

Desenvolvimento de uma formulação semissólida à base de epiisopiloturina e avaliação da sua estabilidade

Development of a semisolid formulation based on epiisopiloturin and evaluation of its stability

Desarrollo de una formulación semisólida a base de epiisopiloturina y evaluación de su estabilidad

Recebido: 11/02/2023 | Revisado: 02/02/2023 | Aceitado: 06/03/2023 | Publicado: 10/03/2023

Eduardo de Carvalho Carneiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7202-0930>
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil
E-mail: educrv2@hotmail.com

Alcides Barroso de Sousa Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4950-1063>
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil
E-mail: alcidesbarrososneto@gmail.com

Eliciane Maria Linhares Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9250-4876>
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil
E-mail: fcsousa02@gmail.com

Higialice da Silva Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0119-819X>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: higinia.alice@gmail.com

José Rodrigues dos Santos Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8317-0333>
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil
E-mail: joserodriguesjunior19@gmail.com

Ysla Pontes Feitoza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7854-5444>
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil
E-mail: ysla99@outlook.com

Leiz Maria Costa Vêras

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3422-2878>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: leiz.veras@gmail.com

Resumo

A mucosite oral é um efeito colateral comum associados as modalidades terapêuticas para o câncer. Esse trabalho tem por objetivo desenvolver uma formulação semissólida utilizando epiisopiloturina (EPI) como princípio ativo, avaliando a estabilidade e seu perfil de liberação *in vitro*. A EPI foi combinada com os excipientes: carbopol, metilparabeno, glicerina, trietanolamina, água, vaselina, lanolina e mentol. Para avaliação físico-química foram realizados os testes de centrifugação, pH, ciclo gelo-degelo e caracteres organolépticos. Os dados do teste de pH foram analisados pelo teste t e os dados de liberação analisados por regressão linear e aplicados modelos matemáticos. A análise dos demais resultados foi através da estatística descritiva. Os resultados mostraram que no teste de centrifugação, não houve separação de fases. No teste de pH os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ao comparar os valores de pH entre o tempo 0 e 30 dias, sendo eles 6,27 e 6,33, respectivamente. No teste do ciclo gelo-degelo, após os ciclos de variação de temperatura, a amostra foi centrifugada, sendo eles e foi possível observar uma leve separação de fase. Na avaliação organoléptica observou-se uma pomada de cor branca brilhosa, homogênea e odor de menta. Apresentou um perfil de liberação do princípio ativo por aproximadamente 9 horas. A EPI pode representar uma promissora alternativa. Os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de formulações estáveis e um produto com potencial para ser utilizado associado ao tratamento anticâncer, no combate aos efeitos colaterais como a mucosite oral.

Palavras-chave: Epiisopiloturina; Formulações; Estabilidade; Liberação.

Abstract

Oral mucositis is a common side effect associated with cancer therapeutic modalities. This work aims to develop a semi-solid formulation using epiisopiloturine (EPI) as active principle, evaluating the stability and its *in vitro* release profile. EPI was combined with the excipients: carbopol, methylparaben, glycerin, triethanolamine, water, vaseline, lanolin and menthol. For physical-chemical evaluation, centrifugation, pH, ice-thaw cycle and organoleptic characteristics tests were carried out. The pH test data were analyzed by the t test and the release data analyzed by

linear regression and mathematical models were applied. The analysis of the other results was through descriptive statistics. The results showed that in the centrifugation test, there was no phase separation. In the pH test, the results demonstrated that there was no statistical difference when comparing the pH values between the time 0 and 30 days, being 6.27 and 6.33, respectively. In the ice-thaw cycle test, after the temperature variation cycles, the sample was centrifuged, and it was possible to observe a slight phase separation. In the organoleptic evaluation, a bright white, homogeneous ointment with a mint odor was observed. It presented a release profile of the active principle for approximately 9 hours. PPE can represent a promising alternative. The results of this study can contribute to the development of stable formulations and a product with the potential to be used in association with anticancer treatment, in the fight against side effects such as oral mucositis.

Keywords: Epiisopiloturine; Formulations; Stability; Release.

Resumen

La mucositis oral es un efecto secundario común asociado con las modalidades terapéuticas del cáncer. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar una formulación semisólida utilizando epiisopiloturina (EPI) como principio activo, evaluando la estabilidad y su perfil de liberación in vitro. El EPI se combinó con los excipientes: carbopol, metilparabeno, glicerina, trietanolamina, agua, vaselina, lanolina y mentol. Para la evaluación físico-química se realizaron pruebas de centrifugación, pH, ciclo de congelación-descongelación y características organolépticas. Los datos de la prueba de pH se analizaron mediante la prueba t y los datos de liberación se analizaron mediante regresión lineal y se aplicaron modelos matemáticos. El análisis de los demás resultados fue a través de estadística descriptiva. Los resultados mostraron que en la prueba de centrifugación no hubo separación de fases. En la prueba de pH, los resultados demostraron que no hubo diferencia estadística al comparar los valores de pH entre el tiempo 0 y 30 días, siendo 6,27 y 6,33, respectivamente. En la prueba del ciclo hielo-deshielo, luego de los ciclos de variación de temperatura, la muestra fue centrifugada, y fue posible observar una ligera separación de fases. En la evaluación organoléptica se observó una pomada homogénea de color blanco brillante con olor a menta. Presentó un perfil de liberación del principio activo durante aproximadamente 9 horas. El EPI puede representar una alternativa prometedora. Los resultados de este estudio pueden contribuir al desarrollo de formulaciones estables y un producto con potencial para ser utilizado en asociación con el tratamiento contra el cáncer, en la lucha contra efectos secundarios como la mucositis oral.

Palabras clave: Epiisopiloturina; formulaciones; Estabilidad; Liberar.

