

## ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE PROGESTERONA A PARTIR DE MATRIZES DE COLÁGENO ANIÔNICO

Valcinir Aloísio Scalla Vulcani<sup>1</sup>, Ana Maria de Guzzi Plepis<sup>2</sup>

### RESUMO

Foram obtidas matrizes de colágeno aniônico para serem submetidas a ensaios de liberação *in vitro* de progesterona em tampão fosfato (PBS), a fim de se avaliar sua potencialidade de aplicação em medicina veterinária, especificamente na sincronização do ciclo estral de fêmeas economicamente exploráveis. As matrizes foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho; estabilidade térmica; capacidade de hidratação por tampão PBS; microscopia eletrônica de varredura e estabilidade biológica. Observou-se que a presença de progesterona nas matrizes de colágeno não alterou a capacidade de hidratação por tampão, aumentou a resistência frente à degradação enzimática e diminuiu a temperatura de degradação do colágeno. Os ensaios de liberação mostraram que a incorporação a 5% (m/m) liberam mais rapidamente que a incorporação a 10%, sugerindo a dispersão do hormônio nas matrizes colagênicas, segundo uma cinética de liberação de primeira ordem e perfil de difusão anômala. Os resultados obtidos apontaram que o colágeno é um biopolímero promissor para o desenvolvimento de matrizes de liberação de progesterona.

**Palavras-chave:** Colágeno, progesterona, liberação controlada, sincronização, ciclo estral.

### INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos são mecanismos nos quais o agente ativo é liberado da matriz de suporte, independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida (RHOTEN-WEINHOLD et al, 2000). Em

comparação com os métodos tradicionais de administração de fármacos podem ser listadas algumas vantagens como manutenção de concentrações constantes da substância no organismo; diminuição de efeitos colaterais sistêmicos dose dependentes; liberação e concentração do agente no sítio de ação; redução das manipulações excessivas dos pacientes; aumento da segurança do administrador do fármaco e garantia da não interrupção de tratamentos (MEDLICOTT, et al, 2004; SENEL; MCCLURE, 2004).

Esses fatores têm direcionado a indústria farmacêutica veterinária a mobilizar esforços para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação de antibióticos, antiparasitários, quimioterápicos, anestésicos, antiinflamatórios, vacinas, promotores de crescimento, esteróides para sincronização de ciclo estral, entre outros (WINZENBURG et al, 2004). Dentre os hormônios esteróides, a progesterona tem despertado grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para sincronização do ciclo estral das fêmeas, pois ocorre nos organismos em altas concentrações e seus análogos não são tóxicos (RATHBONE et al, 2001).

No entanto, a aceitação dos produtos disponíveis comercialmente para a liberação de progesterona é considerada baixa, em virtude, principalmente, das matrizes que suportam o hormônio não serem degradáveis e exigirem que sejam retiradas dos animais. Outros motivos relatados com matrizes de poliuretano e silicone são a baixa retenção vaginal dos pessários, infecção uterina ascendente e reações inflamatórias locais (ROBINSON, 1965; BENITES, 1996; WINZENBURG et al., 2004).

A tendência para o aprimoramento das matrizes contendo progesterona é a utilização de materiais que sejam biodegradáveis, biocompa-

<sup>1</sup> Médico Veterinário. Mestre. Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC – USP. aloisiosv@hotmail.com

<sup>2</sup> Química. Professora Assistente Doutora. Dep. de Química e Física Molecular. Instituto de Química de São Carlos – USP

tíveis, reprodutíveis e viáveis economicamente. Rathbone et al. (2002) propuseram a elaboração de matrizes biodegradáveis de lactato e caprolactona para a liberação controlada de progesterona e estradiol e verificaram sua eficácia para liberações em longo prazo. Senel; McClure (2004) utilizaram microesferas de quitosana e mostraram ser um material promissor devido à baixa toxicidade e à facilidade de controle da degradação e liberação.

Outra alternativa viável para a confecção de matrizes biodegradáveis é o colágeno, um biopolímero de alta resistência elástica, degradável à collagenase e abundantemente presente nos organismos animais (BLUM; RUGGIERO, 2005). Dentre outras técnicas é possível obter matrizes de colágeno carregadas negativamente (matrizes aniônicas), a partir de tecidos animais através da hidrólise seletiva dos grupos amida das cadeias laterais dos resíduos de asparaginas e glutamina da proteína (GOISSIS et al, 1994).

