



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO



**Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação
modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e
metronidazol para tratamento da periodontite**

Amanda Cristina Funari Silva

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Amanda Cristina Funari Silva

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Ribeirão Preto

2022

Amanda Cristina Funari Silva

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana T.M.C. Vicentini

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/05/2022. A versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

<p>SILVA, AMANDA C. F.</p>	<p>Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite</p>		<p>DOUTORADO FCFRP-USP 2022</p>
--------------------------------	---	--	---

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Amanda Cristina Funari.

Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

93p.; 30cm.

Orientador: de Freitas, Osvaldo

Co-orientadora: Vicentini, Fabiana T.M.C.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

1. Metronidazol. 2. Periodontite. 3. Metaloproteinases (MMP). 4. Doxiciclina 5. Filme polimérico. 6. Inibição MMP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Amanda Cristina Funari Silva

Título do trabalho: Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana T.M.C. Vicentini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço ao professor Osvaldo, pelo acolhimento e generosidade em dividir conosco seus pensamentos e conhecimentos. Ser sua aluna é um privilégio. À Profa. Fabiana, pela confiança depositada em mim, sem ao menos me conhecer. À Maíra, pela relação de amizade que construímos que está muito além da relação profissional que compartilhamos no decorrer dos últimos anos. Aos amigos de laboratório pela boa convivência, em especial à Ana Clara. À minha família e amigos, pela presença e compreensão compartilhados no dia a dia.

RESUMO

SILVA, A. C. F Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite. 93p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória de ordem multifatorial e resultado da ação de microrganismos do biofilme dental, com a instalação de bactérias gram-negativas patogênicas, como por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*. Na ausência de diagnóstico e tratamento adequado, pode haver formação de um sulco, denominado bolsa periodontal. Nesse caso, a resposta imunológica promove ativação de mediadores que levarão ao recrutamento de leucócitos, interleucinas e metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), que devido à sua atividade proteolítica são responsáveis por degradar o tecido conjuntivo e induzir a reabsorção óssea, levando a mobilidade do dente. O tratamento atual consiste em procedimentos de raspagem e alisamento radicular, associados a antibióticos de uso sistêmico, metronidazol (MDZ), por exemplo. A doxiciclina (DOX), um fármaco antimicrobiano da classe das tetraciclina, é considerada inibidora das MMPs, e é aprovada para uso clínico em dose subantimicrobiana, por via oral para a periodontite nos EUA. Dessa forma, nesse trabalho foi desenvolvido e caracterizado sistema filmógeno (SFC) com liberação modificada e aplicação bucal, intrabolsa periodontal, com o intuito de favorecer o tratamento da doença sem os inconvenientes da administração sistêmica de antibióticos, além de colaborar com a inibição das MMPs devido ao uso da DOX. O filme é composto por MDZ, em suas duas formas (base e benzoato) para modular a liberação deste fármaco, DOX, quitosana e propilenoglicol como plastificante e foi obtido pelo método de *casting*. O perfil de liberação dos fármacos *in vitro* a partir do SFC foi realizado e demonstrou a tendência de liberação dos fármacos, sendo $95,59\% \pm 4,84$ para o MDZ e $77,16\% \pm 4,97$ para a DOX ao final de 7 dias. O perfil de permeação *in vitro* também foi realizado, ao final de 7 dias teve perfil gradual e ascendente para ambos os fármacos. Análises da umidade residual foram realizadas com valores de 19,87% para o filme inerte e 31,11% para SFC. Ensaio de bioadesão foram realizados com tecido esofageal suíno e o trabalho de adesão foi de $1,906 \text{ N.mm} \pm 1,07$ para o filme inerte e $0,956 \text{ N.mm} \pm 0,92$ para SFC. A capacidade do SFC em inibir MMPs foi avaliada, via zimografia em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) copolimerizado com gelatina em três condições: concomitantemente ao estímulo de LPS para expressão de MMPs, pré-estímulo e pós estímulo e teve sua atividade constatada em inibir a atividade enzimática das MMPs, possivelmente por quelar metais importantes na atividade dessas proteinases. Análises estatísticas foram realizadas via ANOVA e pós-teste Tukey, teste t-Student também foi realizado quando pertinente.

