



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
PHB/Q_t/CETOPROFENO**

LUANDA CHAVES VIEIRA LINS

Florianópolis
06 /2010

Luanda Chaves Vieira Lins

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
PHB/Qt/CETOPROFENO**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Alfredo Tibúrcio Nunes Pires

Florianópolis
06/2010

Luanda Chaves Vieira Lins

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE
PHB/Qt/CETOPROFENO**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Alfredo Tiburcio Nunes Pires
Orientador

Prof. Giovanni Finoto Caramori

Prof. Maria Marta de Souza

Florianópolis
06 /2010

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Goethe.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alfredo pela amizade, paciência e grande dedicação a orientação deste trabalho e também pelas oportunidades que me proporcionou neste período.

A Doutora Giovana Bazzo pelo carinho, atenção e pelas inúmeras contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Pedro Barreto por conceder a utilização de seu laboratório para o trabalho ser realizado e por compartilhar seus conhecimentos.

A todo o grupo POLIMAT que me recebeu com muito carinho desde o início do trabalho, me proporcionando valiosas discussões.

A CNPq pela bolsa de iniciação científica.

À minha família por todo o amor e respeito.

Ao meu namorado Gustavo Estivalet que esteve ao meu lado todos os momentos me fazendo acreditar que sou capaz.

A Deus por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 01 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 03 |
| 2.1 Sistemas de liberação controlada (SLC)..... | 03 |
| 2.2 Microencapsulação de agentes ativos..... | 04 |
| 2.3 Encapsulação por Spray drying..... | 06 |
| 2.4 PHB poli(3-hidroxi-butirato)..... | 06 |
| 2.5 Quitosana..... | 07 |
| 2.6 Cetoprofeno..... | 08 |
| 3 OBJETIVOS..... | 09 |
| 3.1 Objetivos Gerais..... | 09 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 09 |
| 4 METODOLOGIA..... | 10 |
| 4.1 Materiais..... | 10 |
| 4.2 Métodos..... | 10 |
| 4.2.1 Obtenção das micropartículas de PHB..... | 10 |
| 4.2.2 Obtenção das micropartículas compostos a partir da técnica de spray dryer..... | 12 |
| 4.2.3 Reticulação da Quitosana..... | 13 |
| 4.2.4 Determinação do teor de fármaco | 13 |
| 4.2.5 Morfologia das micropartículas..... | 14 |
| 4.2.6 Obtenção da curva de calibração..... | 14 |
| 4.2.7 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i> | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 16 |
| 5.1 Determinação do teor de fármaco..... | 16 |
| 5.2 Morfologia das micropartículas..... | 16 |
| 5.3 Curva de calibração..... | 18 |
| 5.4 Perfil de liberação..... | 18 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 21 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 22 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfis de liberação em função do tempo:convencional e controlada.....04
- Figura 2.** Representação esquemática de microesferas e microesferas compostas, indicando possíveis distribuições do fármaco.....05
- Figura3.** Fórmula estrutural da unidade monomérica do PHB.....06
- Figura 4.** Fórmula estrutural da unidade monomérica da quitosana.....08
- Figura 5.** Esquema de obtenção das microesferas através do método emulsão evaporação do solvente O/A.....11
- Figura 6.** Esquema da introdução da solução de quitosana e PHB/fármaco no aparelho de spray dryer.....12
- Figura 7.** Micropartículas de CET/PHB, CET/PHB/QTN,17
- Figura 8.** Gráfico padrão da concentração de cetoprofeno pela absorbância fixada em 260nm no UV.....18
- Figura 9.** Gráfico do perfil de liberação de micropartículas CET/PHB , CET/PHB/QTN e CET/PHB/QTN reticulada no UV.....19

LISTA DE SIGLAS DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| CET | cetoprofeno |
| PHAs | poli(hidroxicanoatos) |
| PHB | poli(3-hidroxiacetato) |
| PVAL | poli(álcool vinílico) |
| UV | ultravioleta |
| AA | agente ativo |
| O/A | óleo em água |
| A/O | água em óleo |
| SLC | sistemas de liberação controlada |
| Qt | quitosana |

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi obter micropartículas compostas com um fármaco e controlar liberação do mesmo, otimizando a velocidade de liberação para as aplicações desejadas, diminuindo o efeito *burst release*. O fármaco modelo encapsulado foi o cetoprofeno formando micropartículas com o polímero PHB através da técnica emulsão evaporação do solvente O/A.

Para a formação de micropartículas compostas de PHB revestidas ou inseridas na matriz de quitosana, utilizou-se a técnica de spray drying. As propriedades morfológicas das micropartículas foram avaliadas, bem como sua eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação foi da ordem de 36%. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura permitiram avaliar o recobrimento do filme de quitosana.

O perfil de liberação do fármaco das micropartículas de PHB e PHB/Qt foi obtido em condições tamponadas de uma solução de fosfato pH 7,4 utilizando espectrometria UV-Vis, sendo observado uma redução de liberação de fármaco das micropartículas PHB/Qt, após a reticulação do filme de quitosana. Estes resultados indicam a viabilidade de aplicação no método para encapsulamento de fármacos, sendo necessários estudos posteriores para adequação de parâmetros de preparação da micropartículas.

Palavras-chaves: micropartículas, PHB, quitosana, liberação de fármacos.

1 Introdução e justificativa

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço tecnológico de fármacos. Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como *drug delivery systems*, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional [1].

De fato, a encapsulação e liberação controlada de fármacos fornecem numerosas vantagens tal como :

- i. Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco;
- ii. Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- iii. Natureza e composição dos veículos variada;
- iv. Administração segura e conveniente (menor número de doses);
- v. Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas; [2]

O empenho por parte de muitos pesquisadores se justifica para desenvolver novas estratégias na preparação de micropartículas, estes estudos têm como objetivo diferentes maneiras de veiculação de fármacos, nas quais estão direcionando pesquisas nas propriedades físico-químicas de polímeros em laboratórios acadêmicos e industriais [3,4].

O uso de sistemas poliméricos para encapsulação de fármacos oferece muitas vantagens em comparação aos sistemas convencionais, mas para serem utilizados em sistemas de liberação controlada com futuras aplicações *in vitro*, os polímeros devem ter duas características fundamentais: biodegradabilidade (entende-se por biodegradação o processo natural pelo qual compostos orgânicos são convertidos a moléculas mais simples no ambiente biológico) e biocompatibilidade (aceitabilidade mútua entre o polímero e o ambiente fisiológico) [5].

Entre os principais polímeros que fazem parte deste grupo estão o PHB (poli(3-hidroxi butirato) e a quitosana ($\beta(1\rightarrow4)2$ -amino-2-dioxi-D-glucose). Ambos polímeros vem sendo amplamente utilizados no Brasil devido a facilidade de suas matérias-primas de baixo custo, como o açúcar da cana, para o PHB, tornando-se uma alternativa interessante e de custo acessível para utilização em sistemas de liberação de fármacos, e a desacetilação da quitina, encontrada comumente em carapaças de crustáceos[1].

Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho é a otimização no preparo de

micropartículas nas quais deverão evidenciar maiores vantagens em sua produção, já que tal área de interesse de preparação das mesmas, já foi abordada em diferentes pesquisas evidenciando a importância do aperfeiçoamento no em seu preparo trazendo vantagens como: diminuição no número de administrações diárias do medicamento, a redução dos efeitos adversos locais ou sistêmicos e a redução da toxicidade [6], diminuindo também a liberação de grande quantidade de substância ativa nos primeiros minutos após o contato aquoso, chamado de efeito *burst release* [1].

2 Revisão da Literatura

2.1 Sistemas de liberação controlada (SLC)

Sistemas de Liberação Controlada (SLC) podem ser definidos como aqueles sistemas nos quais o agente ativo (AA) é liberado de forma contínua e prolongada. O perfil de liberação ideal mostra uma liberação constante com o tempo, ou seja, com uma cinética de liberação de ordem zero [7]. Porém, em muitos casos os perfis de liberação são mais complicados, apresentando primeiramente o um efeito burst inicial, que é a liberação de grande quantidade da substância ativa nos primeiros minutos, e depois a liberação atinge um estágio de liberação mais constante [1].

Os fatores que afetam a velocidade de liberação dos agentes ativos envolvem a estrutura da matriz onde está contida a substância e as propriedades químicas associadas tanto com o polímero quanto com o agente ativo (AA). Um AA encapsulado em uma matriz que se degrada lentamente dá a oportunidade, por exemplo, de efeitos de liberação mais lentos [7]. Mas a liberação de agentes ativos, além de ser influenciada pela degradação, também é controlada pela difusão, já que a substância pode migrar através dos poros formados durante a etapa de preparação das micropartículas. Outros fatores que afetam o perfil de liberação são a massa molar polimérica, distribuição do AA e cristalinidade da matriz polimérica [8].

Em geral, um SLC é composto por um AA (que pode ser um fármaco, fertilizante, nutriente, entre outros) unido a um transportador, geralmente de natureza polimérica, onde a taxa de liberação está relacionada com as características físico-químicas do polímero [9].

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atingido um pico máximo e então declina. Isto acontece quando o AA entra em contato aquoso ou ácido, o que depende da região de absorção do fármaco. Desde que cada droga possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica [10].

O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única

dosagem [10]. A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser visualizado na Figura 1.

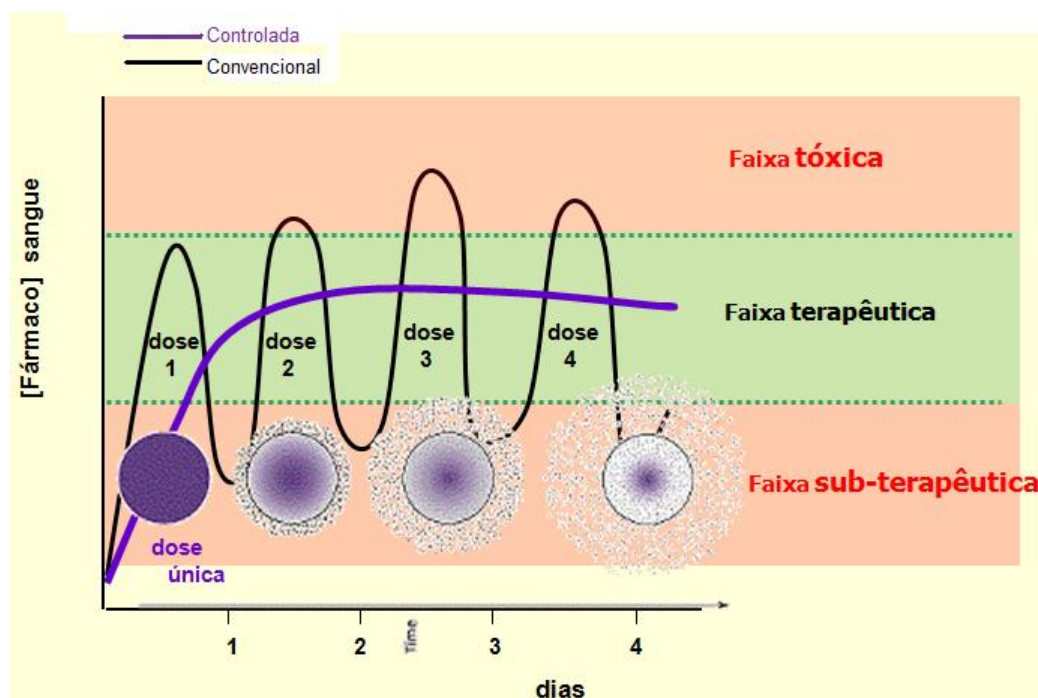


Figura 1. Perfis de liberação em função do tempo: convencional e controlada (Adaptada da referência 9)

Aplicações de liberação de fármacos utilizando micropartículas poliméricas estão se tornando um importante meio na encapsulação de agentes terapêuticos já que estas oferecem uma administração fácil e não-invasiva, além de formar com estas micropartículas uma camada que pode proteger e sustentar sua liberação por períodos que vão de horas até anos [9,11]. Liu et al. prepararam micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e encapsularam o fármaco Huperzine A, utilizado no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. Nos testes *in vivo*, estas micropartículas demonstraram a capacidade de liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas, mantendo a concentração plasmática de Huperzine A praticamente constante [11].

2.2 Encapsulação de agentes ativos

Existem diversas formas de encapsulação de agentes ativos cujo modo de preparação pode formar diferentes micropartículas, nas quais são denominadas microcápsulas (Figura 2-A) quando as partículas estão constituídas por um núcleo interno contendo o fármaco ativo dissolvido recoberto por uma camada de polímero de espessura variável, chamado também de tipo reservatório, e microesferas (Figura 2-B) quando o

princípio ativo é disperso uniformemente pela matriz polimérica, conforme representado na Figura 2 [12].

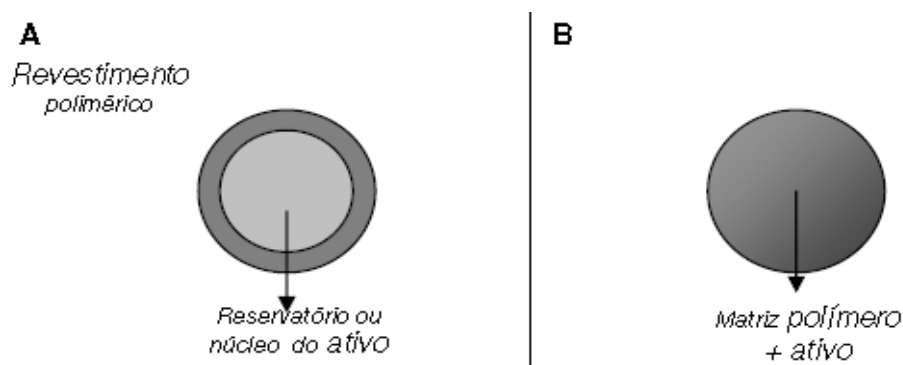


Figura 2 – Representação esquemática de microesferas e microcápsulas, indicando possíveis distribuições do fármaco.