1. Introdução

O Brasil é detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta, com sua rica biodiversidade possui uma fábrica natural sofisticada de substâncias das mais diversas classes e estruturas químicas, que se bem aproveitadas teriam um potencial enorme para inovações radicais e incrementais para os setores de fármacos, cosméticos, agroquímicos e suplementos alimentares (Agrawal et al., 2015).

Apesar de não apresentar uma bioeconomia vigorosa baseada em inovações, a pesquisa de ativos naturais provenientes de espécies vegetais da biodiversidade, tem se expandido e contribuído com novas alternativas terapêuticas. Um exemplo deste desenvolvimento é a pesquisa com a espécie *Pilocarpus microphyllus*, popularmente conhecida como jaborandi que é intensamente explorada como fonte do alcaloide pilocarpina (Moraes et al, 2013; CNCFlora, 2023). No entanto outros alcaloides foram identificados também com potencial uso na indústria farmacêutica como é o caso do epiisopiloturina (Dwivedi et al, 2014; Vegeflora, 2010).

Em consonância com a atividade de novos princípios ativos, tem aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver formulações capazes de liberar fármacos em sítios específicos no organismo, assim como manter os mesmos em seus locais de ação por longos períodos de tempo, controlando sua velocidade de liberação, visando o controle da ação terapêutica e a redução de seus efeitos colaterais (Anton & Vandame, 2010; Paracampo, 2009).

No desenvolvimento de uma formulação farmacêutica é necessário garantia da sua qualidade e estabilidade em relação ao tempo. Os ensaios de estabilidade visam determinar o comportamento das formulações durante meses ou anos, submetendo-os a diferentes condições de armazenamento e constituem um importante parâmetro para detecção de possíveis sinais de instabilidade na formulação, uma vez que podem influenciar na eficácia e qualidade do produto e ainda na aceitação pelo consumidor (Corrêa, 2011; Yin, 2015).

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Tendo como característica definidora a rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que podem invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Constitui a segunda principal causa de morte, sendo responsável por 70% das mortes em populações de baixa e média renda e um total de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (Freitas, 2019; Facina, 2011).

A quimioterapia antineoplásica é uma forma de tratamento largamente utilizada no tratamento do câncer em diferentes sítios anatômicos. Tanto a radioterapia como a quimioterapia podem, além de atingir as células tumorais, afetar o tecido normal, causando comprometimentos que são dependentes do tipo de câncer, das características do indivíduo, da quantidade aplicada e do sítio tumoral (Figueiredo, 2009; Weiss & Lameira, 2011). Essas medicações ocasionam efeitos colaterais em diversos sistemas orgânicos entre eles, o sistema gastrointestinal, sendo náuseas, vômitos, inapetência e mucosite os efeitos colaterais mais comuns nesse sistema (Grabher & Alegre, 2015). Pacientes em tratamento para o câncer desenvolvem alterações agudas e crônicas significativas na cavidade oral e como consequência do tratamento estes podem ter a qualidade de vida prejudicada ou até mesmo o abandono do tratamento (Guimarães et al, 2014).

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um fármaco antimetabólico da classe das fluoropirimidinas que foi desenvolvido a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para a proliferação e metabolismo celular (Guimarães et al, 2015). Os efeitos colaterais do 5-FU podem variar principalmente de acordo com o tratamento, o tipo de câncer, a dose utilizada, a via de administração e a nutrição do paciente, sendo um dos grandes responsáveis por provocarem a mucosite oral como efeito adverso. Eles são mais evidentes em células com grande índice de mitose, como tecidos de rápida proliferação, como é o caso do epitélio da mucosa oral (Oliveira et al., 2016).

A mucosite oral é reconhecida como a maior complicação não hematológica da terapia do câncer e caracteriza-se pela manifestação de lesões ulcerativas extremamente dolorosas que acometem principalmente a região do palato mole, mucosas jugal e labial, face ventral de língua e assoalho bucal (Zhu & Zhang, 2020).

A mucosite oral é uma condição resultante da inflamação da mucosa que se manifesta por meio de eritema, ulceração, hemorragia e edema associado na maioria dos casos ao quadro de dor. A gravidade da mucosite é decorrente da mielossupressão que advém da destruição da barreira epitelial, tornando assim a cavidade oral, uma importante porta de entrada para microrganismos patogênicos. Os agentes etiológicos mais associados a essa infecção são principalmente bactérias da própria microbiota oral como bactérias gram negativas, além de fungos como a *Candida albicans* (Yang et al., 2009). Além de evoluir para um quadro álgico que poderá ser tão intenso, que afeta inclusive a capacidade de se alimentar do paciente, fazendo com que seja necessária a interrupção do tratamento por alguns dias para melhora da condição (Campelo et al., 2017).

Neste contexto, este trabalho objetivou o desenvolvimento de uma formulação semissólida contendo como princípio ativo um alcaloide extraído das folhas de uma planta nativa do Brasil, levando em consideração o desenvolvimento de novos produtos oriundos da grande biodiversidade brasileira e a importância da pesquisa, em especial no que tange ao uso no tratamento da mucosite oral em pacientes oncológicos.

2. Metodologia

O protocolo de extração e o isolamento seguiram de acordo Veras et al. (2013), onde o alcaloide é extraído por meio de um processo químico baseado na acidificação e filtração, seguido de alcalinização (depósito de patente PI0904110-9 A2).