Palavras-chave: metronidazol, periodontite, metaloproteinases (MMP), inibição MMP, doxiciclina, liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

SILVA, A. C. F Desenvolvimento de sistema filmógeno de liberação modificada contendo doxiciclina (dose subantimicrobiana) e metronidazol para tratamento da periodontite. 93p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Periodontitis is a multifactorial infectious-inflammatory disease and results of dental biofilm microorganisms' action with gram-negative bacteria proliferation, such as *Porphyromonas gingivalis*. The absence of diagnosis and appropriated treatment can favor periodontal pocket formation. The immune response promotes activation of mediators that will lead to the recruitment of leukocytes, interleukins and metalloproteinases (MMPs) from the extracellular matrix, which due to their proteolytic activity are responsible for degrading the connective tissue and inducing bone resorption, resulting in tooth mobility. The current recommended treatment is scaling and root planning procedures, associated with systemic antibiotics, for example, metronidazole (MDZ). Doxycycline (DOX), an antimicrobial drug of the tetracycline class, is considered a MMPs inhibitor for periodontitis in the USA. This study presents the development and characterization of the drug modified delivery system containing MDZ as an antimicrobial and DOX, for local action in the periodontal pocket, in order to eliminate infection, without antimicrobial oral administration inconvenient, besides of reducing degradation of macromolecules of connective tissue and minimize bone resorption. A film was developed with DOX, chitosan and an association of MDZ in its two forms, base and benzoate (BMDZ) was used to modulate the release. Propylene glycol was used as a plasticizer and the system were obtained by the casting method. The drug release profile was done and demonstrated the drug release trend, with $95.59\% \pm 4,84$ for MDZ and $77.16\% \pm 4,97$ for DOX at the end of 7 days. The *in vitro* permeation profile was performed and after 7 days, was gradual and ascending profile for both drugs. Moisture content analysis were done and was 19.87% to inert film and 31.11% to film containing all drugs. Bioadhesion assays were done with porcine tissue and the work of adhesion was $1.906\text{ N.mm} \pm 1.07$ for inert film and $0.956\text{ N.mm} \pm 0.92$ to SFC. The ability of SFC to inhibit MMPs was evaluated with polyacrylamide gel zymography (SDS-PAGE), copolymerized with gelatin under three conditions concomitantly with LPS stimulation for MMP expression, pre-stimulation and post-stimulation and DOX shows to be an inhibitor to MMPs enzymatic activity possibly because it chelates important metals to the activity of these proteinases. Statistical analysis was performed via ANOVA and Tukey post-test, t- Student test was also performed when relevant.

Keywords: metronidazole, periodontitis, metalloproteinases (MMP), MMP inhibition, doxycycline, modified drug release.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	13
2.	Objetivo	18
3.	Metodologia	Erro! Indicador não definido.
3.1	Reagentes.....	Erro! Indicador não definido.
3.2	Preparação do sistema filmógeno	Erro! Indicador não definido.
3.2.1	Preparação da dispersão de quitosana	Erro! Indicador não definido.
3.2.2	Preparação de sistema filmógeno piloto	Erro! Indicador não definido.
3.2.3	Otimização do sistema filmógeno piloto	Erro! Indicador não definido.
3.3	Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos no sistema de liberação.	Erro! Indicador não definido.
3.3.1	Quantificação dos Fármacos..	Erro! Indicador não definido.
3.3.2	Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol	Erro! Indicador não definido.
3.3.3	Quantificação do hiclato de doxiciclina	Erro! Indicador não definido.
3.3.4	Teor dos fármacos no sistema filmógeno	Erro! Indicador não definido.
3.4	Avaliação “in vitro” do comportamento dos fármacos no sistema de liberação filmógeno.....	Erro! Indicador não definido.
3.4.1	Preparação do meio receptor .	Erro! Indicador não definido.
3.4.2	Ensaio de liberação in vitro dos fármacos a partir dos filmes	Erro! Indicador não definido.
3.4.3	Ensaio de permeação dos fármacos a partir do filme	Erro! Indicador não definido.
3.5	Caracterização do sistema de liberação filmógeno	Erro! Indicador não definido.