O objetivo deste trabalho foi obter, preparar e caracterizar matrizes de colágeno aniônico contendo progesterona nas proporções de 5% e 10% (m/m) e estudar a cinética de liberação *in vitro* do hormônio, para avaliar seu potencial de aplicação em medicina veterinária, principalmente para a sincronização do ciclo estral de fêmeas economicamente exploráveis.

## MATERIAL E MÉTODOS

O colágeno foi obtido a partir de serosa intestinal porcina tratada com solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) 6% em meio fortemente alcalino (pH 13) por um período de 24 horas (GOISSIS et al, 1994). Após a remoção completa do excesso de sais por lavagens sucessivas em solução fisiológica, o colágeno foi extraído em uma solução de ácido acético pH 3,5 e sua concentração foi determinada por liofilização<sup>a</sup>.

Para a confecção das matrizes, o gel de colágeno foi colocado em um molde quadrado de poliestireno de 5cm de lado e 0,5cm de profundidade e submetido ao congelamento gradativo (refrigerador por 10 horas e freezer por 14 horas) e liofilizado. As matrizes de colágeno contendo progesterona foram preparadas pela mistura manual

do colágeno com a progesterona<sup>b</sup> nas proporções 5% (CP5) e 10% (CP10) sobre a quantidade de colágeno (m/m) e em seguida liofilizada.

As matrizes colagênicas foram caracterizadas por: 1- espectroscopia<sup>c</sup> na região do Infravermelho (região de 400 à 4000cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>); 2- testes de estabilidade térmica<sup>d</sup>; 3- Hidratação por Tampão Fosfato (PBS); 4- Microscopia Eletrônica de Varredura<sup>e</sup>; 5- Estabilidade Biológica – Utilizando-se collagenase de origem bacteriana<sup>f</sup> (2 UI de enzima para cada 1 mg de colágeno), cuja solução foi preparada com tampão tris-HCl 100mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, contendo 25 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio.

Utilizou-se para os estudos de liberação uma câmara acrílica transparente contendo 200mL de tampão fosfato salino, onde as amostras das matrizes CP5 e CP10 foram inseridas em um compartimento plástico com poros, mantido submerso por pérolas de vidro e sob agitação constante. Posteriormente, alíquotas de 2mL foram retiradas em períodos de tempo pré-determinados e o volume removido foi imediatamente repostado com tampão. A determinação da concentração de progesterona liberada na solução foi feita por espectroscopia no ultravioleta (UV), em 247 nm. A quantidade de progesterona liberada foi determinada pela curva de calibração de progesterona em tampão fosfato salino (PBS). Obteve-se a equação da reta: = 0,01693 + 0,04693X, R= 0,9983, para N= 7. Determinou-se a cinética de liberação através da equação 1 (RITGER; PEPPAS, 1987a):

$$M_t/M_0 = kt^n \text{ equação 1}$$

sendo:  $M_t/M_0$  = massa liberada no tempo t  
 K = constante de liberação característica do sistema  
 T = tempo  
 n = expoente que caracteriza o mecanismo cinético de liberação por difusão

## RESULTADOS

A concentração de colágeno obtida por liofilização foi de 1,13 ± 0,05% (m/m).

A Figura 1 compara os espectros no infraver-

<sup>a</sup> Liofilizador modelo DRYER modulyo (EDWARDS) – IQSC – USP

<sup>b</sup> Progesterona micronizada (99% de pureza) chinesa, importada por Viafarma Importadora Ltda, lote 030109

<sup>c</sup> Espectrofotômetro Bomem ND-120 (FTIR) – IQSC – USP

<sup>d</sup> TA Instruments, acoplado aos módulos DSC-2010 e TGA – 2050 – IQSC – USP

<sup>e</sup> Microscópio eletrônico de varredura marca ZEISS, modelo DSM 960 – IQSC – USP

<sup>f</sup> Collagenase de origem bacteriana – Sigma tipo V – 435 unidades mg<sup>-1</sup>

melho do colágeno, da progesterona e do colágeno contendo 10% de progesterona. No espectro do colágeno destacam-se os picos  $1235\text{cm}^{-1}$  e  $1450\text{cm}^{-1}$ . No espectro da progesterona observam-se os picos

$1200\text{cm}^{-1}$  e  $1700\text{cm}^{-1}$ . No espectro do colágeno contendo 10% de progesterona notam-se os picos característicos do colágeno,  $1235\text{cm}^{-1}$  e  $1450\text{cm}^{-1}$  e a sobreposição de picos em torno de  $1650\text{cm}^{-1}$ .