Os excipientes farmacêuticos foram escolhidos com base em pesquisas na literatura, tendo como base outras formulações semissólidas, sendo escolhidos através de suas características físicoquímicas, tendo como base sua possível afinidade com a EPI. Foram utilizados os polímeros (Carbopol®, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Natrosol®),

metilparabeno, lanolina, vaselina sólida e mentol, sendo tais compostos adquiridos comercialmente em farmácia de manipulação. Para seleção da base polimérica a ser utilizada na preparação do gel em estudo, foram previamente selecionados três polímeros comumente utilizados na farmacotécnica das indústrias farmacêuticas para preparações semissólidas: Carbopol 940®, Carboximetilcelulose (CMC) e Natrosol®, preparados em diferentes concentrações e avaliados. Para seleção da base polimérica a ser utilizada na preparação do gel em estudo, foram previamente selecionados três polímeros comumente utilizados na farmacotécnica das indústrias farmacêuticas para preparações semissólidas: Carbopol 940®, Carboximetilcelulose (CMC) e Natrosol®, preparados em diferentes concentrações e avaliados.

Para determinação da concentração de ativo na formulação foi utilizada a concentração encontrada em estudo anterior (Silva et al., 2013), testados frente modelos agudos de inflamação e nocicepção (1 mg / kg, por via intraperitoneal) e calculados para o peso médio (250-300g) dos animais que serão utilizados no teste *in vivo* de mucosite oral induzido por 5-FU. O preparo da formulação foi realizado com base nas peculiaridades de cada componente, sendo testados em associação até a possibilidade de estabelecer uma formulação potencialmente estável antes dos testes de estabilidade.

Em seguida foi analisado o valor do pH antes de prosseguir com os testes de estabilidade, afim de determinar o potencial de segurança quando aplicado na mucosa oral. Dessa forma, a análise do pH da formulação foi realizada utilizando um pHmetro de bancada digital calibrado previamente com as soluções determinadas pelo próprio equipamento

Os testes de estabilidade foram realizados sob condições que permitam fornecer informações sobre a estabilidade em menos tempo possível. Para isso, amostras foram submetidas a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. O estudo de estabilidade acelerada da formulação foi realizado conforme especificações da RDC 318/2019 e guia de estabilidade de produtos cosméticos.

O primeiro teste realizado foi o de centrifugação, sendo a amostra centrifugada a 3.000 rpm durante 30 minutos (Brasil, 2004). Sendo então avaliadas macroscopicamente de acordo com os critérios: (1) sem separação de fases; (2) leve separação de fases; (3) produto com 50% de separação; e (4) produto com mais de 50% de separação. Em seguida, foi realizado o teste de gelo-degelo, sendo uma amostra (5g) da formulação submetida ao teste, mediante variações extremas de temperatura, sendo realizado no período de 12 dias com 6 ciclos alternados de 24 h a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e 24 h a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, em estufa e refrigerador respectivamente (Brasil, 2008). Depois deste período, as amostras foram submetidas também ao teste de centrifugação com 3.000 rpm durante 30 minutos, a fim de identificar sinal de instabilidade e avaliadas de acordo com os seguintes critérios: (1) sem separação de fases; (2) leve separação de fases; (3) notável separação de fases; (4) produto com 50% de separação e (5) produto com mais de 50% de separação.

Por fim, foram analisadas as características organolépticas, tais como cor, odor e aspecto da formulação, foram avaliados. Os testes foram realizados através da inspeção visual e percepção direta de uma amostra de 10 g da formulação, com auxílio de uma espátula para melhor realização da análise visual. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A intensidade de odor da pomada foi classificada em: nenhum, fraco, distinto ou forte e, seguida pela sensação causada: aromático, frutoso, mofado ou rançoso. Analisando em diferentes tempos (0,30 e 60 dias).

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues et al. (2019) com adequações. Inicialmente as membranas de acetato celulose foram lavadas e hidratadas com água deionizada. Em seguida 200 mg da formulação (0,02 g de EPI) foi inserida na membrana e submergida em 50 mL de solução tampão fosfato pH 6,8 sob agitação (100rpm) e aquecimento constante na temperatura de 37°C . Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos intervalos de tempo pré-estabelecidos e devolvida igual volume da solução de tampão fosfato pH 7,4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para quantificação do alcaloide liberado usou-se as medidas de absorbâncias (258nm) e calculou-se através da construção de uma curva de calibração que apresentou equação da reta $y = 0,733x - 0,0146$, onde, y é absorbância e x, a

concentração em $\mu\text{g/mL}$ da amostra analisada e o coeficiente de linearidade obtido foi $r^2 = 0,9987$. O experimento foi realizado em triplicata e as concentrações de EPI foram corrigidas considerando o fator de diluição.

Para investigar a ordem de reação cinética e possíveis mecanismos de liberação de EPI através de membranas, foram aplicados os seguintes modelos matemáticos indicados abaixo na Tabela 1:

Tabela 1 - Descrição das expressões matemáticas utilizadas.

Expressões matemáticas	
Ordem zero	$C = C_0 - k.t$
Primeira ordem	$\ln C = \ln C_0 - k.t$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_0 = k.t^n$

Fonte: Autoria própria (2020).

Os dados obtidos nas análises realizadas sofreram tratamento estatístico por meio de Estatísticas Descritivas (Média e Desvio Padrão) e teste t ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel® 2010, Origin 8.5.

3. Resultados e Discussão

O princípio ativo incorporado foi o alcaloide EPI, um pó branco, insolúvel em água (Figura 1). Sendo a concentração utilizada de 0,1% para cada grama de formulação a ser produzida.

Figura 1 - EPI pesada para formulação (princípio ativo utilizado).



Fonte: Autoria própria (2020).

Após avaliação e comparação com os três polímeros testados o gel constituído de carbopol® foi o escolhido para o desenvolvimento da formulação em questão. O conservante utilizado foi da classe dos parabens (metilparabeno) e como agente plastificante optou-se por utilizar a glicerina.