- 3.5.1 Espessura **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5.2 Umidade residual **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5.3 Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5.4 Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5.5 Propriedades mecânicas **Erro! Indicador não definido.**
- 3.5.6 Propriedades bioadesivas **Erro! Indicador não definido.**
- 3.6 Avaliação da citotoxicidade do SFC **Erro! Indicador não definido.**
- 3.6.1 Linhagem e cultivo celular **Erro! Indicador não definido.**
- 3.6.2 Citotoxicidade **Erro! Indicador não definido.**
- 3.7 Avaliação “in vitro” do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs **Erro! Indicador não definido.**
- 3.7.1 Ensaio para determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT **Erro! Indicador não definido.**
- 3.7.2 Zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS -PAGE) utilizando gelatina como substrato para MMPs **Erro! Indicador não definido.**
- 3.7.3 Avaliação do efeito do sistema de liberação filmógeno na inibição/diminuição da expressão/atividade de MMPs **Erro! Indicador não definido.**
- 4. Resultados e Discussão **Erro! Indicador não definido.**
- 4.1 Preparação do sistema filmógeno piloto **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2 Quantificação dos Fármacos **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.1 Quantificação simultânea de metronidazol e benzoato de metronidazol e validação parcial do método analítico **Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.2 Quantificação do hidrato de doxiciclina **Erro! Indicador não definido.**

4.3 Teor dos fármacos no sistema filmógeno piloto **Erro! Indicador não definido.**

4.3.1 Metronidazol e Benzoato de Metronidazol **Erro! Indicador não definido.**

4.3.2 Hiclato de Doxiciclina **Erro! Indicador não definido.**

4.4 Avaliação "in vitro" do comportamento dos fármacos..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4.1 Ensaio de liberação "in vitro" dos fármacos a partir dos filmes **Erro! Indicador não definido.**

4.4.2 Ensaio de permeação dos fármacos a partir do sistema filmógeno **Erro! Indicador não definido.**

4.5 Caracterização do sistema filmógeno **Erro! Indicador não definido.**

4.5.1 Espessura **Erro! Indicador não definido.**

4.5.2 Umidade residual **Erro! Indicador não definido.**

4.5.3 Estudo de captação de água pelo sistema filmógeno **Erro! Indicador não definido.**

4.5.4 Estudo de perda de massa pelo sistema filmógeno **Erro!**

Indicador não definido.

4.5.5 Propriedades mecânicas **Erro! Indicador não definido.**

4.5.6 Propriedades bioadesivas **Erro! Indicador não definido.**

4.6 Avaliação da citotoxicidade do SFC **Erro! Indicador não definido.**

4.6.1 Citotoxicidade..... **Erro! Indicador não definido.**

4.7 Avaliação "in vitro" do efeito do SFC na expressão/atividade de MMPs **Erro! Indicador não definido.**

4.7.1 Determinação de relação dose - resposta: produção de MMPs frente ao estímulo de LPS em células HaCaT **Erro! Indicador não definido.**

4.7.2 Avaliação do efeito do SFC na inibição/diminuição da expressão/atividade das MMPs **Erro! Indicador não definido.**

5.	Conclusão.....	19
6.	Referências	20

1. Introdução

Doença periodontal (DP) é o termo utilizado para o conjunto de alterações patológicas que atinge o periodonto, sendo este, o tecido que envolve e serve de apoio para os dentes. Usualmente, este termo é utilizado para designar inflamações rotineiras no consultório odontológico, como gengivites e periodontites, ambas causadas pela microbiota do biofilme dental, entretanto, essas alterações podem ainda designar neoplasias, problemas decorrentes de traumas ou ainda problemas de ordem genética (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

A gengivite é facilmente reversível com higiene bucal, enquanto a periodontite exige maior cuidado, uma vez que, a inflamação não está limitada apenas à gengiva, mas também aos tecidos de suporte dental. É uma doença de ordem multifatorial com prevalência mundial entre 20-50%, e em casos mais graves ou por falta de tratamento adequado, pode resultar em perda dos dentes (BENJAMIN, 2010; CASTRO et al., 2015; NAZIR, 2017).

A periodontite, portanto, é uma doença infecto-inflamatória, uma vez que a superfície do dente constitui um ambiente propício para a instalação de bactérias patogênicas que estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando a inflamação do tecido (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Entretanto, embora seja agravada por má higiene oral, o acúmulo de tártaro subgengival por si só, não desencadeia a doença, a periodontite tem associação etiológica com bactérias específicas, sendo as principais: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tanarella forsythensis* (CARVALHO; CABRAL, 2007; GARLET, 2010).