Nos diferentes métodos de preparação de sistemas microparticulados os mais destacados e utilizados são:

i. Métodos Físico-químicos: de um modo geral, estes métodos estão baseados na dissolução de um fármaco, juntamente com um polímero, em determinado solvente, seguida pela adição, sob agitação constante, de um não-solvente à mistura. A emulsão obtida por esta técnica é denominada óleo em água (O/A) e aplica-se apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água. Baixas eficiências de encapsulação são obtidas quando se utilizam fármacos hidrossolúveis, uma vez que estes tendem a difundir e solubilizar-se na fase aquosa [13,14].

Nesta técnica é utilizado um emulsificante em fase aquosa para não aglomeração das micropartículas; o tipo e a concentração do emulsificante utilizado afeta principalmente o tamanho das micropartículas. Maia e colaboradores produziram microesferas de PHB empregando diversas concentrações de PVA na fase aquosa da emulsão e evidenciaram que, quando foi utilizada a concentração de 0,5% de PVA, o tamanho das micropartículas obtidas foi cerca de 10 vezes maior do que quando se utilizou 2,0 % de PVA [15]. Os autores demonstraram que não foi possível a obtenção de micropartículas individuais na ausência do estabilizante. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee e colaboradores, os quais utilizaram diversas concentrações de polissorbato 80 no preparo de microesferas de polimetacrilatos (Eudragit) [16].

ii. Métodos de transferência de calor e massa: se pensarmos em produção em larga escala, estes métodos podem ser úteis comercialmente. Existem vários exemplos deste método como o revestimento em leito fluidizado, centrifugação multi-orifício ou então o

método mecânico mais utilizado, que é o *Spray Drying* (secagem em spray), em que o fármaco, em solução ou dispersão, é nebulizado, juntamente com o material revestidor solubilizado ou fundido. Isto é feito em uma câmara de evaporação, causando a rápida solidificação das gotículas originando as partículas [2].

2.3. Encapsulação por Spray drying

Por definição o método spray drying, é um processo de transformação de soluções ou suspensões em partículas secas, formadas a partir da atomização destas no meio bastante aquecido [17]. Simplificadamente, o processo pode ser descrito como o bombeamento da solução ou da suspensão até o atomizador (etapa I) onde as partículas são aspergidas pelo spray até a câmara de secagem entrando em contato com um gás pressurizado criando uma névoa (etapa II), na qual ocorre a evaporação do solvente transformando a solução em partículas sólidas (etapas III e IV), e são recolhidas em um separador que as mantém em movimento de cíclicos, como um ciclone, separando-as do ar da exaustão.

2.4. PHB poli(3-hidroxiacetato)

O PHB é um poliéster sintetizado por bactérias a partir de substratos naturais. Este polímero vem sendo uma alternativa interessante e de custo acessível para utilização em sistemas de liberação de fármacos [1]. A técnica de emulsão/evaporação com PHB e seguidamente a aplicação de técnicas como spray drying utilizando o fármaco cetoprofeno foram escolhidas para a preparação de tais microesferas devido a simplicidade dos procedimentos envolvidos [18].

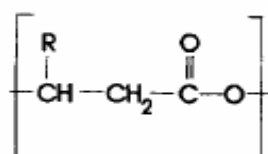


Figura 3: Fórmula estrutural da unidade monomérica do PHB. R=CH₃

A biodegradabilidade e biocompatibilidade são as propriedades mais importantes

do PHB para o uso na área farmacêutica, pois este polímero de baixa massa molar complexado a outras macromoléculas possui a capacidade de penetrar nas células, podendo ser encontrado no citoplasma e em fluidos intracelulares. Por isso muitos trabalhos vêm sendo publicados visando o melhoramento na administração de fármacos envolvendo a preparação de micropartículas para o controle de liberação de AA. Alguns desses trabalhos envolvendo a preparação de micropartículas são descritos a seguir.

Martin e colaboradores [18] produziram micropartículas de PHB através da técnica de emulsão e evaporação do solvente O/A e A/O/A. Em ambos os casos as partículas obtidas apresentaram-se porosas e com superfície externa rugosa, fato atribuído pelos autores à rápida velocidade de cristalização do polímero. As micropartículas preparadas através da técnica A/O/A apresentaram estrutura interna multi vesicular. No entanto, não foram realizados estudos de liberação de fármacos a partir destes sistemas.

Maia e colaboradores [15] prepararam microesferas de PHB e PHBV pelo método de emulsão e evaporação do solvente e estudaram o efeito de alguns parâmetros utilizados no processo sobre as características das micropartículas. Estudos de degradação *in vitro* evidenciaram que as microesferas de PHB apresentaram cerca de 2% de perda de massa após 30 dias de incubação em tampão pH 7,4 a 37° C, enquanto que a perda de massa das micropartículas de PHBV foi de 6%, em virtude deste polímero possuir menor grau de cristalinidade.

Trabalhos mais recentes propõem modificar o polímero com o intuito de sintetizar um copolímero em bloco capaz de originar partículas do tipo *core shell*, isto é, quando uma única partícula é recoberta por uma ou mais camadas de polímeros de diferentes espessuras [19].

2.5. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A cadeia polimérica da quitosana é formada principalmente por unidades de b-(14)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, conforme representado na Figura 4 [1].

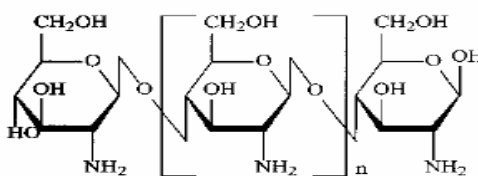


Figura 4. Fórmula estrutural da unidade monomérica da quitosana

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando a elaboração de micro e nanopartículas de quitosana para liberação controlada de fármacos. Isto porque a quitosana apresenta uma propriedade mucoadesiva, devido à força atrativa molecular formado pela interação eletrostática entre a quitosana positivamente carregada e mucosas do corpo humano negativamente carregadas [20].

Alguns trabalhos mostram que quando se utiliza quitosana de alta massa molar, tem-se um efeito *burst* menos pronunciado e um maior prolongamento da liberação de ativos quando comparada às de baixa e média massa molar [21]. Por ser um polímero hidrofílico, a quitosana não é capaz de prolongar a liberação de ativos durante longos períodos de tempo, havendo a necessidade de ser reticulada. O polímero reticulado apresenta um menor grau de intumescimento e a matriz de quitosana torna-se mais compacta.