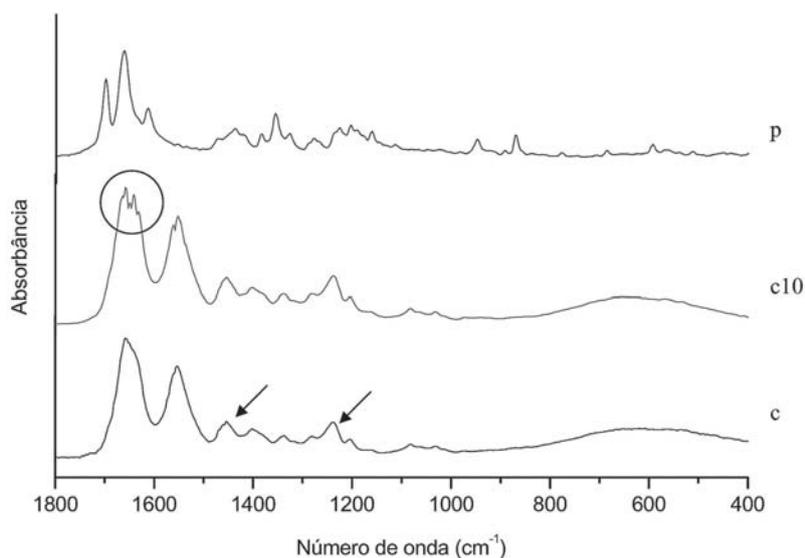


Figura 1. Espectro de absorção no infravermelho para membrana de colágeno(c), colágeno contendo 10% de progesterona (c10) e progesterona (p). As setas mostram as bandas  $1235,0\text{cm}^{-1}$  e  $1450,0\text{cm}^{-1}$ . Na curva relativa à amostra c10, observa-se em destaque os valores entre as bandas  $1630\text{cm}^{-1}$  a  $1670\text{cm}^{-1}$ .

A Figura 2 mostra as curvas da análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) obtidas para os materiais em estudo. A curva da progesterona exibe o pico de fusão em  $132^{\circ}\text{C}$  e o pico de decomposição em torno de  $330^{\circ}\text{C}$ . Para as curvas relativas às matrizes, observa-se um deslocamento do pico relativo à perda de água no

material ( $85\text{-}110^{\circ}\text{C}$ ).

Nos ensaios de hidratação por tampão PBS observou-se que, a partir de 15 minutos de exposição nas amostras contendo ou não progesterona, a porcentagem de hidratação já ultrapassava pouco mais de 80%, não havendo diferença entre as amostras até o final do experimento (72 h).

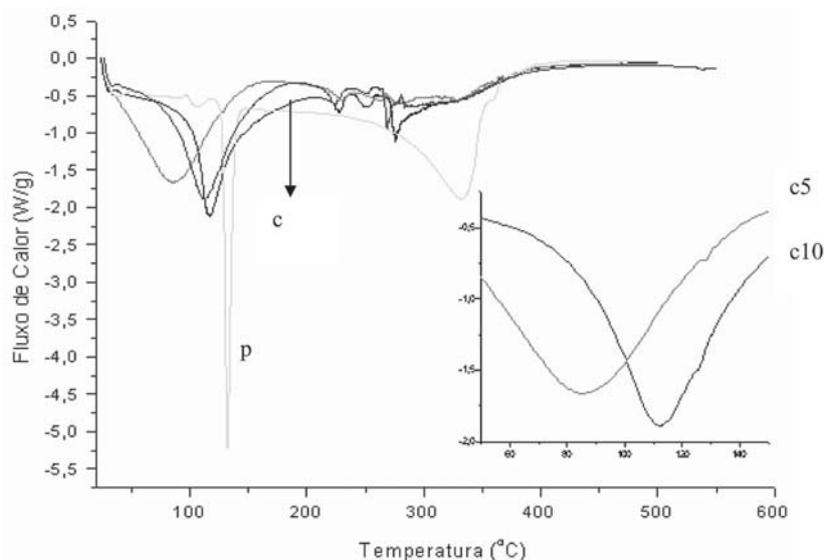


Figura 2. Curvas DSC para Colágeno 24h (c), progesterona (p), colágeno contendo 5% de progesterona (c5) e colágeno contendo 10% de progesterona (c10) em  $\text{N}_2$  (vazão:  $90\text{mL min}^{-1}$ ),  $b = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Detalhe para visualização das curvas para as amostras c5 e c10.