Os componentes da formulação foram constituídos por duas fases (Tabela 2). A primeira a ser preparada foi a fase aquosa, responsável por 60 % da composição. Esta fase consiste no preparo de um gel contendo o polímero mucoadesivo, onde inicialmente ocorre a solubilização de metilparabeno (0,15 %) sob agitação seguida da adição de glicerina (1 %) e dispersão de Carbopol® (2 %) utilizando temperatura de 50 °C. A solução fica sob agitação por 40 min, até a formação de um gel homogêneo e após total homogeneização do gel, adiciona-se lentamente, sob agitação, a trietanolamina ajustando para pH 7.

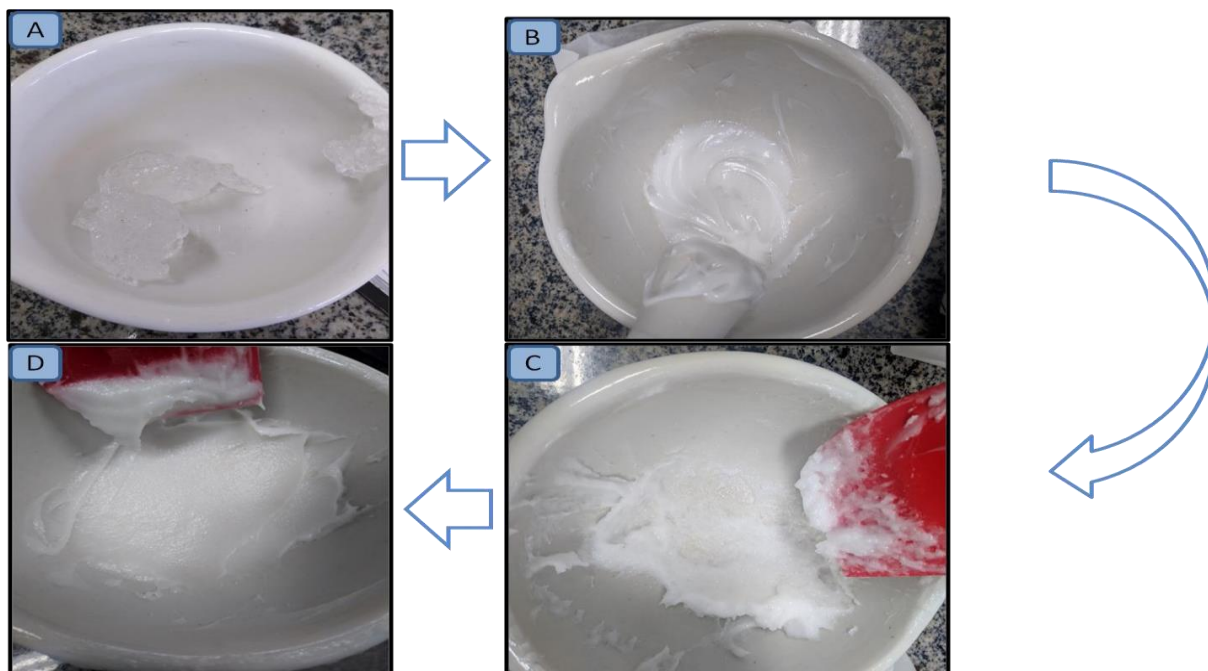
A segunda, fase oleosa, responsável por 40 % da composição, foi preparada inicialmente pesando-se a 0,1 % de EPI para a formulação seguida da solubilização em vaselina sólida (q.s.p. 40 %) até completa homogeneização. Misturou-se a fase oleosa e aquosa com auxílio de gral (almofariz) em porcelana com pistilo. Observou-se que a formulação não se apresentava completamente homogênea e a fim de obter o melhor aspecto e o sabor da formulação foram utilizados 3 % de lanolina e 0,5 % de flavorizante mentol, respectivamente (Figura 2). O resultado foi analisado e armazenado em bisnagas com tampa flip-flop para outras análises posteriores.

Tabela 2 - Componentes da formulação desenvolvida.

	Componentes	Função farmacotécnica	Quantidade
F A S E A	Carbopol®	Espessante	2%
	Metilparabeno	Conservante	0,15%
	Glicerina	Umectante	1%
	Trietanolamina	Basificante	pH=7
	Água	Veículo	q.s.p.
F A S E B	EPI	Ativo	0,1%
	vaselina sólida	Agente-oclusivo (película protetora), condicionante da pele.	p. 40%
	Lanolina	Agente emulsificante	3%
	Mentol	Flavorizante	0,5%

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 2 - Demonstração das etapas da formulação.



Legenda: Em (A) Gel carbopol; (B) EPI+ vaselina; (C) fase aquosa + fase oleosa sem lanolina; (D) fase aquosa + fase oleosa com lanolina. Fonte: Autoria própria (2020).

A determinação do pH é muito importante no estudo de estabilidade, pois alterações no valor de pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro do processo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento. Essas instabilidades podem ocorrer também devido ao tempo (Marafon et al., 2016).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos de pH da formulação em diferentes tempos acondicionadas em embalagem de plástico. No teste de pH os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ao comparar os valores de pH entre o tempo 0 e 30 dias. No entanto, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos 0 e 60 e 30 e 60 dias após a formulação.

Tabela 3 - Análise de pH da formulação em diferentes tempos.

