

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIO DE PERMEAÇÃO DE SISTEMA POLIMÉRICO CONTENDO EPRINOMECTINA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA EM BOVINOS

Thalita Schilive Faccin (PIC/UEM), Luisa Richart Kuligoski (Coautora), Marcos Luciano Bruschi (Coorientador), Fernanda Belicanta Borghi Pangoni (Orientadora).
E-mail: fbbpangoni2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Farmácia/Farmacotécnica

Palavras-chave: sistema de liberação de fármacos; eprinomectina; bioadesão.

RESUMO

Foram preparadas quatro formulações (F1, F2, F3 e F4) contendo eprinomectina (EPR), isopropanol, poloxamer 407, Carbopol 974P[®] ou Carbopol 934P[®], em diferentes concentrações. As formulações foram avaliadas quanto à densidade, temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$), perfil de liberação *in vitro*, força bioadesiva, capacidade de permeação e avaliação da citotoxicidade *in vitro*. Para a determinação de EPR, foi utilizado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) previamente validado. A $T_{sol/gel}$ das formulações foi avaliada e as formulações F2 e F4 apresentaram-se como formulações compatíveis para uso na pele do animal, e apresentaram boa recuperação para o conteúdo de EPR e eficiência de aprisionamento. As formulações apresentaram-se estáveis. Os sistemas F1, F2, F3 e F4 apresentaram boa adesividade. A avaliação do perfil de liberação *in vitro* de EPR a partir dos sistemas F2 e F4 indicou um perfil de liberação anômalo, governado por difusão Fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas, sendo mais lento na formulação contendo C974P[®] (F4) com relação a formulação com C934P[®] (F2). Diante disso, foi possível a obtenção de dois sistemas bioadesivos termorresponsivos para liberação de EPR, sendo eles F2 e F4. A avaliação por espectroscopia fotoacústica do perfil de permeação *ex vivo* indicou que os sistemas F2 e F4 permearam a epiderme e a derme. O teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando *A. salina* demonstrou que as formulações F2 e F4 foram 100% tóxicas às larvas, diferente de F1 e F3 que não demonstraram toxicidade.

INTRODUÇÃO

A eprinomectina (EPR) é um derivado semissintético do grupo das avermectinas, sendo de grande eficiência terapêutica frente a endo e ectoparasitas, sendo o único

endectocida aprovado para uso em animais lactantes, com um período zero de carência para a retirada de leite. EPR é uma lactona monocíclica, constituída de uma mistura de dois homólogos, EPR B1a ($\geq 90\%$) e B1b ($\leq 10\%$). Para melhorar a aplicação e espalhabilidade do medicamento na pele do animal, a utilização de hidrogéis é uma estratégia tecnológica promissora devido às suas características reológicas e propriedades bioadesivas. Neste sentido, o desenvolvimento de formulações semissólidas inovadoras contendo EPR para aplicação tópica é justificado. Assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar, determinar as características bioadesivas, de liberação e de permeação de EPR, assim como a citotoxicidade, de sistemas bioadesivos termorresponsivos (Borghi-Pangoni *et al.*, 2015).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das formulações

Foram preparadas quatro formulações, conforme apresentado no Quadro 1. A EPR foi dispersa em isopropanol. P407 juntamente com água purificada foram adicionados. O Carbopol foi disperso em água purificada e mantido em agitação até total dispersão e depois adicionado à mistura anterior. O pH das formulações foi ajustado (pH =7) com trietanolamina e os sistemas finais foram armazenados em geladeira.

Quadro 01- Composição das formulações contendo poloxamer 407 (P 407), Carbopol 934P (C934P) ou Carbopol 974P (C974P), isopropanol (isoprop) e EPR.

Formulações	P407 % (m/m)	C934P % (m/m)	C974P % (m/m)	EPR % (m/m)	Isoprop % (m/m)
F1	17,5	0,30	-	-	15,0
F2	17,5	0,30	-	0,5	15,0
F3	17,5	-	0,30	-	15,0
F4	17,5	-	0,30	0,5	15,0

Determinação da densidade relativa das formulações

Para este ensaio utilizou-se picnômetro calibrado a 20 °C, em ambiente com a temperatura controlada (20 \pm 1 °C). A densidade foi calculada de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019), em sextuplicata.

Determinação da força bioadesiva

Utilizando um analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems®) no modo de tensão a força bioadesiva dos sistemas foi avaliada *in vitro*, por meio da força de destacamento do disco de pele de boi a partir da formulação, à 37 °C. A amostra foi colocada a prova analítica, que foi abaixada até que o disco de pele entre em contato com a superfície da amostra. Uma força de 0,1 N foi aplicada por 30 s. A prova foi levantada (velocidade de 1,0 mm/s) e a força necessária para remover o disco de pele da formulação foi determinada, em, no mínimo triplicata (Bruschi, 2006).

