Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2011;32(1):63-67
ISSN 1808-4532

Efeito da massa molar do acetobutirato de celulose e da adição de poli(3-hidroxibutirato) sobre as características das microesferas e o prolongamento da liberação do cetoprofeno

Oliveira, B.S.[1]; Fleith, C.D.[1]; Zétola, M.[1]; Pezzini, B.R.[1]; Bazzo, G.C.[1*]

[1]Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE, Joinville, SC, Brasil.

Recebido 03/08/2010 / Aceito 03/12/2010

RESUMO

No presente trabalho, foram elaboradas microesferas de acetobutirato de celulose (ABC) contendo cetoprofeno com o objetivo de prolongar a liberação do fármaco. Utilizou-se a técnica de emulsão e evaporação do solvente, variando-se os seguintes parâmetros: massa molar do ABC e a adição ou não de poli(3-hidroxibutirato) (PHB), segundo um planejamento fatorial 2^2. Maiores eficiências de encapsulação do cetoprofeno foram obtidas quando utilizado ABC com maior massa molar e a adição do PHB levou a uma diminuição do percentual de fármaco encapsulado. Todas as formulações originaram partículas esféricas, com cristais de fármacos aderidos à superfície externa e matriz polimérica porosa quando adicionado o PHB. Os perfis de liberação *in vitro* indicaram que o aumento da massa molar do ABC levou a uma diminuição do percentual de fármaco inicialmente liberado e a um prolongamento de sua liberação. Por outro lado, a adição do PHB acelerou a liberação do cetoprofeno a partir das microesferas.

Palavras-chave: Microesferas. Cetoprofeno. Preparações de liberação retardada.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação prolongada de fármacos permitem a liberação gradual do ativo a partir da forma farmacêutica, possibilitando a manutenção dos níveis plasmáticos efetivos e a redução das flutuações das concentrações plasmáticas do fármaco. Esses sistemas de liberação apresentam algumas vantagens em relação às formas de liberação convencional, como a diminuição no número de administrações diárias do medicamento e a redução dos efeitos adversos, possibilitando uma melhoria na adesão dos pacientes ao tratamento (Ranade, 2004).

Entre os sistemas de liberação que podem ser empregados para prolongar a liberação de fármacos por via oral, destacam-se as micropartículas poliméricas. Através da microencapsulação, é possível encapsular fármacos no estado sólido ou na forma de suspensão ou solução no interior de matrizes ou sistemas vesiculares poliméricos. Esse processo tem sido usado em uma série de aplicações farmacêuticas - na melhoria da estabilidade de fármacos, na obtenção de sistemas de liberação prolongada ou ainda na vetorização de substâncias ativas em sítios específicos de ação (Wise, 2000; Schaffazick et al., 2006).

Diversos polímeros podem ser empregados no preparo de microesferas. No presente trabalho, foram utilizados o acetobutirato de celulose e o poli(3-hidroxibutirato). A utilização desses polímeros é interessante na área farmacêutica, pois são obtidos através de matérias-primas de origem natural a baixos custos e não são tóxicos para administração por via oral. No entanto, apresentam algumas desvantagens quando utilizados isoladamente no preparo de micropartículas. Em geral, microesferas de PHB apresentam-se rugosas e porosas devido ao elevado grau de cristalinidade desse polímero e à sua rápida velocidade de cristalização (Martin et al., 2000), promovendo, dessa forma, a rápida liberação do fármaco a partir das micropartículas (Kassab et al., 2007; Bidone et al., 2009). Por outro lado, o acetobutirato de celulose origina partículas rígidas e compactas. Esse fato, associado à hidrofobia desse polímero, conduz a uma velocidade demasiadamente lenta de liberação de fármacos a partir dessas partículas, o que pode ser indesejável para sistemas de liberação controlada de fármacos para administração por via oral (Fundeanu et al., 2005; Zanetti-Ramos et al., 2006). Sendo assim, a utilização de blendas de PHB/ABC poderia ser uma alternativa interessante para modular a liberação de fármacos contidos em microesferas preparadas com esses polímeros.