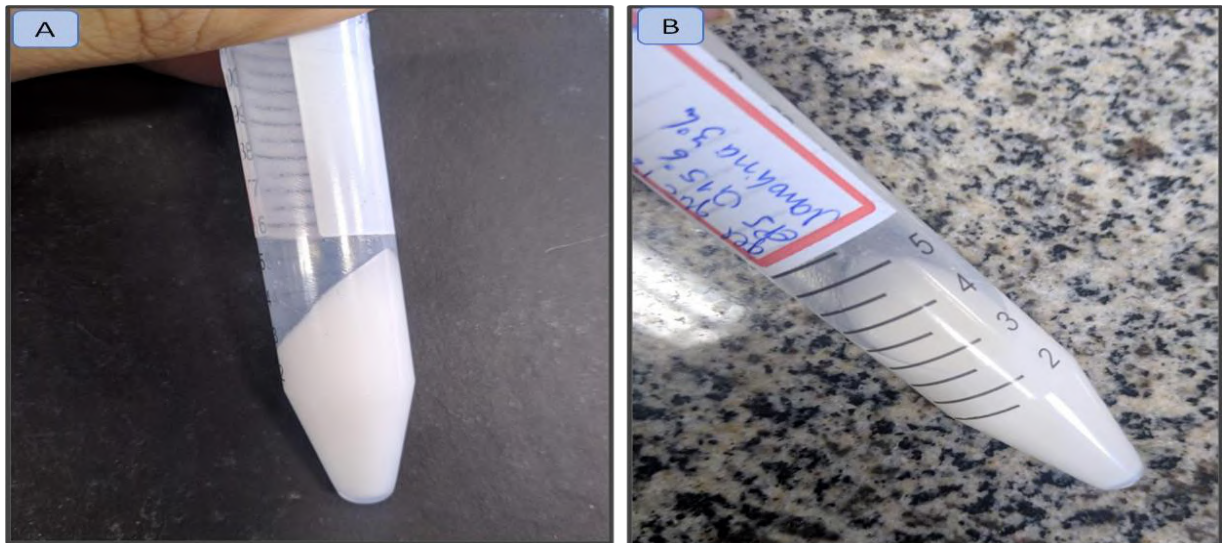
EMBALAGEM	TEMPO (DIAS)	PH \pm DP
PLÁSTICO	0	6,27 \pm 0,1
	30	6,33 \pm 0,07*
	60	7,62 \pm 0,2*

. *($p < 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa (2020).

O teste de estabilidade acelerada visa conferir a formulação, condições para o envelhecimento acelerado, permitindo definir o perfil de estabilidade física, físico-química, química e microbiológica. Trata-se então de um teste de orientação, indicando se os veículos em estudo conferem a estabilidade adequada (Brasil, 2004).

O primeiro teste a ser realizado para análise estabilidade foi o de resistência à centrifugação, onde não foi observada separação de fases da pomada no tempo inicial (Figura 3), seguindo então para os testes consecutivos.

Figura 3 - Formulação após centrifugação.



Legenda: Em (A) e (B) representação após centrifugação em lados distintos do tubo. Fonte: Autoria própria (2020).

No teste do ciclo gelo-degelo, após os ciclos a amostra foi centrifugada e foi possível observar uma leve separação de fase como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Formulação após centrifugação de ciclo gelo-degelo.



Fonte: Autoria própria (2020).

As características organolépticas constituem o indicativo mais fácil e acessível para avaliação da qualidade de uma preparação semissólida e para detectar alguma eventual alteração e determinar os parâmetros de aceitação do produto pelo

consumidor. Um simples exame visual pode funcionar como um indicativo, da homogeneidade da preparação (MARAFON et al., 2016).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das características organolépticas da formulação apresentada em diferentes tempos. Na avaliação organoléptica observou-se uma pomada de cor branca brilhosa, homogênea e odor característico de menta. Conforme Tabela 4, a formulação desenvolvida manteve-se estável após 30 dias, apresentando alterações em 60 dias. Foram observadas variações na textura, cor e aspecto após esse período.

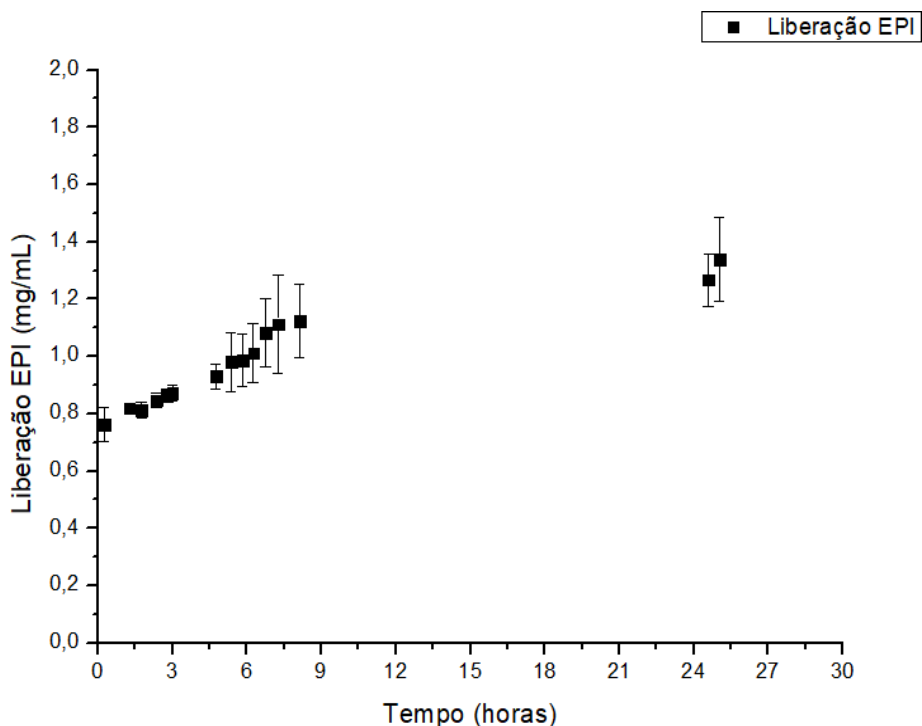
Tabela 4 - Avaliação das características organolépticas em diferentes tempos.