### Microscopia Eletrônica de Varredura

Na microscopia eletrônica de varredura Figura 3a, correspondente ao aumento de 100 X da matriz de colágeno observou-se uma superfície compacta, diferente da estrutura colagênica típica que se caracteriza pela presença abundante de fibras e poros. Com melhor resolução notou-se

(Figura 3b) detalhe das fibras colagênicas e dos poros, raramente presentes no material. Na Figura 3c, correspondente à superfície da matriz de colágeno contendo 10% de progesterona em aumento de 500 X, presenciou-se a ausência de fibras e pouca porosidade do colágeno e cristais de progesterona por toda a extensão da fotomicrografia.

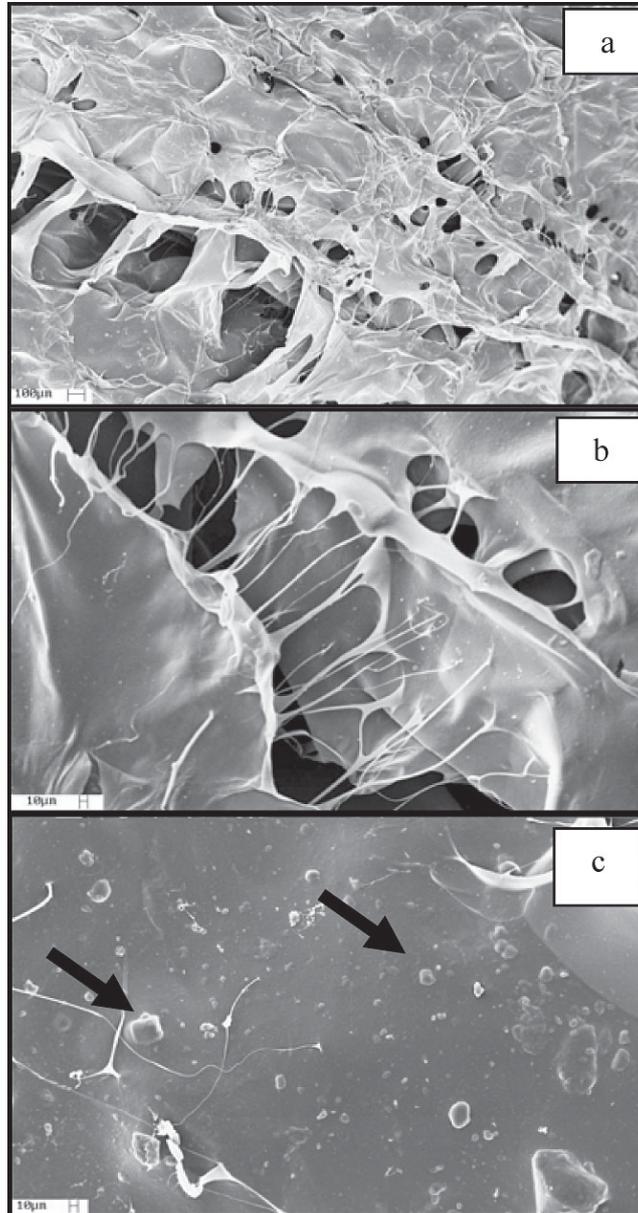


Figura 3. Fotomicrografias da matriz de colágeno em aumento de 100 vezes (a), 500 vezes (b) e matriz de colágeno contendo 10% de progesterona, aumento de 500 vezes (c). Cristais de progesterona indicados pelas setas.