Autor correspondente: Giovana Carolina Bazzo - Departamento de Farmácia Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE - Campus Universitário s/n, Bairro Bom Retiro - CEP.89201-972 - fone (47) 3461-9091 - e-mail: gbazzo@uol.com.br

O cetoprofeno, um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), é um bom candidato para o desenvolvimento de formulações orais de liberação prolongada, pois apresenta um curto tempo de meia vida plasmática, necessitando que várias administrações diárias sejam realizadas. Além disso, reações adversas gastrintestinais têm sido observadas quando administrado por via oral. Uma das alternativas que pode ser utilizada para minimizar a irritação gastrintestinal causada pelos AINEs e prolongar a sua liberação é a incorporação desses fármacos em sistemas multiparticulados, a exemplo das micropartículas, os quais tendem a se espalhar uniformemente no trato gastrintestinal, evitando a concentração do fármaco em um único local e diminuindo, dessa forma, a irritação local (Sweetman, 2002).

No presente trabalho, microesferas de acetobutirato de celulose/PHB contendo cetoprofeno como fármaco modelo foram preparadas com o objetivo de avaliar a influência da massa molar do ABC e da adição de PHB sobre as características das microesferas, a eficiência de encapsulação e a liberação do cetoprofeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

O PHB (massa molar de 312.800 g mol^{-1}) foi gentilmente cedido pela PHB Industrial (Serrana, SP). O acetobutirato de celulose (massa molar de 30.000 $g.mol^{-1}$ e 70.000 $g.mol^{-1}$) foi adquirido da Aldrich Chem. Co. (EUA), o cetoprofeno da Henrifarma (São Paulo, SP), o álcool polivinílico [PVA] da Vetec (Rio de Janeiro, RJ) e o clorofórmio da Labsynth (Diadema, SP).

Obtenção das micropartículas

As micropartículas foram obtidas através da técnica de emulsificação e evaporação do solvente. Para encapsular o cetoprofeno (fármaco lipossolúvel), foi utilizada a técnica de emulsão óleo em água (O/A). A fase interna da emulsão foi constituída pelos polímeros (500 mg) e pelo fármaco (200 mg), os quais foram dissolvidos em 7,5 mL de clorofórmio. No preparo das blendas, os polímeros foram utilizados na proporção de 1:1. Essa fase foi vertida sobre 200 mL da fase externa, constituída por água destilada contendo 0,15% (p/V) de PVA como estabilizante. O sistema foi mantido sob agitação de 700 rpm, em um agitador magnético (Quimis, modelo Q261A), à temperatura ambiente e, após a evaporação do solvente, as micropartículas foram decantadas, lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

Foram obtidas quatro formulações distintas de acordo com o planejamento fatorial do tipo 2^2 apresentado na Tabela 1, variando-se a massa molar do acetobutirato de celulose e a adição ou não de PHB às formulações.

Tabela 1. Planejamento fatorial do tipo 2^2 utilizado no preparo das microesferas.

FORMULAÇÕES	MASSA MOLAR DO ABC (g mol^{-1}) (Fator A)	ADIÇÃO DO PHB (Fator B)
M1	70.000 (+)	Não (-)
M2	70.000 (+)	Sim (+)
M3	30.000 (-)	Não (-)
M4	30.000 (-)	Sim (+)

(+) maior nível; (-) menor nível

Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor de cetoprofeno nas microesferas, foi utilizado o método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, previamente validado para essa finalidade. Foram pesadas micropartículas que correspondessem a uma massa conhecida de fármaco. Após a adição de clorofórmio, as amostras foram mantidas em frascos vedados, sob agitação, até a solubilização dos polímeros e do fármaco. Em seguida, a solução foi diluída até a concentração teórica de 10 µg mL^{-1} e a absorbância determinada em espectrofotômetro SHIMADZU (1601 PC), em 260 nm. Através da construção de uma curva de calibração, foi calculado o teor de cetoprofeno nas microesferas. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada através da Equação 1.

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulada}}{\text{quantidade total de fármaco adicionada}} \times 100 \qquad \text{Equação 1}$$

Avaliação da morfologia e do tamanho das microesferas

A morfologia das microesferas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte com auxílio de uma fita de carbono, recobertas com uma fina camada de ouro e, em seguida, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss DSM 940A. O tamanho das microesferas foi determinado após a medição, pelo diâmetro de Martin, das partículas visualizadas nas fotografias ampliadas. As medições foram padronizadas no sentido do maior diâmetro.