A *Porphyromonas gingivalis*, é um coco-bacilo Gram negativo anaeróbio estrito, pertencente à família Bacteroidaceae. Considerado não somente um importante agente causador da periodontite, mas também um fator de progressão e agravamento da doença, a infecção causada por essa bactéria gera lesão tecidual, via produção de fatores de virulência (por exemplo, lipopolissacarídeo - LPS), que promovem ativação do sistema imune e resposta inflamatória no hospedeiro (BOZKURT et al., 2017; CARVALHO; CABRAL, 2007; CASTRO et al., 2015).

A *P. gingivalis* adere às células da cavidade oral e utiliza componentes bacterianos, como fimbrias (apêndices finos capazes de aderir, por exemplo, a fibroblastos, células epiteliais), proteases e peptidases para multiplicar-se (CASTRO et al., 2015). As proteases estão relacionadas com a destruição tecidual, atenuação e modulação do sistema imunológico, via degradação da matriz proteica extracelular, ativação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), inativação de fatores de complemento e estimulação da morte celular por apoptose (CARVALHO; CABRAL, 2007).

A doença pode tomar proporções em que há formação de um sulco, denominado bolsa periodontal, devido à perda progressiva do tecido conjuntivo gengival e ósseo alveolar, resultado da resposta inflamatória que promove ativação de mediadores que levarão ao recrutamento de leucócitos, aumentando a produção de MMPs além de outras interleucinas (BOZKURT et al., 2017; CASTRO et al., 2015; FREITAS, 2017). Essas proteinases não são apenas responsáveis por aumentar a inflamação, mas também por degradar o tecido conjuntivo e induzir a reabsorção óssea, devido à sua atividade proteolítica (BOZKURT et al., 2017).

As MMPs são enzimas proteolíticas Zn^{2+} dependentes que degradam componentes da matriz extracelular, são secretadas como proenzimas (ProMMPs), por neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e incluem colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs tipo membrana. São classificadas de acordo com sua especificidade ao substrato e estrutura (GARCIA, 2005).

Em geral, são compostas por um domínio catalítico que possui um sítio de ligação Zn^{2+} e um sítio de ligação catalítica específica, além disso, possuem pelo menos dois átomos de Ca^{2+} que parecem ter a função de estabilizar a estrutura terciária e um domínio da hemopexina (proteína que se liga ao grupo heme com alta afinidade) (GARCIA, 2005; GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHERER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN; RAMAMURTHY, 1983).

As MMPs têm papel importante em vários processos biológicos de cicatrização e reparação tecidual. Entretanto, quando não têm sua liberação controlada estão envolvidas na progressão de uma série de doenças, tais como aterosclerose, artrite, alguns tipos de câncer, hipertensão e problemas ósseos como

osteopenia, uma vez que têm a capacidade de ativar osteoclastos que induzem a reabsorção óssea (ARAÚJO et al., 2011).

O tratamento atual para a periodontite consiste em procedimentos de raspagem e alisamento radicular, para limpeza cuidadosa das bolsas periodontais, de modo a eliminar a placa e o tártaro e assim, diminuir a infecção e inflamação. Em casos mais avançados da doença, antibióticos de administração por via oral com ação sistêmica, geralmente metronidazol, são indicados para tratar a infecção, principalmente em pacientes recorrentes (ELKAYAM et al., 1988; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Para que estes fármacos atinjam concentrações terapêuticas no sítio de ação, é necessário o uso de doses muito altas que podem levar, por sua vez, ao aparecimento de efeitos adversos indesejados, além do risco em relação à resistência microbiológica (ELKAYAM et al., 1988). Dessa forma, o uso de antibióticos em sistemas de liberação local para a periodontite é uma interessante alternativa, uma vez que esses fármacos serão colocados diretamente na bolsa periodontal (SOSKOLNE et al., 1998).

Independente do tratamento para controle e eliminação da infecção estarem clinicamente bem estabelecidos, é relevante a implementação de medidas farmacológicas que colaborem para a diminuição do efeito das MMPs na degradação do tecido conjuntivo e ósseo na periodontite. Posto que, sobretudo, há geração de danos consideravelmente negativos e constrangedores para o paciente que convive com DP.