Na verificação da estabilidade biológica observou-se nas primeiras 6h de degradação biológica que as matrizes apresentaram perdas de

massa semelhante. A partir de 12h, as matrizes de colágeno começaram a notar perda de massa cerca de 50% maior que a perda das matrizes de colágeno

contendo progesterona. Após 48 horas de exposição, observou-se a tendência ao equilíbrio e a diferença entre as matrizes de colágeno e as matrizes de colágeno contendo progesterona começou a diminuir para cerca de 10% (m/m). Ao final do ensaio (72h) notou-se que as matrizes de

colágeno tiveram perda de aproximadamente 80% da sua massa, enquanto que as matrizes colagênicas contendo progesterona tiveram perda de aproximadamente 70% de massa, não havendo diferença significativa na degradação das matrizes contendo 5 e 10% de progesterona

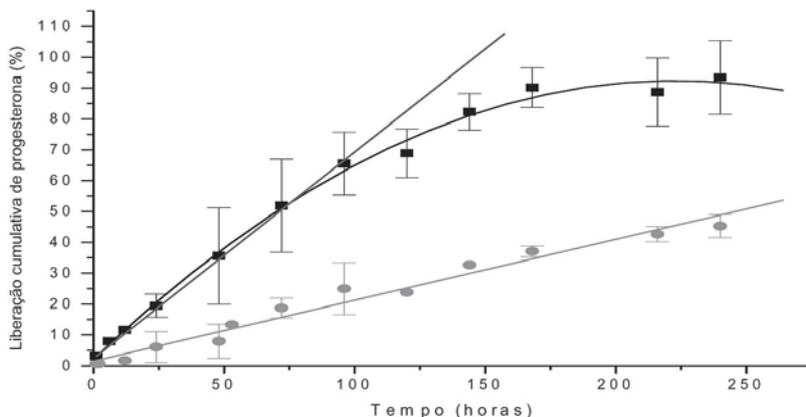


Figura 4. Liberação cumulativa (%) *in vitro* de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% (■) e 10% (●). Linearidade em 60% da liberação (—).

### Ensaio de liberação *in vitro* de progesterona

A curva de liberação cumulativa *in vitro* de progesterona suportada em matriz de colágeno aniônico é mostrada na Figura 4. A liberação de progesterona das matrizes com maior concentração (10%) foi mais lenta em comparação à liberação das matrizes contendo 5% do hormônio. Em 10 dias de liberação, cerca de 90% da progesterona foi liberada pelas amostras CP5, enquanto cerca

de 50% foi liberada pelas amostras CP10 no mesmo período. Notou-se, também, que a curva de liberação das amostras contendo 5% de progesterona mostra linearidade no início da curva, sugerindo se tratar de um sistema de liberação de primeira ordem.

A Figura 5 mostra as curvas  $\ln M_t/M_0$  versus  $\ln$  tempo de liberação de progesterona suportada em colágeno aniônico, para concentrações iniciais de hormônio de 5% e 10% (m/m).

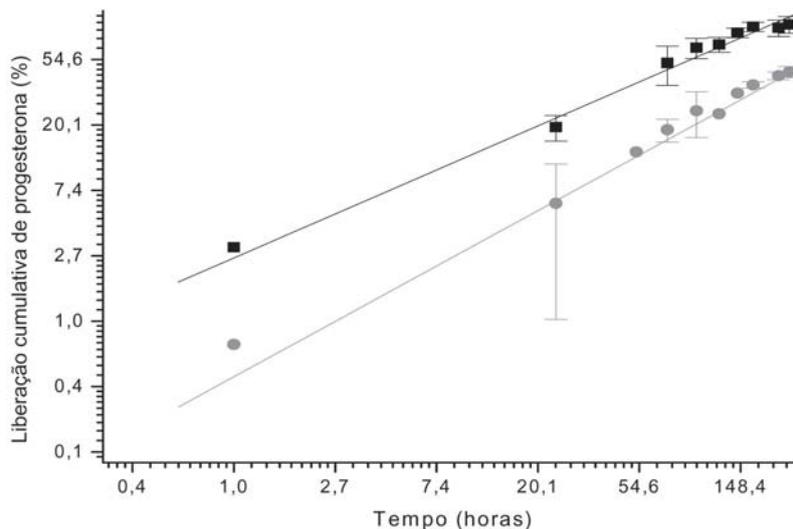


Figura 5. Liberação cumulativa (%) *in vitro* de progesterona suportada em matrizes de colágeno, nas proporções de 5% (■) e 10% (●).