2.6. Cetoprofeno

O cetoprofeno é um anti-inflamatório não esteroideal utilizado principalmente no tratamento da estero-artrite e artrite entre outras doenças, podendo ser ministrado por via oral [1]. O cetoprofeno apresenta um curto tempo de meia-vida plasmática e deve ser administrado 3 ou 4 vezes ao dia para a manutenção dos níveis plasmáticos [1]. Com o objetivo de prolongar a liberação por via oral e, conseqüentemente, diminuir a frequência das administrações diárias e minimizar os efeitos adversos, o presente trabalho teve como objetivo a encapsulação deste fármaco pelos polímeros, PHB pela técnica emulsão/evaporação(O/A) e a quitosana pela técnica de spray drying.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral preparar micropartículas de PHB/Cetoprofeno revestidas por uma camada de quitosana reticulada para a redução da percentagem de fármaco liberado em função do tempo.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar micropartículas de PHB contendo cetoprofeno através da técnica emulsão evaporação do solvente;
- avaliar influências de parâmetros do processo de encapsulação sobre a eficiência de encapsulação dos fármacos e a morfologia das microesferas;
- Obter micropartículas compostas PHB/fármaco/quitosana utilizando método *spray drying*;
- Avaliar as dimensões e características da superfície das micropartículas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura;
- otimizar parâmetros experimentais para encapsulação de fármacos nas micropartículas, através de planejamentos fatoriais;
- avaliar o perfil de liberação do fármaco em função do tempo para as micropartículas de PHB e PHB/Qt com e sem reticulação.

4. Metodologia

4.1 Materiais

- PHB (MM = 312.800 g mol⁻¹, segundo o fabricante);
- Cetoprofeno da All Chemistry (São Paulo, SP) utilizado como fármaco modelo;
- Poli(álcool vinílico) (massa molar de 92.000 g mol⁻¹, conforme especificação do fabricante) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ) utilizado como emulsificante;
- Isopropanol e clorofórmio (Nuclear), no preparo das micropartículas e espectrofotometria, respectivamente ;
- diclorometano (Nuclear), para solubilização do polímero PHB na fase oleosa (Tedia Company).
- Fosfato de sódio (Nuclear) e hidróxido de sódio (Merck) no preparo da solução tampão de fosfato para SLC.

4.2 Métodos

4.2 .1 Obtenção das micropartículas de PHB

As microesferas de PHB foram preparadas através da técnica de emulsão e evaporação do solvente O/A, conforme o esquema ilustrado na Figura 5.

O polímero PHB (500mg) e o fármaco (200mg) foram solubilizados em um solvente orgânico (fase oleosa ou fase interna) e então emulsificados em 200 mL de uma solução aquosa contendo 0,1 % (p/v) de PVA como estabilizante e 6 % (v/v) de isopropanol (fase externa). A emulsão foi mantida sob agitação, em um agitador magnético com velocidade de 600 rpm, à temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente orgânico. As micropartículas foram lavadas com água destilada, decantadas, secas em estufa à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador.

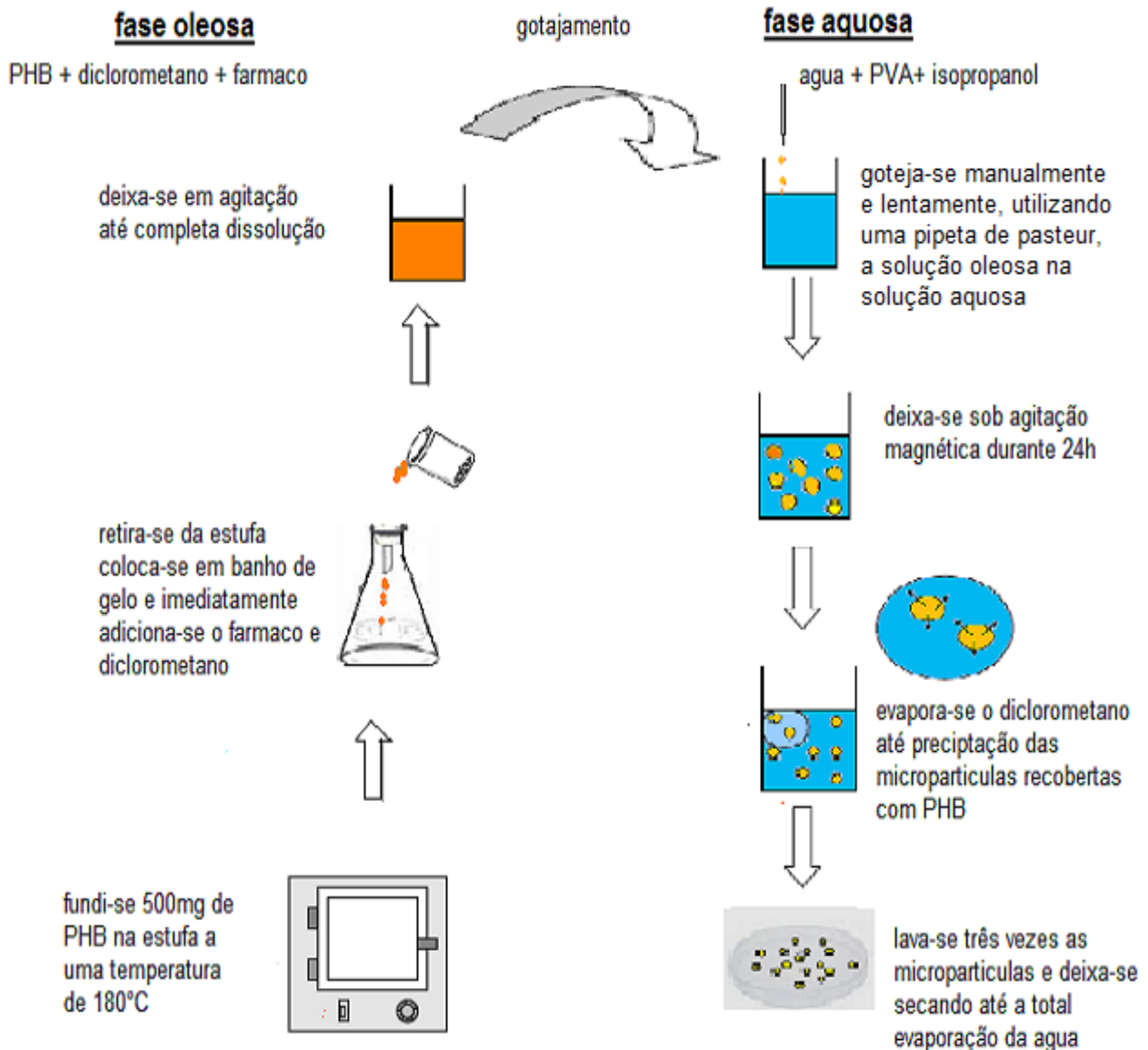


Figura 5. Esquema de obtenção das microesferas através do método emulsão evaporação do solvente O/A