A doxiciclina, fármaco antimicrobiano da classe das tetraciclina (TC), é considerada inibidora das MMPs, tais como, gelatinases e colagenases, independente de sua ação antimicrobiana ou seja, quando em dose subantimicrobiana, é aprovada para uso clínico, pelo FDA (United States Food and Drug Administration - registrada como Periostat® -Doxiciclina, uso oral, 20 mg), para tratamento da periodontite em dose subantimicrobiana (DDS), apresentando efeitos satisfatórios quanto à redução da perda dos tecidos gengivais e subjacentes (CASTRO et al., 2015; GOLUB et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

Golub et al. (1983), relataram que as TC suprimiram a reabsorção de colágeno que ocorre durante a periodontite e sugeriram que essa ação pode

ser expressiva também em outras condições patológicas, com degradação excessiva de macromoléculas. O mecanismo de ação proposto inicialmente, baseia-se na capacidade das TCs inibirem diretamente as MMPs já ativadas, pela ligação dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} em seu domínio catalítico. Outros mecanismos foram propostos, como por exemplo, a inibição da expressão do precursor inativo das pro-MMPs, pelas TCs, bloqueando a ativação desses zimogênios (GOLUB et al., 2008).

Smith et al., (1999) atribuem a inibição das MMPs pela DOX à estrutura das enzimas, inferindo que a DOX desestabiliza a conformação dos domínios catalíticos e de hemopexina das MMPs (SMITH et al., 1999). Enquanto Garcia et al., 2005, defendem a hipótese de que a inibição acontece devido a ligação entre o Zn^{2+} e DOX, que ocasiona o rompimento da ligação com o Ca^{2+} e portanto, o bloqueio do sítio ativo (GARCIA, 2005).

Embora existam muitas informações sobre o uso e segurança da doxiciclina - em dose subantimicrobiana (DDS) e o fármaco já esteja sendo comercializado (administração via oral) com aprovação pelo FDA, para utilização no tratamento da periodontite, alguns grupos questionam sua utilização devido à possibilidade de atividade antibiótica e desenvolvimento de resistência, ainda que em DDS (FERES et al., 1999).

Frente aos resultados positivos quanto ao uso da DOX em dose subantimicrobiana em oposição aos questionamentos sobre o desenvolvimento de resistência microbiana com o medicamento indicado, por via oral, utilizar um sistema de liberação de fármaco local intrabolsa periodontal, é uma estratégia interessante, uma vez que, possibilita diminuição ainda maior da dose, além de eliminar efeitos antibióticos sistêmicos, mantendo o efeito frente às MMPs, objetivando melhora clínica, não somente devido a eliminação da infecção, mas principalmente, devido a possibilidade de inibição da reabsorção óssea e degradação de fibras colágenas com menos efeitos colaterais ao paciente com DP.

Sendo assim, atrelar o uso da doxiciclina em dose subantimicrobiana junto à administração do metronidazol com efeito antimicrobiano, em um único sistema de liberação tópica sustentada pode somar vantagens ao tratamento, uma vez que, as concentrações pré-determinadas de ativos no local são mantidas, minimizando a ocorrência de efeitos farmacoterapêuticos

indesejados, atingindo dois efeitos importantes que contribuirão para evolução positiva do quadro clínico: eliminar a infecção, e diminuir a degradação de macromoléculas importantes na construção do tecido conjuntivo minimizando a reabsorção óssea.

Dessa forma, nesse trabalho foi desenvolvido e caracterizado farmacotecnicamente, sistema filmógeno de liberação modificada contendo DOX e MDZ, sendo o segundo, associado em duas formas, base e benzoato de metronidazol com a finalidade de modular a liberação deste antimicrobiano e favorecer a manutenção das doses de fármaco na bolsa periodontal.

2. Objetivo

Desenvolver e caracterizar formulação filmógena contendo metronidazol e doxiciclina e avaliar seu potencial no tratamento da periodontite.

Metas

Desenvolver sistema de liberação filmógeno

Desenvolver método analítico para quantificação dos fármacos a partir do sistema filmógeno.

Avaliar o comportamento dos fármacos no sistema de liberação filmógeno: liberação dos fármacos a partir dos filmes e ensaio de permeação dos fármacos a partir dos filmes.

Caracterizar o sistema de liberação filmógeno quanto aos parâmetros: espessura, umidade residual, estudo de captação de água, estudo de perda de massa, propriedades mecânicas e mucoadesivas.

Avaliar in vitro a citotoxicidade da formulação desenvolvida.