Utilizando-se da equação 1 para verificar o perfil de liberação de progesterona a partir das matrizes de colágeno aniônico, obteve-se os valores de  $n$ , correspondentes à porção inicial das curvas ( $M_t/M_0$  d" 60%). Os valores obtidos para CP5 e CP10 foram 0,65 e 0,83, respectivamente. Os coeficientes de correlação foram 0,9954 e 0,9913 para as liberações de 5% e 10%, respectivamente. Os valores obtidos para as constantes de liberação foram 11,75 para a liberação de 5% e 5,61 para a liberação de 10%.

## DISCUSSÃO

O valor da concentração do colágeno obtido por liofilização (1,13) corresponde aos valores médios obtidos para este tipo de matéria prima, demonstrando que o processo químico é satisfatório para extração do colágeno (OGAWA, 2002).

A espectroscopia na região do infravermelho revelou para a amostra de colágeno os picos característicos  $1235\text{cm}^{-1}$  e  $1450\text{cm}^{-1}$ , cuja razão resulta em 0,851, mostrando a preservação da estrutura em tripla hélice (GORDON, 1974). Isto demonstra que o tratamento alcalino para obtenção do colágeno não altera sua característica estrutural, mantendo, conseqüentemente, as características físicas de resistência, degradação, entre outras. Os picos de destaque no espectro da progesterona ( $1200\text{cm}^{-1}$  e  $1700\text{cm}^{-1}$ ) caracterizam a estrutura molecular do hormônio, servindo como parâmetro para verificar sua presença nas matrizes colagênicas contendo progesterona. No espectro do colágeno contendo 10% de progesterona, notam-se os picos característicos do colágeno e o pico característico da progesterona (em torno de  $1650\text{cm}^{-1}$ ), apesar da sobreposição dos espectros do colágeno e da progesterona, sugerindo a presença do hormônio na amostra.

Nas curvas DSC, o aparecimento do pico de fusão da progesterona ( $132^\circ\text{C}$ ) confirma a presença do hormônio nas matrizes, assim como reafirma a manutenção da estrutura tripla hélice do colágeno pela pequena transição próxima de  $50^\circ\text{C}$  (desnaturação do colágeno).

Os ensaios de hidratação por tampão PBS demonstraram que diferentes concentrações de progesterona (5% e 10%) nas matrizes não alteraram a capacidade de hidratação, o que deve ser considerado como fator de não interferência na alteração do modelo de liberação do hormônio nas duas concentrações propostas.

A microscopia eletrônica de varredura demonstrou uma estrutura amorfa do colágeno, fato

que pode ser atribuído à repulsão eletrostática das moléculas de tropocolágeno, em função da protonação dos grupos carboxilato. Dessa forma, o tratamento alcalino utilizado para a preparação do colágeno 24 horas, com a conseqüente introdução de cargas negativas impede o tropocolágeno de organizar-se em microfibrilas.

A microscopia permitiu também, a visualização de cristais de progesterona na superfície do colágeno, comprovando a presença do hormônio como verificado por espectroscopia na região do infravermelho e nos testes de estabilidade térmica.

Os ensaios de degradação biológica por colagenase mostraram que as diferenças de concentração do hormônio nas matrizes não interferiram de forma significativa na degradação do colágeno. Deve-se levar em consideração que diferenças na degradação podem interferir no mecanismo de liberação, alterando bruscamente a saída do fármaco das matrizes.

A diversidade encontrada na liberação de progesterona em concentrações diferentes, ou seja, a maior concentração (10%) liberando de forma mais lenta corresponde ao observado em trabalho publicado por (CORNETTE; DUNCAN, 1987), no qual se estudou a liberação de estradiol em implantes de geometria cilíndrica com várias concentrações do esteróide disperso. Tratava-se de um sistema monolítico simples e chegou-se à conclusão de que, para um agente dissolvido, a quantidade liberada em um determinado tempo é independente da quantidade inicial incorporada, enquanto que para um agente disperso, a quantidade liberada em dado tempo diminui com o aumento da quantidade incorporada. Dessa forma, os resultados sugerem que a progesterona não está dissolvida no colágeno, mas dispersa, como mostrados nas fotomicrografias das matrizes contendo progesterona.