Avaliação do perfil de liberação do fármaco *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* do cetoprofeno a partir das micropartículas, inseridas em cápsulas gelatinosas duras, foi realizado em aparelho de dissolução Nova Ética (modelo 299/6), utilizando-se as seguintes condições experimentais: aparato 1 (cesto), tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, mantido à temperatura de 37 ± 0,5 ºC e agitação de 100 rpm. Em intervalos pré-determinados, foram coletadas amostras e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260 nm. Através da construção de uma curva de calibração, foi determinada a quantidade

de fármaco liberada para o meio de dissolução em função do tempo.

RESULTADOS

Os resultados da eficiência de encapsulação do cetoprofeno nas microesferas encontram-se na Figura 1. Através da análise de variância (ANOVA), verificou-se que tanto a massa molar do ABC quanto a adição do PHB influenciaram significativamente a eficiência de encapsulação do cetoprofeno ($F_{calc.} > F_{tab}$; a = 0,01), conforme demonstrado na Figura 2.

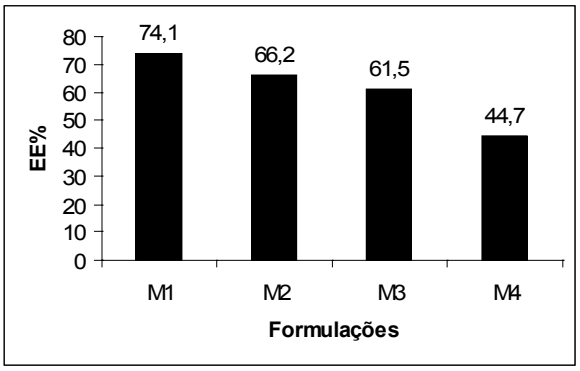

Figura 1. Eficiência de encapsulação do cetoprofeno nas microesferas preparadas a partir das formulações M1 a M4.

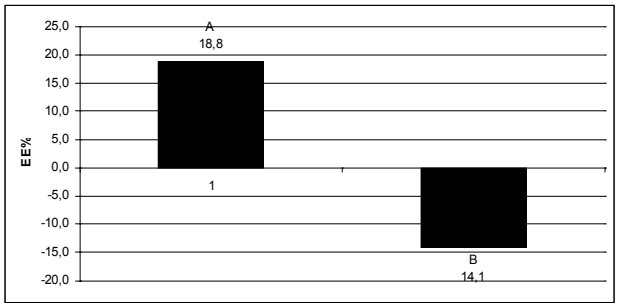

Figura 2. Estimativa dos efeitos (eixo x) da massa molar do acetobutirato de celulose (A) e da adição de poli(3-hidroxibutirato) (B) sobre a eficiência de encapsulação do cetoprofeno, empregada na interpretação do planejamento fatorial 2^2.

As fotomicrografias das microesferas, obtidas através de microscópio eletrônico de varredura, encontram-se na Figura 3. Todas as formulações originaram partículas esféricas, com cristais de fármaco localizados na superfície externa. As microesferas preparadas somente com acetobutirato de celulose apresentaram superfícies mais lisas, especialmente quando ABC com massa molar de 70.000 $g.mol^{-1}$ foi empregado. A adição de PHB levou à formação de poros na matriz polimérica.

Os resultados do tamanho médio das microesferas encontram-se na Figura 4, indicando que partículas com maior tamanho foram obtidas quando ABC com massa molar de 70.000 $g.mol^{-1}$ foi utilizado (formulações M1 e M2).

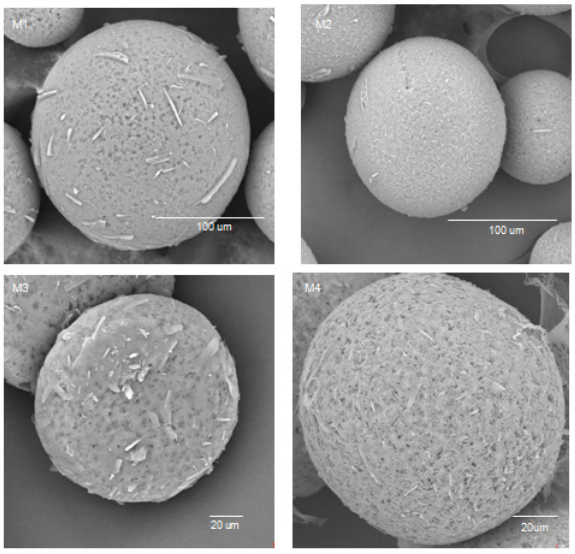

Figura 3. Fotomicrografias das microesferas das formulações M1 a M4.