TEMPO (DIAS)	ASPECTO	COR	INTENSIDADE	ODOR
0	Homogêneo	Branco brilhante	Fraco	Aromático
30	Homogêneo	Branco brilhante	Fraco	Aromático
60	Heterogêneo	Branco opaco	Fraco	Aromático

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

A realização do ensaio de liberação *in vitro* permitiu observar que o alcaloide EPI é liberado controladamente em função do tempo, originando uma curva de crescimento da concentração EPI. A Figura 5 apresenta o perfil de liberação de EPI por meio das médias de concentração encontradas em cada tempo de coleta, ajustado fator de diluição, apresentando um perfil de liberação gradual do princípio ativo por aproximadamente 9 horas.

Figura 5 - Perfil de liberação de EPI na formulação semissólida em função do tempo.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

O perfil de liberação foi ajustado aos modelos matemáticos e a seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (R^2), os resultados estão demonstrados na Tabela 5. O perfil de liberação revelou

um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo Korsmeyer- Peppas, em relação aos outros modelos matemáticos avaliados no estudo.

Tabela 5 - Modelos matemáticos avaliados.

EPI	Ordem zero		Primeira ordem		Korsmeyer-Peppas		
	K	R ²	K	R ²	K	n	R ²
	0,03	0,929	0,049	0,981	0,79	0,14	0,994

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Estudos referentes à inovação tecnológica farmacêuticas aumentaram nas últimas décadas devido à popularidade dos produtos à base de plantas, logo, é de extrema importância novas pesquisas que garantam a eficácia e a segurança dessas formulações. Entretanto, para que uma planta se torne um produto farmacêutico acabado, vários protocolos relacionados à extração do produto; garantia de estabilidade das propriedades farmacológicas; estudos *in vitro*, são necessários para que esse produto seja entregue e usado com maior segurança (Akkari et al., 2016).

Os sistemas de administração de medicamentos oromucosos têm recebido crescente interesse nos últimos anos (Botelho et al., 2019; Mirzaee et al., 2019 Ruppel, et al., 2019; Singh et al., 2019), pois oferecem várias vantagens sobre os comprimidos ou formulações líquidas, uma vez que esses sistemas não precisam ser engolidos; isso resulta em um aumento na adesão do paciente, especialmente no campo pediátrico e em pacientes com distúrbios da deglutição (Parodi et al., 2017)

Dentre os desafios no desenvolvimento de formulações de aplicação tópica intra-oral está o tempo de retenção local do fármaco, devido ação dos movimentos mecânicos da língua, da bochecha, deglutição e saliva, necessitando de repetidas administrações. Os sistemas mucoadesivos surgem como alternativa para que permaneçam em contato com as mucosas durante mais tempo e liberando o fármaco no local da ação, aumentando sua biodisponibilidade (Botelho et al., 2019).

Pensando nisso, dentre as diversas formas farmacêuticas existentes para veicular ativos, foi escolhida uma pomada utilizando um gel com polímero mucoadesivo assim como analisar sua estabilidade ao longo do tempo. Os polímeros sintéticos são comumente mais usados que polímeros naturais, dentre eles o carbômero (Carbopol®) por suas propriedades físicas e reológicas, além de não apresentar problemas de irritação (Jain et al., 2016).

Além do polímero e do alcaloide utilizado como princípio ativo a formulação possui outros componentes que também são essenciais, os excipientes que em muitas formulações estão em concentrações superiores às do ativo, como é o caso da formulação em questão e contribuem significativamente na funcionalidade e processamento da formulação, oferecendo características necessárias à forma farmacêutica (Amaral et al., 2016; Toller; & Schimdt, 2016).

O conservante foi escolhido a partir de um levantamento daqueles mais utilizados no mercado em formulações semissólidas e dentre os mais indicados pela literatura (Manoharan; & Mohamed, 2019; Wu, et al., 2019; Gerber et al., 2015). Os parabenos (metilparabeno e propilparabeno) são utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos desde a década de 1920. Os parabenos são antimicrobianos de largo espectro, hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros. Com tais características, são largamente empregados na formulação de fármacos. As concentrações de parabenos nos medicamentos são variáveis, porém dificilmente excedem 1%. A concentração usual é de 0,1% para o metilparabeno (Fernandes et al, 2013; Balbani et al., 2006).

Como agente plastificante optou-se por utilizar a glicerina, já que muitos estudos realizados com o Carbopol® utilizam a Glicerina, pois ela pode modificar as características de pontes de hidrogênio entre o polímero e a água, facilitando a

mobilidade e a viscosidade da cadeia polimérica, e ainda aumentando o espaço entre as cadeias poliméricas, atribuída à formação de ligações de hidrogênio entre o polímero e a glicerina devido ao efeito doador da glicerina (Hamed et al., 2016; Almeida et al. 2014; Islam, 2004). Segundo Contreras e et al. (2001), existe uma relação direta entre a concentração da glicerina e a elasticidade do polímero, e isso se dá devido à formação de pontes de hidrogênio entre os polímeros e glicerina, demonstrado no estudo apenas quando o Carbopol® estava a concentração superior a 1%.

A combinação de vaselina e lanolina resulta em uma mistura de excipientes hidrofóbicos, oleosos e aquosos, promovendo ao mesmo tempo um efeito oclusivo (vaselina) e atividade endodérmica (lanolina) para penetrar na pele, melhorando a absorção dos princípios ativos nas camadas mais profundas dos tecidos, mas sem atingir a corrente sanguínea (Rizzi et al., 2017).

Após análise das leituras de pH observou-se que a formulação com até 30 dias sofreu pequenas mudanças, que não foram significativas, o que não compromete a estabilidade e o uso do produto, pois os valores de pH ficaram entre 6,27 e 6,33, que são compatíveis com o pH da mucosa oral (Loke, C., et al., 2016). No entanto, as variações após essas mudanças foram significativas, indicando que ocorreu a degradação de qualquer componente do produto (Figueiredo et al., 2014).