Avaliar in vitro o efeito da formulação desenvolvida na expressão/atividade de MMPs

3. Conclusão

O filme proposto atendeu às características farmacotécnicas desejadas e elaboradas no objetivo desse trabalho, sendo biocompatível, de aplicação bucal intrabolsa periodontal e tendo sua caracterização documentada pelo período de 7 dias. De acordo com nossas condições experimentais, o fármaco antimicrobiano metronidazol, em suas duas formas, base e benzoato teve sua liberação controlada, mantendo-a em 7 dias, o que favorecerá à adesão do paciente com periodontite ao tratamento, com fármaco suficiente para este período mínimo de dias. A doxiciclina, fármaco utilizado como inibidor de proteases, também teve sua liberação controlada para o mesmo período, além de ter comprovação *in vitro* de sua ação inibitória na atividade das metaloproteinases, quando no SFC, possivelmente por quelar os íons metálicos importantes para a sua atividade. Ao final, chegamos a uma composição filmógena que atende aos requisitos farmacotécnicos e funcionais, o que a habilita a ser submetida a prova de conceito em condições reais de tratamento da bolsa periodontal.

4. Referências

- AHUJA, ALKA; ROOP K. KHAR, AND J. A. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89–100, 2011.
- ANVISA. National Health Surveillance Agency, Brazil - RDC No. 166. **National Health Surveillance Agency**, 2017.
- ANVISA. Guia para tratamento estatístico de validação. **Guia N° 10/2017 - Versão 1**, p. 19, 2018.
- ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203–230, 2012.
- ARAÚJO, R. V. DE S. et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82, 2011.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.
- BECK, M.I.; TOMKA, I.; WAYSEK, E. Psycico-chemical characterization of zein as a film coating polymer: a direct comparison with ethyl cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 137–150, 1996.
- BENJAMIN, R. M. Oral Health: The Silent Epidemic. **Public Health Reports**, v. 125, n. 2, p. 158–159, 2010.
- BOZKURT, S. B. et al. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Induces a Pro-inflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 144–153, 2017.
- BP.**, 2019. (Nota técnica).
- BRION, M.; LAMBS, L.; BERTHON, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 5. Formation of zinc complexes with tetracycline and some of its derivatives and assessment of their biological significance. **Agents and Actions**, v. 17, n. 2, p. 229–242, 1985.
- BRUSCHI, M. L. et al. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 983–994, 2009.
- CARVALHO, C.; CABRAL, C. T. Papel da Porphyromonas Gingivalis. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 48, p. 167–171, 2007.
- CASTRO, M. L. et al. Downregulation of Proteinase-Activated Receptor-2, Interleukin-17, and Other Proinflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 2, p. 203–210, 2015.
- CHANG, Y. C.; YANG, S. F.; HSIEH, Y. S. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 11, p. 679–682, 2001.
- CHEN, Y. et al. A novel photocrosslinked phosphate functionalized Chitosan-Sr5(PO4)2SiO4 composite hydrogels and in vitro biomineralization,

osteogenesis, angiogenesis for bone regeneration application. **Composites Part B: Engineering**, v. 222, n. June, p. 109057, 2021.

CHOI, W. Y.; LIM, H. W.; LIM, C. J. Anti-inflammatory, antioxidative and matrix metalloproteinase inhibitory properties of 20(R)-ginsenoside Rh2 in cultured macrophages and keratinocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 310–316, 2013.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COLORCON. **Product Information -METHOCEL™Colorcon**, 2009.

DENOBILO, M.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Validação de método para determinação de resíduos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetaciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 209–218, 2004.

DI CAPRIO, R. et al. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: An in vitro study. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

DONOS, N. The periodontal pocket. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 7–15, 2018.

ELKAYAM, R. et al. Sustained release device containing treatment of periodontal disease minocycline. **New York**, v. 7, p. 231–236, 1988.

FERES, M. et al. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. **Journal of clinical periodontology**, v. 26, n. 12, p. 775–83, 1999.

FONSECA, Y. M. et al. Protective effect of Calendula officinalis extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 596–601, 2010.

FREDERIKSEN, K.; GUY, R. H.; PETERSSON, K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2015.

FREITAS, P. H. **Matrix metalloproteinase inhibition and antibiofilm activity by incorporation of doxycycline into dental adhesive - Thesis**. [s.l.] UNICAMP, 2017.

GARCIA, R. A. Molecular Interactions between Matrilysin and the Matrix Metalloproteinase Inhibitor Doxycycline Investigated by Deuterium Exchange Mass Spectrometry. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 1128–1136, 2005.