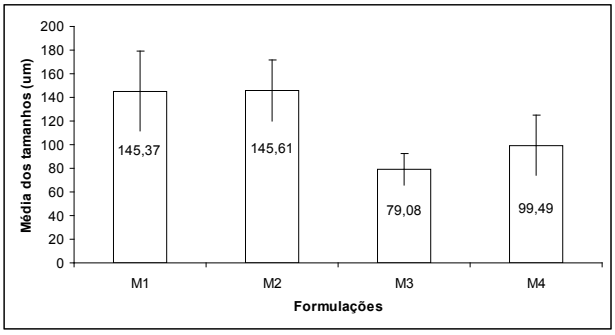

Figura 4. Tamanho médio das microesferas obtidas a partir das formulações M1 a M4.

Os perfis de dissolução do cetoprofeno a partir das microesferas estão demonstrados na Figura 5. Na Tabela 2, encontram-se descritas as quantidades de fármaco liberadas após 30 min ($Q\%_{30min}$) e 12 h ($Q\%_{12h}$) de ensaio, as quais foram empregadas como respostas na análise de variância, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis analisadas sobre a liberação inicial (efeito *burst*) e o prolongamento da liberação do cetoprofeno.

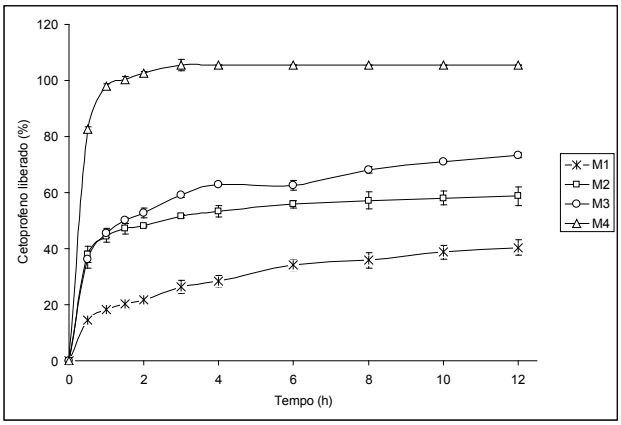

Figura 5. Perfil de dissolução do cetoprofeno a partir das microesferas, em tampão fosfato pH 6,8.

Tabela 2. Quantidade de cetoprofeno liberado em 30 min e em 12 h no ensaio de dissolução *in vitro.*

	Quantidade de fármaco liberada (%)	
	30 min	**12h**
M1	14,38 ± 0,79	40,38 ± 2,78
M2	38,05 ± 2,89	58,70 ± 3,33
M3	36,09 ± 3,15	73,32 ± 0,98
M4	82,52 ± 2,08	105,57 ± 2,06

Os resultados da análise de variância indicaram que ambas as variáveis (massa molar do ABC e adição de PHB) influenciaram tanto a quantidade de fármaco liberada após 30 min quanto após12 h de ensaio ($F_{calc.} > F_{tab}$; a = 0,01) (Fig. 6).

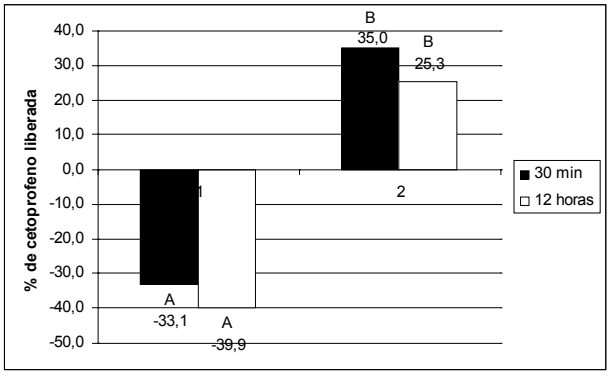

Figura 6. Estimativa dos efeitos (eixo x) da massa molar do acetobutirato de celulose (fator A) e da adição de poli(3-hidroxibutirato) (fator B) sobre Q%30min e Q%12h empregada na interpretação do planejamento fatorial 2^2.

