyclodextrin with amorphous raffinose or trehalose. *Pharmaceutical Research*, v. 32, n. 1, p. 180–195, 2015. https://doi.org/10.1007/s11095-014-1454-8
ANDERSON, S. L.; MCINTOSH, L. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 9, p. 2761–2767, maio 1991.
DA-LI, Z. et al. Molecular mechanism of C-phycocyanin in alleviation of acute lung injury in septic rats. *Basic & Clinical Medicine*, v. 34, n. 7, p. 891, 5 jul. 2014.
FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, v. 11, p. 375–392, nov. 2014.
KUDDUS, M. et al. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of CPhycocyanin. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 742859, 26 ago. 2013.
LI, C. et al. Phycocyanin attenuates pulmonary fibrosis via the TLR2-MyD88-NF-κB signaling pathway. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 5843, 19 jul. 2017.
PARK, H.; HA, E.-S.; KIM, M.-S. Surface modification strategies for high-dose dry powder inhalers. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 51, n. 6, p. 635–668, nov. 2021.
PILCER, G.; AMIGHI, K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 392, n. 1–2, p. 1–19, 2010. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.017
POLITAKOS, Nikolaos; GREGORIOU, Vasilis G.; CHOCHOS, Christos L. Pulmonary Drug Delivery through Responsive Materials. **Macromol**, v. 4, n. 3, p. 490-508, 2024.
RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia. Acesso em: 31 mar. 2024.
WHITE, Steven et al. EXUBERA®: pharmaceutical development of a novel product for pulmonary delivery of insulin. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 7, n. 6, p. 896-906, 2005.