GARLET, G. P. Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349–1363, 2010.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; LEHERER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN, R. .; RAMAMURTHY, N. S. Minocycline reduces gingival coiiia- genoiytic activity during diabetes Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **Joitrnai of Periodontal Research**, v. 18, p. 516–526, 1983.

GOLUB, L. M. et al. Subantimicrobial-Dose Doxycycline Modulates Gingival Crevicular Fluid Biomarkers of Periodontitis in Postmenopausal

Osteopenic Women. **Journal of Periodontology**, v. 8, n. 79, p. 1409–1418, 2008.

GRIFFIN, M. O.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. J. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: Possible mechanisms of action. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 102–107, 2011.

GUIMARÃES, D. A. et al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens**, v. 17, n. 4, p. 226–230, 2010.

HAMEDI, H. et al. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, n. November 2021, p. 119100, 2022.

HANEMAAIJER, R. et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells: Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31504–31509, 1997.

HENRIQUE, F. et al. Xenotransplantation. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 1, p. 9–13, 2020.

HERATH, T. D. K. et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 8, p. 694–701, 2011.

IVAN, A. L. M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124–133, 2014.

JANTRATID, E. ET AL. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Doxycycline Hyclate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2009.

JAVALI, M. A.; VANDANA, K. L. A comparative evaluation of atrigel hyclate) Atridox with scaling and root planing and combination therapy in treatment of periodontitis : A clinical study. v. 16, n. 1, p. 43–48, 2012.

JOHANSEN, M.; LARSEN, C. A comparison of the chemical stability and the enzymatic hydrolysis of a series of aliphatic and aromatic ester derivatives of metronidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 26, n. 3, p. 227–241, 1985.

JONAT, C.; CHUNG, F. Z.; BARAGI, V. M. Transcriptional down regulation of stromelysin by tetracycline. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 341–347, 1996.

JUNG, Y. et al. Eupatilin with PPAR α agonistic effects inhibits TNF α -induced MMP signaling in HaCaT cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 220–226, 2017.

KIM, H. H. et al. Eicosapentaenoic acid inhibits TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes, HaCaT cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 2, p. 343–349, 2008.

KIRCHBERG, M. et al. Extrudates of lipophilic tetracycline complexes: A new option for periodontitis therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, n. October, p. 118794, 2019.

KLEINER, D. E.; STETLERSTEVENSON, W. G. **Quantitative**

zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases*Analytical Biochemistry*, 1994.

KUBO M, MATSUDA H, TANAKA M, KIMURA Y, OKUDA H, HIGASHINO M, TANI T, N. K AND A. S. NII-Electronic Library Service. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 430–433, 1958.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funcional Polymers**, p. 1–27, 2000.

KUMRIA, R. et al. Formulation and Evaluation of Chitosan-Based Buccal Bioadhesive Films of Zolmitriptan. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 13, n. 2, p. 133–143, 2018.

LAMOUDI, L.; CHAUMEIL, J. C.; DAOUD, K. Swelling, erosion and drug release characteristics of Sodium Diclofenac from heterogeneous matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 93–100, 2016.

LATORRE, A. et al. Albumin-based nanostructures for uveal melanoma treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 35, 2021.

LI, N. et al. Alkaline phosphatase enzyme-induced biomineralization of chitosan scaffolds with enhanced osteogenesis for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Journal**, v. 371, n. April, p. 618–630, 2019.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. **Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

MADI, M. et al. The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 76, n. 1, p. 71–76, 2018.

MAHFOUZ, N. M.; HASSAN, M. A. Synthesis, chemical and enzymatic hydrolysis, and bioavailability evaluation in rabbits of metronidazole amino acid ester prodrugs with enhanced water solubility. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 841–848, 2010.

MATHEW, M.; GUPTA, D.; BETHEA, C. Stability of metronidazole in solutions and suspensions. v. 19, p. 27–29, 1994.

MOHAMAD, J. et al. Loss-of-Function Variants in SERPINA12 Underlie Autosomal Recessive Palmoplantar Keratoderma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 11, p. 2178–2187, 2020.

MOHAMMAD, A. et al. Development and validation of a stability-indicating ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for doxycycline hyclate: An optimization of the analytical methodology for a medical countermeasure (MCM) drug. **Analytical Methods**, v. 10, n. 16, p. 1842–1851, 2018.