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a influência da massa molar do acetobutirato de celulose e da adição do PHB sobre a morfologia das partículas, a eficiência de encapsulação e a liberação do cetoprofeno a partir de microesferas preparadas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente.

A eficiência de encapsulação do fármaco nas microesferas é influenciada por diversos fatores, como as características físico-químicas do fármaco e dos polímeros e também as variáveis do processo, como a velocidade de agitação, os solventes utilizados, a velocidade de evaporação do solvente e o tipo de emulsificante, entre outros (Freitas et al., 2005). Conforme apresentado nas Figuras 1 e 2, ambas as variáveis avaliadas neste estudo influenciaram significativamente a EE% do cetoprofeno. O aumento da massa molar do ABC provocou um efeito positivo, ou seja, um aumento do percentual de fármaco encapsulado. Por outro lado, a adição do PHB levou a um declínio dos valores de EE%. Sendo assim, as maiores eficiências de encapsulação foram obtidas quando se utilizou ABC com maior massa molar, sem a adição do PHB (formulação M1). Provavelmente esse fato está relacionado a um aumento na viscosidade da solução de ABC em função do aumento da massa molar. Quando foi empregado ABC com massa molar de 70.000 g mol^{-1}, obteve-se uma solução mais viscosa, o que pode ter dificultado a migração do fármaco para a fase externa, o qual permaneceu no interior das gotículas do solvente até a solidificação das microesferas, originando os altos valores de EE%. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado por Yang et al., (2000), que demonstraram que quando se utilizou uma maior concentração de poli(ácido lático) na fase interna da emulsão houve uma maior eficiência de encapsulação da albumina bovina, o que foi justificado pelo aumento da viscosidade da solução polimérica.

As características físico-químicas do fármaco a ser encapsulado também podem influenciar a eficiência de encapsulação. Em um trabalho realizado por Rinaldi et al., (2009), comprovou-se não haver influência da massa molar do ABC e da adição de PHB sobre a eficiência de encapsulação do anti-inflamatório piroxicam, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, com o cetoprofeno.

As condições utilizadas no processo de microencapsulação levaram à formação de partículas esféricas e com cristais de cetoprofeno aderidos à matriz polimérica, conforme observado na Figura 3. Dependendo da formulação empregada, microesferas com diferentes faixas de tamanhos foram obtidas (Fig. 4). O tamanho das microesferas pode ser influenciado por parâmetros do processo de microencapsulação, como concentração do emulsificante e velocidade de agitação (Freiberg & Zu, 2004). Como esses parâmetros foram mantidos inalterados no preparo de todas as formulações, a diferença no tamanho das microesferas está associada, principalmente, à massa molar do ABC. O aumento da massa molar do polímero aumentou a viscosidade da fase interna da emulsão e, consequentemente, dificultou a fragmentação em pequenas gotículas, originando, dessa forma, partículas de maior tamanho. Resultados semelhantes foram obtidos por Rinaldi et al., (2009).

Diversos fatores podem influenciar a liberação de fármacos a partir das microesferas como, por exemplo, a presença de cristais de fármaco próximos à superfície externa das partículas, a porosidade da matriz polimérica e o tamanho das microesferas, entre outros (Freitas et al., 2005).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que houve influência das variáveis analisadas sobre a liberação *in vitro* do cetoprofeno. Conforme demonstrado na Figura 6, o fator A (massa molar do ABC) provocou um efeito negativo sobre $Q\%_{30min}$ e $Q\%_{12h,}$ indicando que o aumento da massa molar do polímero provocou uma diminuição do efeito *burst* e um maior prolongamento da liberação do cetoprofeno. Já a adição de PHB causou um efeito positivo, levando a um aumento da liberação do fármaco após 30 min e 12 h.

A presença de cristais de fármaco na superfície externa das microesferas pode justificar a liberação inicial mais intensa (efeito *burst*), especialmente da formulação M4, visto que os cristais presentes na superfície têm mais facilidade para se dissolver no meio, ao passo que o fármaco presente no interior das microesferas tem maior dificuldade para ser solubilizado. Além disso, o aumento da porosidade da matriz polimérica em virtude da adição do PHB contribuiu para facilitar a liberação do cetoprofeno. Quando foi utilizado apenas o ABC, menores quantidades de fármaco foram liberadas após 30 min e 12

h. Isso se deve às características do polímero, que origina microesferas compactas, as quais dificultam a liberação do fármaco localizado no interior das partículas. Resultados semelhantes foram obtidos por Zanetti-Ramos et al., (2006), que evidenciaram que a liberação da carbamazepina a partir das microesferas de ABC foi extremamente lenta, sendo possível acelerar a liberação do fármaco após a adição de polietilenoglicol, que tornou as microesferas mais porosas.