Determinação de EPR por CLAE

O método de análise da EPR foi desenvolvido e validado utilizando um sistema de CLAE (Waters®), composto pelo módulo de separação Alliance 2696 (Waters, Wexford, Irlanda) e detector de arranjo de diodo 2998. A separação foi realizada em coluna cromatográfica C18 (4,6 x 75mm, 3,5µm) (Symmetry Waters, Wexford, Irlanda), detector de matriz de fotodiodos (Waters®, Wexford, Irlanda) e o software Empower 3® (Waters®, Milford, MA, EUA), eluição isocrática, fase móvel contendo acetoneitrila:metanol:água (47:33:20, V/V/V), fluxo de 1,5 mL/min, à 30 °C, 15 µL de volume de injeção e detecção em 245 nm.

Avaliação in vitro do perfil de liberação de EPR a partir dos sistemas

O perfil de liberação *in vitro* de EPR foi avaliado utilizando células de difusão vertical de Franz, a partir dos sistemas F2 e F4. A quantificação do ativo liberado foi avaliada em 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min (n = 3). 1g da formulação foi adicionado na parede da célula de Franz em contato direto com o meio de liberação (50 mL de solução de Tween a 5%), mantido a 37 °C sob agitação magnética constante. Nos intervalos de tempo, foi coletado 1,0 mL do meio de liberação com reposição do meio de dissolução.

Avaliação da permeação de EPR em pele de boi por espectroscopia fotoacústica

Os espectros foram obtidos nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível, com variação de 250 – 500 nm. A potência da fonte foi de 800 W e a frequência de modulação da luz foi de 13 Hz. A espessura do tecido que contribui para o sinal fotoacústico foi obtido pelo cálculo do comprimento de difusão térmica (ms), sendo definido matematicamente como $ms = (d/\pi f)^{1/2}$, em que d é a difusividade térmica da amostra e f a frequência de modulação de luz. Utilizando $d = 4,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Avaliação da citotoxicidade in vitro de EPR em Artemia salina

Em um recipiente contendo solução salina (NaCl;0,1 mol/L), a 25 °C, foram adicionados cistos do microcrustáceo *Artemia salina*, que eclodiram após 24 h. Cerca de trinta microcrustáceos foram transferidas para cada placa de Petri contendo 3,0 mL de solução salina e 1,0 mL de cada formulação (F1; F2; F3 e F4), separadamente. No grupo controle, larvas foram incubadas em solução salina. Após

30 e 60 min de exposição, as *A. salinas* foram avaliadas quanto a taxa de sobrevivência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade relativa dos sistemas F1, F2, F3 e F4 foram de $0,9872 \pm 0,0021$ g/mL; $0,9824 \pm 0,0098$ g/mL; $0,9857 \pm 0,0014$ g/mL; $0,9840 \pm 0,0030$ g/mL, respectivamente. Os valores mostram-se próximos entre si e próximos à densidade da água. Todas as formulações apresentaram força bioadesiva, porém essa força demonstrou-se maior nas formulações F3 e F4, $0,268 \pm 0,005$ N e $0,202 \pm 0,012$ N respectivamente. Para F1 e F2 a força foi de $0,347 \pm 0,008$ N e $0,137 \pm 0,003$ N, respectivamente. Essa diferença bioadesiva entre as formulações está relacionada com a forma de reticulação das cadeias poliméricas dos polímeros envolvidos, assim como sua interação com a EPR. No estudo de liberação *in vitro*, quantificado pelo método previamente validado em CLAE, observou-se a detecção do homólogo B1a de EPR, no tempo de 60 minutos. Já no tempo de 480 minutos foi liberado $77,88\% \pm 4,37$ de EPR B1a em F2 e $29,50\% \pm 1,21$ em F4. No entanto, o homólogo B1b da EPR não foi detectado em nenhuma das formulações. Ambos os sistemas (F2 e F4) possuem um perfil de liberação anômalo, governado por difusão Fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas. O ensaio de permeação revelou que a EPR apresentou-se presente na epiderme e na derme. No ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando *A. salina*, os controles negativos apresentaram 100% de sobrevivência das larvas em 30 min e $98,21 \pm 2,57\%$ em 60 min. Para as formulações F2 e F4, 100% das *A. salinas* morreram com 30 min de exposição, indicando um total de 0% de sobrevivência. Entretanto, para as formulações F1 e F3 cerca de $96,70 \pm 3,70\%$ sobreviveram após 60 minutos. Portanto F1 e F3 não são tóxicas, mas F2 e F4 são tóxicas para *A. salina*.

CONCLUSÕES

Foi possível preparar, caracterizar e avaliar as quatro formulações F1, F2, F3 e F4 quanto às características bioadesivas, de liberação de EPR, citotoxicidade e permeação *ex vivo*. As formulações F2 e F4 apresentaram-se promissoras para a administração de EPR tópica em bovinos.

REFERÊNCIAS

Borghini-Pangoni, F. B. *et al.* Screening and *In Vitro* Evaluation of Mucoadhesive Thermoresponsive System containing Methylene Blue for local Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. **Pharm Res.** v.33, n.3, p.776-91, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553353/>. Acesso em: 22 ago. 2023.

Bruschi, M. L. *et al.* Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J Pharm Sci.** v. 96, n.8, p.2074-89, 2007. Disponível em: doi: 10.1002/jps.20843. Acesso em: 22 ago. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed., Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/VOLUME1FB6at2Erratappdfcomcapa.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2023.