Para viabilizar a dissolução do PHB, o polímero foi inicialmente fundido a uma temperatura superior a 180°C (temperatura de fusão); e resfriado rapidamente para reduzir o grau de recristalização. Após a dissolução do PHB, 500mg do fármaco e 20mL de diclorometano, foi adicionado a solução de PHB e mantido sob agitação até total homogeneização, sendo adicionado à fase não orgânica (fase interna ou aquosa) e mantida sob agitação em um agitador magnético com velocidade de 600 rpm, a temperatura ambiente. A adição da solução polímero/fármaco à solução externa deve ser lenta para que as micropartículas fiquem com dimensões pequenas e dispersas. Em seguida as micropartículas são lavadas com água destilada, decantadas, secas em estufas a vácuo a temperatura ambiente e armazenadas no decantador.

4.2.2 Obtenção das micropartículas compostas a partir da técnica de spray drying

Micropartículas compostas foram preparadas através de métodos mecânicos de encapsulação, realizando um segundo recobrimento com um outro polímero, a quitosana. Inicialmente preparou-se uma solução de quitosana com concentração de 1% (m/v) em ácido acético 1% (v/v), deixando sob agitação magnética durante um período de 24 h. A esta solução foi adicionado micropartículas CET/PHB, preparadas conforme descrito anteriormente e apresentado no esquema da Figura 6, sendo mantido sob constante agitação por mais um período de 24 h. Após este período a solução foi submetida à pulverização ou secagem por atomização quando colocadas no aparelho de spray dryer, Figura 6.

A atomização consiste basicamente em colocar a solução pulverizada em contato com o ar quente com temperaturas abaixo da degradação dos polímeros e do fármaco, cerca de 180°C, ocorrendo uma rápida evaporação do solvente. As partículas são removidas por um tubo perpendicular a da zona de secagem onde outro ar de secagem sai pela parte inferior do equipamento a uma temperatura de 60 a 100°C, ou seja temperaturas mais baixas que a do ar inicial. Estas partículas removidas são arrastadas pelo ar, sendo depositados na parte inferior do aparelho em um tubo coletor separado submetidas a um ciclone para recuperar partículas finas através da força centrífuga [22].

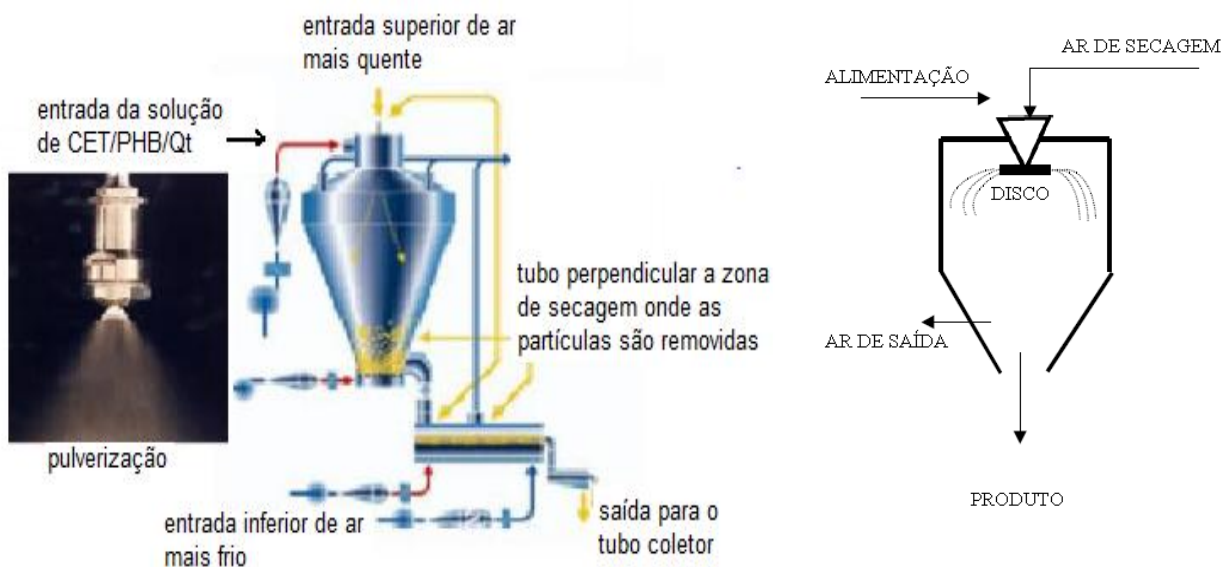


Figura 6. Esquemas do funcionamento do spray drying e da introdução da solução de CET/PHB/Qt

As variáveis importantes no controle das características do pó final podem ser assim resumidas:

- líquido pulverizado (teor de sólidos, número de partículas e viscosidade);
- pulverizador (tipo e mecanismo de funcionamento);
- ar de secagem (velocidade, temperatura do ar de entrada e temperatura do ar de saída).

A separação do pó do ar de secagem influencia a granulometria do produto desidratado, de acordo com o manuseio mecânico na separação, podendo resultar em um pó mais fino. As maneiras de pulverizar a solução influenciam o tamanho da partícula sólida, sua densidade, aparência e umidade. Já o contato líquido, ar quente e a evaporação influenciam a densidade do pó, aparência e umidade [19].

O aparelho utilizado para a secagem foi “*Buchi Mini Spray Dryer B-290*”, e os parâmetros fixados para a realização da secagem foram:

- Inlet (temperatura de entrada da câmara de ar de secagem)= 180°C
- Outlet (temperatura de saída da câmara de ar de secagem)= 18°C
- Aspirator (vazão de ar de secagem)= 100%
- Pump (vazão da bomba peristáltica) = 25%
- Tempo médio (duração da pulverização de toda a solução) = 30 min.

Com tais parâmetros pode-se dar início ao encapsulamento dos fármacos otimizando seu modo de preparo e assim realizar estudos físico-químicos.

4.2.3. Reticulação da Quitosana

Foram utilizados 300mg de micropartículas adicionando em 75mL de uma solução aquosa de glutaraldeído 1% (m/v), que atua como reticulante do filme de quitosana depositado sobre as micropartículas de PHB/fármaco e mantidas sob agitação durante 1 h. Em seguida as micropartículas compostas foram lavadas três vezes com água destilada. Colocou-se na estufa até que as micropartículas ficassem totalmente secas.

4.2.4. Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor de CET nas micropartículas foram transferidas para

um balão volumétrico uma quantidade de micropartículas que tivessem o equivalente a 10mg/L. A esta quantidade foram adicionado 10 mL de clorofórmio em balões vedados, nos quais foram mantidos sob agitação até a completa solubilização, e assim podê-se quantificar através de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, em espectrofotômetro Shimadzu 1601 PC, a 260 nm [1].