O teste de estabilidade representa um estágio crucial no desenvolvimento e avaliação de medicamentos uma vez que a instabilidade de uma formulação ou preparação farmacêutica modifica requisitos essenciais como qualidade, segurança e eficácia (Pinheiro et al., 2019). Nos resultados de centrifugação no primeiro teste foi possível observar que o sistema permaneceu sem alterações estabilidade, pois não ocorreu separação de fases. De acordo Pinheiro et al. (2019) a ausência de sinais de instabilidade na formulação não garante estabilidade, mas apenas indica que o produto pode ser submetido, sem reformulação, a outras condições de estresse, como o ciclo de congelamento e descongelamento.

A formulação foi submetida a condições extremas de temperatura e posterior centrifugação, a fim de acelerar possíveis processos de instabilidade na formulação, nesse caso ocorreu leve separação de fases indicando que ocorreu alguma instabilidade nas condições extrema. Entretanto, tais alterações já eram esperadas, visto que temperaturas elevadas apresentam relação direta com a velocidade de decomposição dos componentes da formulação. Este fenômeno pode ser comparado a Lis et al. (2020) que, no estudo da estabilidade físico-química de um gel contendo cafeína, também verificou alterações nas características organolépticas das amostras preparadas com carbopol, quando estas foram submetidas a condições drásticas de armazenamento, indicando uma necessidade de alterações na formulação base a fim de aumentar o tempo de prateleira.

Este teste de estresse térmico, empregando diferentes temperaturas, possibilita condição de estresse sobre as amostras para antever possíveis modificações no sistema, que possa provocar instabilidade nas formulações, desta forma é considerado um teste de estabilidade físico-químico rápido. Através destes testes avalia-se um conjunto de diferentes condições reais de manuseio, transporte e estocagem do produto (Brasil, 2004).

A verificação da homogeneidade e das características organolépticas (cor e odor) de um produto nos dá uma indicação de possíveis alterações físico-químicas que podem estar ocorrendo, apesar destas características serem subjetivas, através dos sentidos sensoriais que permitem com razoável facilidade a identificação da perda da estabilidade física do produto (Lis et al., 2020; Ferreira et al., 2014). Além de serem relevantes para a adesão do paciente ao tratamento. O reflexo nauseoso provocado por um gosto ou cheiro que provoque repugnância pode diminuir a aceitação ou continuidade do tratamento, sendo flavorizante de menta uma alternativa para mascarar o sabor amargo do alcaloide.

Nos estudos de liberação *in vitro*, os parâmetros devem ser escolhidos com critério, simulando as condições *in vivo*. É necessária a escolha da membrana sintética adequada, a manutenção da temperatura próxima à fisiológica (37°C), a agitação constante do fluido receptor e a escolha do fluido receptor ideal, considerando-se o pH. Neste ensaio foi empregada uma membrana sintética de acetato de celulose, pois não reage com a formulação ou o meio receptor, é permeável ao fármaco e não é

determinante da taxa de liberação, além da simulação de possíveis movimentos na boca utilizando uma rotação de 100rpm e pH semelhante ao encontrado na mucosa oral (Marafon et al., 2016)

No trabalho de Rodrigues et al. (2019) analisando nanopartículas poliméricas contendo EPI demonstrou que EPI tem um perfil de liberação lenta e gradual, com o equilíbrio ocorrendo após cerca de 6 horas de liberação. Dados muito semelhantes com o encontrados nesse estudo, assim como no trabalho de Lima et al., 2018 que utilizou o mesmo alcaloide, mas na forma de nanoformulações autoemulsificante, onde EPI é liberada controladamente em função do tempo, originando uma curva de crescimento da concentração EPI.

Inúmeros modelos matemáticos de liberação de drogas foram descritos na literatura neste trabalho foram aplicados os de ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas mostrado na Tabela 1. Com base no R^2 o que melhor se ajustou foi o de o modelo de Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer et al., 1983), um modelo que correlaciona a liberação do fármaco em função do tempo por uma equação exponencial simples tem sido usado para avaliar a liberação de fármacos de dispositivos poliméricos de liberação controlada, especialmente quando o mecanismo de liberação do fármaco não é conhecido ou quando existe mais que um mecanismo envolvido. O modelo é baseado na lei do poder. Na equação, o expoente "n" é um parâmetro que varia de acordo com a geometria do sistema e determina o mecanismo de liberação. Se "n" for menor ou igual a 0,5, o mecanismo é considerado difusão fickiana, enquanto que se estiver entre 0,5 e 1, está ocorrendo difusão não fickiana. (Rodrigues et al., 2019; Ghosh et al., 2018).

Os resultados do estudo mostraram valores de n de 0,14 neste caso, a liberação do fármaco é classificada como fickiana. Valores semelhantes foram encontrados no trabalho de Rodrigues et al. (2019), utilizando o mesmo alcaloide, mas em outra matriz polimérica com valor de "n" de 0,37 para a liberação de EPI, sugerindo também que a transferência de massa segue o modelo de difusão de Fickiana.

O perfil de liberação *in vitro* foi adequado para sistema proposto, pois o princípio ativo foi liberado em concentrações e tempo pertinentes com o uso proposto. Uma próxima etapa do trabalho avaliará a retenção e permeação do sistema desenvolvido, utilizando membranas biológicas provenientes de orelha de porco.