Outro fator que pode ter influenciado a liberação do cetoprofeno foi o tamanho das microesferas. De maneira geral, quanto menor o diâmetro das partículas, menor é o caminho a ser percorrido pelo fármaco e, consequentemente, mais rápida é a sua liberação. Realmente, nesse estudo, observou-se que o tamanho das microesferas foi inversamente proporcional à liberação do fármaco. As que apresentaram tamanho maior (M1 e M2) liberaram o fármaco mais lentamente.

Através dos resultados obtidos no ensaio de liberação, pode-se concluir que é possível modular a liberação do cetoprofeno a partir das microesferas empregando diferentes proporções de ABC e PHB.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do FAP – Fundo de Apoio à Pesquisa da UNIVILLE.

ABSTRACT

Effects of cellulose acetate butyrate molar weight and addition of poly(3-hydroxybutyrate) on microsphere morphology and ketoprofen prolonged release

In the present study, cellulose acetate butyrate (CAB) microspheres containing ketoprofen were produced, with the objective of prolonging its release. The emulsion/solvent evaporation technique was used to make the spheres, varying the parameters (1) CAB molecular weight and (2) addition or not of poly(3-hydroxybutyrate) [PHB], to optimize drug encapsulation, following a 2^2 factorial design. Higher ketoprofen encapsulation efficiency was obtained when higher molecular weight CAB was used, while the addition of PHB caused a decrease in the percentage of encapsulated drug. All the preparations produced spherical particles, with drug crystals adhering to the external surface, and a porous polymer matrix when PHB was used. The *in vitro* release profiles indicated that lowering the CAB molecular weight led to a decrease in the drug initially released and a prolonged release. On the other hand, the addition of PHB accelerated the release of the ketoprofen from the microspheres.

***Keywords*:** microspheres. Ketoprofen. Delayed-release preparations.

REFERÊNCIAS

Bazzo GC, Lemos-Senna E, Gonçalves MC, Pires ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. J Braz Chem Soc. 2008; 19(5):914-21.

Bidone J, Melo APP, Bazzo GC, Carmignan F, Soldi MS, Pires ATN, Lemos-Senna E. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly (3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. Mater Sci Eng C. 2009; 29:588-93.

Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. Int J Pharm. 2004; 282**:**1-18.

Fundeanu G, Constantin M, Esposito E, Cortesi R, Nastruzzi C, Menegatti E. Cellulose acetate butyrate microcapsules containing dextran ion-exchange resins as self-propelled drug release system. Biomaterials 2005; 26:4337–47.

Kassab AC, Xu K, Denkbas EB, Dou Y, Zhao S, Piskin E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. J Biomater Sci. 1997; 8:947-61.

Martin MA, Miguens FC, Rieumont J, Sanchez R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. Colloids Surf. 2000; 17:111-6.

Ranade VV. Drug delivery systems. 2nd. ed. New York: CRC Press; 2004.

Rinaldi APT, Mazera SK, Pezzini BR, Zétola M, Bazzo GC. Preparo e caracterização de micropartículas de acetobutirato de celulose e poli(3-hidroxibutirato) contendo piroxicam. Acta Sci Health Sci. 2009; 31:51-6.

Schaffazick S R, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-químico de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím Nova 2006; 26:726-37.

Sweetman SR. Martindale: the complete drug reference. 33th. ed. London: Pharmaceutical Press; 2002.

Wise DL. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. New York: Marcel Dekker; 2000.

Yang YY, Chung TS, Bai XL, ChanWK. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. Chem Eng Sci. 2000; 55:2223-36.

Zanetti-Ramos B, Soldi M, Soldi V, Lemos-Senna E. The effect of polyethylene glycol on drug content, particle morphology and carbamazepine release profiles of sustained release microspheres prepared from cellulose acetate butyrate. Acta Farm Bonaer. 2006; 25:177-83.