O teor de ativo nas micropartículas, expresso em mg de fármaco por 100 mg de micropartículas, foi determinado com valores de porcentagem de Eficiência de encapsulação de acordo com a Equação 1.

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulada}}{\text{quantidade total de fármaco adicionada}} \times 100$$

Equação 1

4.2.5. Morfologia das micropartículas

A morfologia da superfície externa das micropartículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico Philips XL30. As amostras foram recobertas com uma camada de ouro, em metalizador Bal-Tec MD 020 (Balzers).

4.2.6. Obtenção da curva de calibração

Uma solução estoque na concentração de 1mg/mL de cetoprofeno em uma solução tampão de fosfato (pbs) pH 7,4 foi analiticamente preparada. Desta solução, foram preparadas por diluição, em triplicada, soluções nas concentrações 2,5 ; 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 mg/L, as quais tiveram as absorbâncias em 260nm determinadas por espectrofotometria no UV-Vis, tendo a solução tampão como branco. Os valores das absorbâncias médios foram relacionados num gráfico em função da concentração (x).

4.2.7. Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

Micropartículas contendo o equivalente a 45 mg de fármaco foram colocadas em

frascos vedados, seguido da adição de 30 mL de tampão fosfato pH 7,4 e mantidas em banho-maria Yamato BT25, a 37°C, sob agitação. Em intervalos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 4 mL e igual volume de tampão foi repostado. A concentração de CET do meio foi determinada através de espectrofotometria de absorção na região do UV, em $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ para o CET. Utilizando uma curva de calibração (faixa de concentração de 1,0 a 20,0 mg L⁻¹ de fármaco), calculou-se a percentagem de CET liberada para o meio em função do tempo.

5. Resultados e discussão

5.1 Determinação do teor de fármaco

A eficiência de encapsulação de fármacos no interior de micropartículas poliméricas compostas preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente e da técnica de spray drying, depende das características físico-químicas do fármaco e do polímero, bem como das condições utilizadas no processo, como o tipo e volume dos solventes das fases interna e externa da emulsão, a proporção fármaco/polímero, o tipo e concentração do estabilizante, entre outros.

Para tais resultados de encapsulação foram estabelecidos parâmetros já citados no trabalho, podendo ser futuramente modificados através de planejamento fatorial para obtenção de melhores teores de encapsulação.

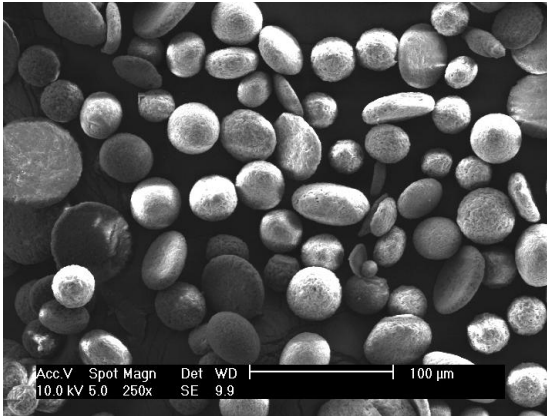
O teor de fármaco nas micropartículas foi determinado para as micropartículas com CET/PHB; e depois para micropartículas compostas com /CETPHB/Qt; e CET/PHB/Qt após o processo de reticulação. Através da diferença entre a quantidade de fármaco inicialmente presente nas partículas e a quantidade perdida para o meio, o teor de fármaco nas micropartículas reticuladas foi determinado. O resultado foi expresso em mg de fármaco por 100 mg de micropartículas, considerando-se uma eficiência de encapsulação de 100 %.

Para as micropartículas de CET/PHB obteve-se o valor médio de encapsulação de 31,4%. Resultados semelhantes foram encontrados por Bazzo e colaboradores ao prepararem tais micropartículas com cálculos fatoriais para maiores teores de fármaco encapsulado [1]. Para as micropartículas compostas CET/PHB/Qt obteve-se um teor de encapsulação de 35,9%, podendo-se assim levar em consideração que não há perda de fármaco durante a técnica de encapsulação de spray drying, já para micropartículas após a reticulação estudos realizados por Bazzo e colaboradores mostram que não ocorre nenhuma perda de fármaco, podendo-se então considerar o mesmo teor para CET/PHB/Qt reticulada [1].

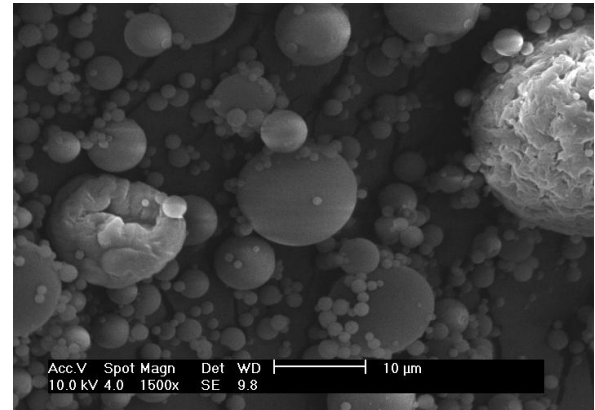
5.2 Morfologia das micropartículas

Nas micrografia puderam ser observadas micropartículas com predominantemente

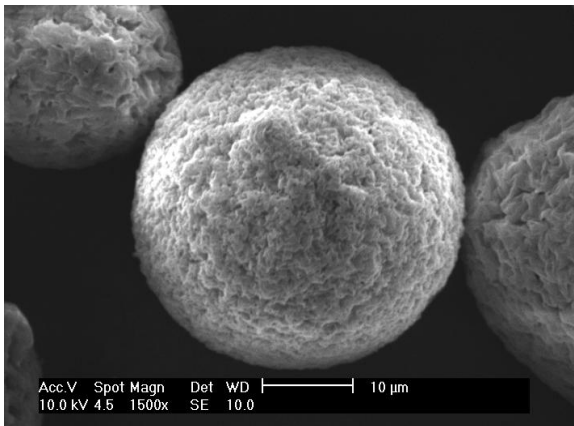
esferas rugosas, conforme mostrado na Figura 7. As micropartículas de PHB/fármaco recobertas com quitosana apresentam características de textura da superfície diferentes, os quais são uma forte evidência de indicação do efetivo recobrimento, conforme micrografias apresentadas nas figuras 7 B e D.