4. Conclusão

O presente trabalho buscou desenvolver e avaliar a estabilidade de uma formulação contendo EPI como princípio ativo com objetivo de desenvolver produtos a partir da flora brasileira e aumentando o beneficiamento do jaborandi que é altamente explorado. Assim, tendo em vista sua atividade anti-inflamatória já estabelecida, a EPI pode representar uma promissora alternativa, por oferecer ação terapêuticas para processos inflamatórios exacerbados, em especial em regiões de mucosa, dando destaque à mucosite oral, um dos efeitos colaterais da quimioterapia antitumoral, pois não existe terapêutica disponível acessível e de baixo custo.

Os resultados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de formulações mais estáveis, sugerindo novas pesquisas de reformulação e que possam elucidar os tempos exatos de alterações dos parâmetros, tais como agentes utilizados como excipientes ou concentrações utilizadas, a fim de garantir uma formulação estável que apresente qualidade, segurança e eficácia do produto quando utilizado pela população.

O desenvolvimento de uma formulação estável deve ser baseado neste estudo com o intuito de estabelecer potenciais componentes que apresentem instabilidade para a formulação. Dessa forma, sugerimos a revisão específica de cada componentes para estabelecer potenciais interações, as quais poderiam justificar a alteração dos elementos ou até mesmo a ordem da construção da própria formulação.

Referências

- Agrawal, A., Kumar, A., & Gide, P. (2015). Toxicity Study of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System Containing N-methyl pyrrolidone. *Drug Research*, 65(08), 446–448. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1389985>
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2010). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Campelo, Y. D. M., Campelo, V. M. B., Rocha, R. S., Santos, P. M., & Leite, J. R. S. A. (2017). *O uso Combinado entre o alcaloide epiisopiloturina e o praziquantel como alternativa no tratamento da esquistossomose | Galoá Proceedings*. (n.d.). Proceedings.science. Retrieved February 26, 2023, from <https://proceedings.science/medtrop/trabalhos/o-uso-combinado-entre-o-alcaloide-epiisopiloturina-e-o-praziquantel-como-alterna>
- Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora. (n.d.). cncflora.jbrj.gov.br website: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/pilocarpus>
- Corrêa, U. C. (2011) *Rev. Bras. Cienc. Esporte*, 22(2), 69-83.
- de Moraes, J., Carvalho, A. A. L., Nakano, E., de Almeida, A. A. C., Marques, T. H. da C., Andrade, L. N., de Freitas, R. M., & de Sousa, D. P. (2013). Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 112(2), 603–610. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3172-7>
- Dwivedi, P., Khatik, R., Khandelwal, K., Srivastava, R., Taneja, I., Rama Raju, K. S., Dwivedi, H., Shukla, P., Gupta, P., Singh, S., Tripathi, R., Paliwal, S. K., Wahajuddin, W., Dwivedi, A. K., & Mishra, P. R. (2014). Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of arteether: pharmacokinetics, toxicity and antimalarial activity in mice. *RSC Adv.*, 4(110), 64905–64918. <https://doi.org/10.1039/c4ra09267h>
- Facina, T. (2011). Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 57(4), 557. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2011v57n4.1438>
- Figueiredo, J. (2009). *Nanomedicina: ficção ou realidade*. Rio Grande do Sul, RS.
- Freitas, E. de. (2019). *Principais Minérios Brasileiros*. São Paulo, SP.
- Grabher, C., & Alegre, P. (2015). *Universidade federal do rio grande do sul faculdade de ciências econômicas programa de pós-graduação em desenvolvimento rural a governança e a sustentabilidade do extrativismo do JABORANDI na AMAZÔNIA e transição para o cerrado e a caatinga*. <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/132942/000982840.pdf?sequence=1>
- Guimarães, M. A., Campelo, Y. D. M., Vêras, L. M. C., Colhone, M. C., Lima, D. F., Ciancaglini, P., Kuckelhaus, S. S., Lima, F. C. A., de Moraes, J., & Leite, J. R. S. A. (2014). Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and in vitro schistosomicidal activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(6), 4519–4528. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8248>
- Guimarães, M. A., de Oliveira, R. N., Vêras, L. M. C., Lima, D. F., Campelo, Y. D. M., Campos, S. A., Kuckelhaus, S. A. S., Pinto, P. L. S., Eaton, P., Mafud, A. C., Mascarenhas, Y. P., Allegretti, S. M., de Moraes, J., Lolić, A., Verbić, T., & Leite, J. R. S. A. (2015). Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003656>
- Oliveira, C. S. A., Lameira, O. A., Ribeiro, F. N. S., Rocha, T. T., & Assis, R. M. A. D. (2016). Fenologia e prospecção fitoquímica do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(2 suppl 1), 621–627. https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_159
- Paracampo, N. E. N. P. (2009) *Prospecção fitoquímica de plantas medicinais*. Embrapa Amazônia Oriental. 13p.
- Vegeflora, Plano de manejo florestal comunitário: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardi. Parnaíba, vegeflora, 2010. 71 p.
- Vêras, L. M. C., et al. (2013) Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. *PLoS One*, 8(6).
- Weiss, B. & Lameira, O. (2011) A experiência promissora do Projeto Jaborandi: parceria que promove Manejo, Conservação e Fortalecimento da Atividade Extrativista na Flora de Carajás. Vale; Vegeflora; Yaborand'i; GIZ; ICMBio; MMA.
- Yang, B., Lin, J., Chen, Y., & Liu, Y. (2009). Artemether/hydroxypropyl-β-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(17), 6311–6317. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.07.060>
- Yin, R. K. (2015). Estudo de Caso - 5.Ed.: Planejamento e Métodos. In *Google Books*. Bookman Editora. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=EtOyBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=YIN>
- Zhu, Y., Ye, J., & Zhang, Q. (2020). Self-emulsifying Drug Delivery System Improve Oral Bioavailability: Role of Excipients and Physico-chemical Characterization. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 8(4), 290–301. <https://doi.org/10.2174/2211738508666200811104240>