A partir do cálculo do expoente de caracterização da cinética de liberação ( $n$ ), determinou-se o modelo cinético de liberação do sistema. Quando  $n = 0,5$ , trata-se de um sistema de difusão Fickiana normal. Para  $n = 1,0$ , o sistema libera segundo uma cinética de Caso II, também denominada de não-Fickiana. E para  $0,5 < n < 1,0$ , considera-se que seja um caso de difusão anômala, ou seja, uma mistura da difusão Fickiana e da difusão não Fickiana (RITGER; PEPPAS, 1987b). Os valores encontrados para CP5 e CP10 foram 0,65 e 0,83, respectivamente, indicando que o sistema segue cinética de liberação de primeira ordem e o perfil de difusão anômala. Os resultados dos coeficientes de correlação indicam a linearidade dos dados.

## CONCLUSÕES

O método de obtenção de colágeno a partir de tecidos animais mostrou-se eficiente, mantendo as características estruturais da proteína e permitindo que o produto final seja moldado no formato desejável, seja para inserção vaginal ou implantes subcutâneos. A interação entre o colágeno e a progesterona não alterou a estrutura de ambos e permitiu a liberação *in vitro* por cerca de dez dias, elucidando o mecanismo cinético envolvido no sistema.

### In vitro release assays of progesterone from anionic collagen matrices

#### ABSTRACT

Anionic collagen matrices were prepared to be submitted to *in vitro* release assays in PBS buffer, in order to evaluate the potentialities of its application in veterinary medicine, specifically in the synchronization of the estral cycle of females economically explored. The matrices had been characterized by FT:IR; thermal stability; hydration capacity in PBS buffer; electronic microscopy and biological stability. It was observed that the presence of progesterone in the collagen matrices did not modify the hydration capacity, increased the resistance front to the enzymatic degradation and diminished the temperature of degradation of the collagen. The release assays had shown that the incorporation 5% (m/m) liberates more quickly than the incorporation 10%, suggesting the dispersion of the hormone in the collagen matrices, according to a kinetic of first order release and a profile of anomalous diffusion. Results point that the collagen is a promising biopolymer for the development of matrices of progesterone release.

**Keywords:** Collagen, progesterone, controlled release, synchronization, estral cycle.

## REFERÊNCIAS

BENITES, N. R., Medicamentos empregados para sincronização do ciclo estral e transferência de embriões. In: **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, cap.7, SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M., Guanabara Koogan, R. J., 1996.

BLUM, S. R., RUGGIERO, F. The collagen super-

family: from the extracellular matrix to the cell membrane. **Pathologie Biologie**. n.53, p. 430-442, 2005.

CORNETTE, J. C., DUNCAN, G. W. Contraceptive. In: BAKER, R., **Controlled Release of Biologically active agents**. NY, Willey – Interscience Pub. 1987. v.1, n.5, p. 339, 1987.

GORDON, P. L. The Far-infrared spectrum of collagen. **Macromolecules**, v. 7, p. 954-955, 1974.

GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G.; ROCHA, J. L. Processo de extração de colágeno em tecidos animais com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino. BR. PI 9.405.043-0, 1994.

MEDLICOTT, N. J.; WALDRON, N. A.; FOSTER, T. P. Sustained release veterinary parenteral products. **Adv. Drug Deliv. Reviews** n.56, p. 1345-1365, 2004.

OGAWA, C. A. Compósitos hidroxiapatita:colágeno. **Preparação, caracterização e estudos em liberação controlada com ciprofloxacina**. – São Carlos: Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2002. 86p. Tese (Doutorado Química Analítica).

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Adv. Drug Deliv. Reviews**., v. 50, p. 277-320, 2001.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Development of an injection molded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) intravaginal insert for delivery of progesterone to cattle. **J. of Controlled Release** v. 85 p. 61-71, 2002.

RHOTEN-WEINHOLD, A., DHAN, M., GURNY, R. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **J. of Controlled Release**, v. 3, n.7, p. 222 - 231, 2000.

ROBINSON, T. J. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. **Nature**, v. 206, n. 4979, p. 39-41, 1965.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation

for description of solute release. I. Fickian and non Fickian release from non-swelable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or disks. **J. of Controlled Release**, v. 5, p. 23-26, 1987a.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swelable devices. **J. of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987b.

SENEL, S., MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Adv. Drug Deliv. Reviews** v. 56, p.1467 – 1480, 2004.

WINZENBURG, G., SCHMID, C., FUCHS, S., KISSEL, T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Reviews** v. 56 p. 1453-1466, 2004.