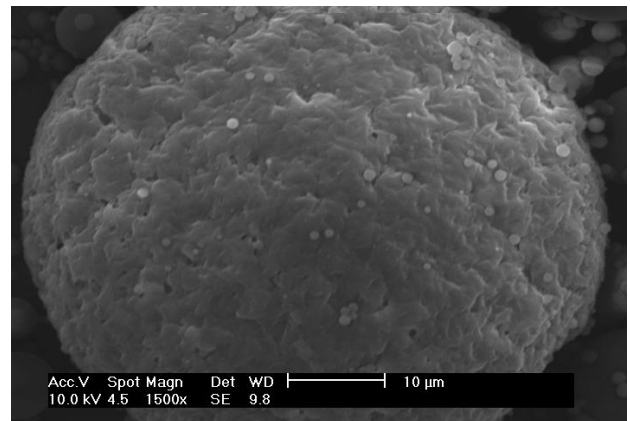
A



B



C



D

Figura 7: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura A e C PHB/CET ; B e D PHB/CET/Qt

Observa-se também, nas figuras 7C e 7D, que tais partículas com quitosana apresentaram tamanho maior (cerca de 4 vezes) do que as microesferas de CET/PHB, nos levando a chegar a conclusão que houve o encapsulamento destas pelo *spray drying*, além do mais as partículas recobertas apresentam-se com características semelhantes a da quitosana pura, ou seja, com uma superfície lisa e muito menos porosa. Porém apesar de ser clara a diferença em sua superfície ainda observa-se uma leve rugosidade em sua superfície, isso é devido ao recobrimento parcial com uma fina camada de quitosana em algumas micropartículas. No entanto, a ocorrência deste tipo de micropartículas não

afetou substancialmente para a avaliação da liberação do fármaco, podendo assim mudar parâmetros que diminuam ainda mais a liberação de fármaco utilizando tal técnica.

Tendo em vista que o controle de liberação de grande quantidade de fármaco nos primeiros momentos de administração devidos a problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através da operação de secagem [23], vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de micro e nanopartículas, ampliando as perspectivas para utilização clínica destes sistemas carregadores de fármaco. A desidratação das suspensões de micro e nanopartículas tem sido realizada através das operações de sublimação (liofilização) ou de aspersão (*spray drying* ou nebulização) [24].

5.3 Curva de calibração

A figura 8 apresenta o gráfico de absorvância em função da concentração de fármaco, a 260nm de diferentes concentrações de cetoprofeno em solução tampão de fosfato com pH 7,2, apresentando uma relação linear, com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 1.

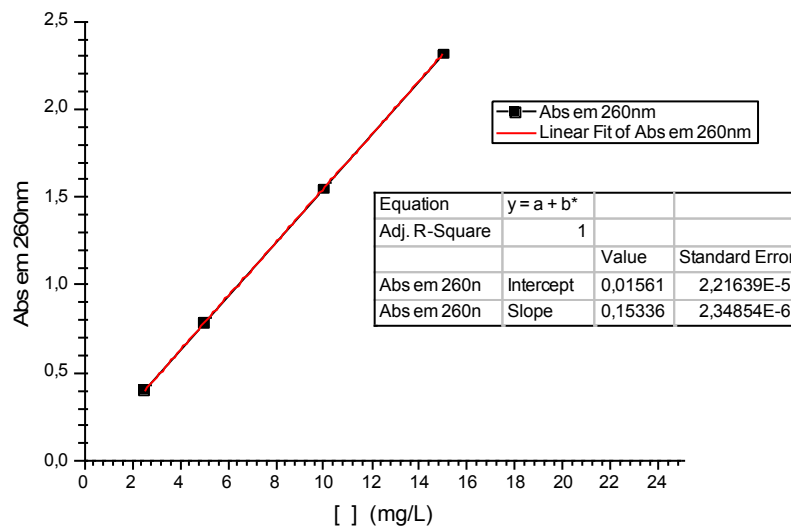


Figura 8. Gráfico padrão da concentração de cetoprofeno pela absorvância fixada em 260nm no UV

5.4 Perfil de liberação

Os perfis de liberação do cetoprofeno, visualizados na Figura 9, mostram que a

liberação do fármaco das micropartículas CET/PHB apresentou-se muito semelhante ao das microesferas de CET/PHB/Qt, com um pronunciado efeito *burst*, pelo fato das micropartículas não terem sido revestidas com uma camada muito espessa de quitosana, conforme observado nas micrografias. Por outro lado, uma diminuição da quantidade de CET liberado e um prolongamento da liberação do fármaco foram observados nas micropartículas de CET/PHB/Qt, após a reticulação da camada de quitosana.

Conforme mencionado anteriormente, após os primeiros 45 min (Figura 9) ocorreu uma diminuição de aproximadamente 20% de liberação fármaco CET das micropartículas após a reticulação em comparação de micropartículas não reticuladas, que liberou cerca de 40% do fármaco CET. Resultados semelhantes foram obtidos por Gan e Wang [21], que prepararam micropartículas de quitosana contendo albumina bovina a e observaram que, quando a concentração do polímero foi aumentada de 1,0 mg/mL para 3,0 mg/mL, houve uma redução do efeito *burst* em virtude do aumento do tamanho das micropartículas, o qual está relacionado à maior viscosidade da solução de quitosana.

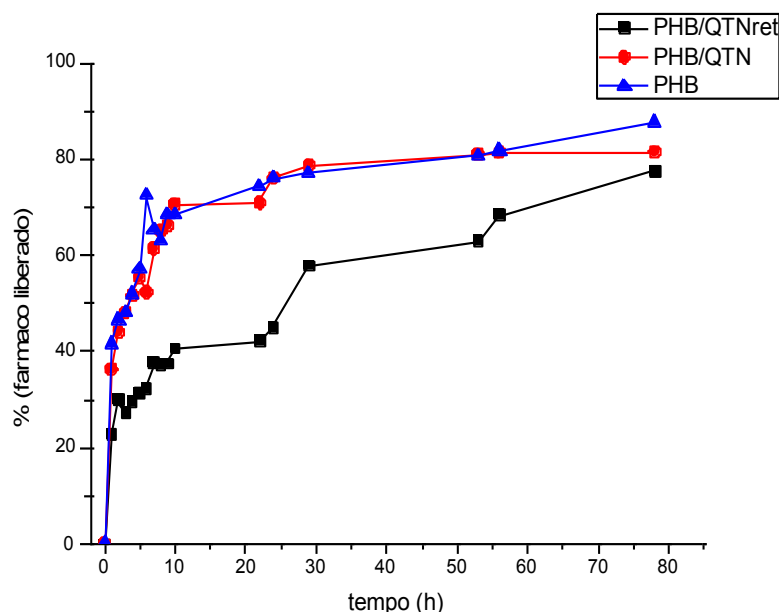


Figura 9. Gráfico do perfil de liberação do fármaco Cetoprofeno nas micropartículas PHB, PHB/QTN e PHB/Qt reticulada no UV.