MORAES, P. C. DE et al. Repair of Bone Defects with Chitosan-Collagen Biomembrane and Scaffold Containing Calcium Aluminate Cement. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, p. 287–295, 2017.

MORGANTI, P. et al. Anti-inflammatory, immunomodulatory, and tissue repair activity on human keratinocytes by green innovative nanocomposites. **Materials**, v. 10, n. 7, 2017.

MOURA, C. M. DE et al. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 4, p. 351–355, 2011.

NAZIR, M. A. International Journal of Health Sciences. **Prevalence of**

periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention, v. 1, n. 2, p. 360–363, 2017.

NOEL, S. P. et al. Chitosan films: A potential local drug delivery system for antibiotics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 6, p. 1377–1382, 2008.

NOVAK, M. J. et al. Adjunctive Benefits of Subantimicrobial Dose Doxycycline in the Management of Severe, Generalized, Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 7, p. 762–769, 2005.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. **Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods**. [s.l.: s.n.]. v. 882

PANAGAKOS, F. S. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 7, p. 358–361, 1996.

PARK, S. Y. et al. Pepsin-solubilised collagen (PSC) from Red Sea cucumber (*Stichopus japonicus*) regulates cell cycle and the fibronectin synthesis in HaCaT cell migration. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 487–492, 2012.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p. 1553–1561, 1996.

PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Tetraciclina e gliciliclinas: Uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PETERSON, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. **Heart Failure Reviews**, v. 9, n. 1, p. 63–79, 2004.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. **Lancet. Periodontal diseases**, v. 366, p. 207–229, 2005.

PRATEEPCHANACHAI, S. et al. Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 253–261, 2017.

RABKIN, S. W. **The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 147

RIBEIRO, R. I. M. DE A. et al. Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 115–121, 2008.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 586–595, 2002.

ROY, A. et al. Effects of plasticizers and surfactants on the film forming properties of hydroxypropyl methylcellulose for the coating of diclofenac sodium tablets. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 3, p. 233–241, 2009.

SAMARTZIS, E. P. et al. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2019.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. The Neuroprotective Effect of Doxycycline on Neurodegenerative Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 4, p. 981–986, 2019.

SANTOS NETO, Á. J. DOS. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida - parte 1. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009.

SANTOS, O. S. ET AL. Protonation Pattern , Tautomerism , Conformerism , and Physicochemical Analysis in New Crystal Forms of the Antibiotic Doxycycline. **Crystal Growth e Design**, v. 14, p. 3711–3726, 2014.

SMITH, G. N. et al. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline. **Arthritis and rheumatism**, v. 42, n. 6, p. 1140–6, 1999.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A M. et al. Técnicas de zimografia para el análisis de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.

SORLIER, P. et al. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 3, p. 765–772, 2001.

SOSKOLNE, W. A. et al. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip™ in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 12, p. 1017–1021, 1998.

T. LARSEN. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, n. 5, p. 267–71, 2002.

THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 2, p. 216–224, 2010.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. **Chitosan for bone repair and regeneration**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2014.

VICENTINI, F. T. M. C. et al. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2008.

VIDAL DE SOUZA ARAÚJO, R. et al. Metaloproteinasas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, p. 82–88, 2010.

VIEIRA COLOMBO, A. P. et al. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 94, p. 27–34, 2015.

VILELA, P. D. G. F. et al. In vitro effect of caffeic acid phenethyl ester on matrix metalloproteinases (MMP-1 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-1) in lipopolysaccharide-activated human monocytes. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1196–1202, 2015.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

WANG, J. et al. MiR-125b inhibits keratinocyte proliferation and promotes keratinocyte apoptosis in oral lichen planus by targeting MMP-2 expression through PI3 K/Akt/mTOR pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 373–380, 2016.

WANG, X. et al. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4167–4176, 2002.

WENDE, K. et al. Redox-based assay for assessment of biological impact of plasma treatment. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 7, p. 655–663, 2014.

YAMAIZUMI, M. et al. One molecule of diphtheria toxin fragment a introduced into a cell can kill the cell. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 245–250, 1978.

YANG, X. et al. Liquiritin reduces lipopolysaccharide-aroused HaCaT cell inflammation damage via regulation of microRNA-31/MyD88. **International Immunopharmacology**, v. 101, n. PB, p. 108283, 2021.

ZHANG, Z. H. et al. Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 638–643, 2015.

ZIANI, K. et al. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159–2165, 2008.