A liberação de fármacos a partir de micropartículas preparadas com quitosana pode ser modificada através da reticulação do polímero, o que torna a matriz mais rígida, compacta e hidrofóbica. Nesse estudo optou-se por utilizar como agente reticulante o glutaraldeído, um dos mais comumente empregados, com o objetivo de avaliar a sua

influência sobre o perfil de liberação do CET. A liberação de ativos a partir de micropartículas de quitosana pode ser modificada através da utilização de diferentes quantidades do polímero submetido ao processo de reticulação, diferentes tipos e concentrações de reticulante e tempos de reticulação diferentes. Nesse estudo, o tipo de reticulante, o tempo e a quantidade de quitosana submetida ao processo de reticulação foram mantidos constantes. Portanto, a utilização de uma maior concentração de glutaraldeído (1,0%) possibilitou um maior grau de reticulação da matriz de quitosana, tornando-a mais rígida e hidrofóbica, reduzindo a quantidade de fármaco liberado e o efeito *burst*.

Modificando-se as características de superfície das partículas, é possível obter diferentes taxas de associação do fármaco por adsorção, para uma mesma concentração inicial do mesmo. Este parâmetro é provavelmente muito importante para determinar a capacidade de prolongar o tempo de ação do fármaco [25].

Experimentalmente, em uma dada temperatura, diferentes quantidades de fármaco são retiradas a um determinado volume de suspensão. Após estabelecido o equilíbrio, pela distribuição do fármaco entre a fase fluida e o adsorvente (micropartículas), uma alíquota de cada mistura da concentração do fármaco é determinada no sobrenadante.

A isoterma de adsorção, que expressa a variação da concentração de equilíbrio no adsorvente, é obtida plotando-se os valores de concentração de equilíbrio contra os valores de fármaco liberados em porcentagem. Além disso, uma pequena variação nas quantidades adsorvidas pode induzir a grandes diferenças no perfil de liberação do fármaco, principalmente para aqueles fracamente ligados às micropartículas.

O perfil de liberação do fármaco cetoprofeno das micropartículas compostas reticuladas com glutaraldeído foi mais lento, indicando haver diferenças na liberação de ambos os fármacos após a reticulação da quitosana, especialmente nas primeiras horas. Após um determinado período de tempo, uma menor quantidade de fármaco passa a ser liberada e os perfis de dissolução atingem um platô, chegando assim na sua porcentagem de 100% de liberação.

Estudos quanto a modificação da concentração de quitosana utilizando a técnica de spray drying podem ser feitos modificando parâmetros para se obter uma quantidade maior de partículas encapsuladas além de ter o seu perfil de liberação mais controlado.

6. Conclusão

A técnica de spray drying mostrou-se viável para a obtenção de micropartículas de CET/PHB/QTN, podendo ser considerada uma promissora técnica para o preparo de micropartículas compostas. A reticulação da quitosana com glutaraldeído influenciou a liberação dos fármacos a partir das micropartículas compostas ocorrendo assim uma diminuição efetiva do efeito *burst* e um prolongamento da liberação do fármaco estudado. Portanto, a liberação de fármacos a partir das micropartículas compostas pode ser controlada por mudanças nos parâmetros de obtenção micropartículas.

Com os promissores resultados obtidos neste trabalho, pretende-se dar continuidade ao estudo, obtendo-se micropartículas com diferentes parâmetros experimentais, tais como concentração da solução de quitosana, tempo de reticulação, entre outros, determinados a partir de um planejamento fatorial.

7. Referências Bibliográficas

- [1] BAZZO,G.C.; LEMOS-SENNÁ,E.M.T.; PIRES,A.T.N. . *Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 839-844, 2009.
- [2] AZEVZDO, M. *Nano esferas e liberação controlada de fármacos*. Tópicos especiais em química inorgânica IV, work shop do Instituto de Química da UNICAMP, 2002.
- [3] BATYCKY, R. P. et al A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n.2, p.1464-1477, 1997.
- [4] LINHARD, R. Biodegradable polymers for controlled release of drugs In: ROSOFF, M. *Controlled release of Drugs: Polymers and aggregate systems*. New York: VCH Publisher, 1988.p.53-85.
- [5] OISHI, M.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. Functional PEG for drug delivery. In: KWON, G. S. (Ed.). *Polymeric Drug Delivery Systems*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 93-123.
- [6] RANADE, V.V. *Drug delivery systems*. 2.ed. New York: CRC Press, 2004.
- [7] ANDREANI, L.; CERCENÁ, R. ; RAMOS, B.G.Z. ; SOLDI, V. *Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system*. *Materials Science and Engineering*,2009. p. 524–531
- [8] FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 1-18, 2004.
- [9] EVANGELISTA, R. C. Tecnologia farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas. Racine Qualificação e Acessória, p. 01-80. São Paulo, 1998.

- [10] GHANDEHARI, H. Phar 535: controlled drug release. Disponível em <https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introdução%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf>. Acesso em julho de 2003.
- [11] LIU, W. H. et al. Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, v. 107, p. 417-427, 2005.
- [12] WISE, D. L. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000.
- [13] GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. *Int. J. Pharm.*, v. 242, p. 197-201, 2002.
- [14] WANG, F. J., WANG, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. *J. Microencapsulation*, v. 19, n. 4, p. 495-510, 2002.
- [15]. MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian J. Chem. Eng.**, v. 21, n. 01, p. 1-12, 2004
- [16] LEE, J. H.; PARK, T. G.; CHOI, H. K. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method. **Int. J. Pharm.**, v. 196, p. 75-83, 2000.
- [17]. LIMA, F. ; Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. **Emprego de anopartículas sólidas na liberação de fármacos pouco solúveis.**
- [18]. MARTIN, M.A.; MIGUENS, F.C.; RIEUMONT, J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids Surf., B**, v. 17, p. 111-116, 2000.

[19] KAI, Z.; YING, D.; CHEN, G.Q. Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochem. Eng. J.*, v. 16, p. 115-123, 2003.

[20] DHAWAN S. ; SINGLA K. ;SINHA V. ; University Institute of Pharmaceutical Sciences, Panjab University, Chandigarh, India 160014. **Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods**. May 17, 2004; Accepted: July 26, 2004.

[21] GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—
Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf., B*, v. 59, p. 24-34, 2007.

[22] GAVA, A.J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo : Nobel, 1978. TECPAR, Sistema brasileiro de respostas técnicas(SBRT).

[23] FRANKS, F; *Eur. J. Pharm. Biophan.* 1998,p.45,221

[24] MULLER, C.R. ; V.L. ; Polmann, ^a R. ; Michalowski, C.B. ; Petrovicick, P.R. ; Guterres, S.S. ; *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000, p.55 , p.155

[25] MARCHA-HEUSSLER, L. ; Maicent, P. ; Hoffman, M. ; Spttler, J.; Couvreur, P.; *Int.J.Pharm.* 1990, p.58, p.115.

Participação em Congresso.

Dados apresentados neste trabalho foram submetidos ao 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, que realizar-se-á em Setembro próximo, na cidade de Gramado, RS.