

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FERNANDA ISADORA BONI

**Microesferas de goma gelana reticulada para liberação controlada de  
fármacos.**

Araraquara-SP

2014

FERNANDA ISADORA BONI

**Microesferas de goma gelana reticulada para liberação controlada de fármacos.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Farmacêutica - Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Dóris de Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Araraquara-SP

2014

# Agradecimentos

Agradeço a Deus por colocar em meu caminho ótimas pessoas, pela família e oportunidades que me foram concedidas.

À minha família, meus pais Wanderley e Eugenia e irmãs Claudia e Marília, por sempre me incentivarem. Todo o amor e apoio, principalmente durante esses cinco anos em Araraquara, sempre me encorajando nos momentos difíceis, orgulhando-se das minhas conquistas e compartilhando comigo os momentos de alegria.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, por me conceder a oportunidade da iniciação científica e que mesmo em pouco tempo de convívio se tornou, para mim, um exemplo de professor, pesquisador e pessoa que sempre me lembrarei.

À Profa. Dra. Ana Dóris de Castro que com muita sinceridade e honestidade se propôs a assumir a orientação desse trabalho. Agradeço os ensinamentos, a amizade, confiança e aos incentivos quanto ao futuro.

À Prof. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, minha coorientadora, inicialmente pela oportunidade, confiança, dedicação e amizade. Muito obrigada por toda sabedoria pacientemente transmitida durante minha iniciação científica e, principalmente por ser um exemplo pessoal e profissional de pesquisadora, sua visão, entusiasmo e competência certamente me servem de estímulo.

À Fabíola, por ter sido a pessoa que me incentivou a iniciar o estágio no laboratório de farmacotécnica. Agradeço a amizade, paciência e todo o tempo desprendido durante seu mestrado e doutorado, me auxiliando e transmitindo todo novo conhecimento que adquiria. Seu apoio, incentivo e dedicação certamente me fizeram crescer. Muito obrigada!

Aos alunos de pós graduação do laboratório, em especial Liliane, Natália, Roberta, Jéssica, Fernanda Kolenyak, Maíra e Valéria, por serem ótimas companheiras de laboratório, por sempre estarem dispostas a me ajudar e por me acolherem sempre muito bem.

Aos meus amigos Estela, Flávia, Jhohann e Bianca, por terem se tornado minha segunda família. Nunca ao chegar em Araraquara eu poderia imaginar que conheceria pessoas tão especiais. Dividimos muitos momentos e o importante é que hoje estamos aqui formados. Obrigada!

Aos professores Prof. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e Prof. Dr. Marlus Chorilli, por serem exemplos profissionais, pelos ensinamentos e convivência durante esses anos de graduação.

Às técnicas Magarete e Natália, pela prontidão em ajudar sempre que necessário e por cuidar do nosso laboratório.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela colaboração com o uso do Microscópio-Estereoscópio e analisador de imagens.

Agradeço ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro com a bolsa de iniciação científica concedida para o projeto.

*“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã”.*  
*Psicografia de Francisco C. Xavier; livro Indicações do Caminho.*

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva <i>et al</i> , 2003).                                                                                                                                      | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura da GG nativa (A) e a LA (B) (Adaptada de Osmalek, Froelich & Tasarek, 2014).....                                                                                                                                      | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema de obtenção das microesferas. ....                                                                                                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Dispositivo de Enslin adaptado para determinação de intumescimento .....                                                                                                                                                        | 28 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema teste de interação com a mucina.....                                                                                                                                                                                    | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática do ensaio de mucoadesão <i>ex vivo</i> (Adaptada de Carvalho <i>et al.</i> , 2010). ....                                                                                                              | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Espectro de absorção do cetoprofeno em etanol absoluto na região do UV.....                                                                                                                                                     | 34 |
| <b>Figura 8.</b> Curva analítica da absorbância em função da concentração de cetoprofeno. ....                                                                                                                                                   | 35 |
| <b>Figura 9.</b> Espectro de absorção na região do ultravioleta da gelana em etanol absoluto. ....                                                                                                                                               | 36 |
| <b>Figura 10.</b> Gráfico da eficiência de encapsulação. ....                                                                                                                                                                                    | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Fotomicrografia das microesferas contendo cetoprofeno 1%: (A) G1Al3A, (B) G1,5Al3A, (C) G2Al3A, (D) G2Al3B, (E) G1Al5A, (F) G1,5Al5A (G) G2Al5A e (H) G2Al5B, em aumento 10x lupa. ....                                        | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Distribuição granulométrica das micropartículas. ....                                                                                                                                                                          | 42 |
| <b>Figura 13.</b> Fotomicrografias das amostras evidenciando a morfologia de superfície das microesferas no aumento de 100X e 1000X. (A) G1Al3A; (B) G1,5Al3A; (C) G2Al3A; (D) G2Al5A; (E) G2Al3B; (F) G2Al5B; (G) G2Al3A-C e (H) G2Al5A-C. .... | 44 |
| <b>Figura 14.</b> Fotomicrografias evidenciando a morfologia interna das microesferas no aumento 200x e 1000X. (A) G1Al3A; (B) G1,5Al3A; (C) G2Al3A; (D) G2Al5A; (E) G2Al3B; (F) G2Al5B; (G) G2Al3A-C e (H) G2Al5A-C. ....                       | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Perfil de intumescimento das amostras em diferentes meios.....                                                                                                                                                                 | 47 |
| <b>Figura 16.</b> Influência do pH no potencial zeta das dispersões de GG.....                                                                                                                                                                   | 48 |
| <b>Figura 17.</b> Quantidade de mucina adsorvida vs quantidade de mucina adicionada por amostra. ....                                                                                                                                            | 51 |
| <b>Figura 18.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> do cetoprofeno.....                                                                                                                                                                        | 52 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Nomenclatura e composição das microesferas. ....                                                       | 33 |
| <b>Tabela 2.</b> Absorbância média de soluções de cetoprofeno medidas em curtos intervalos. ....                        | 36 |
| <b>Tabela 3.</b> Absorbância média soluções cetoprofeno medidas em dias diferentes por manipuladores diferentes. ....   | 37 |
| <b>Tabela 4.</b> Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de cetoprofeno..                       | 38 |
| <b>Tabela 5.</b> Diâmetro, circularidade média e índice de span de microesferas contendo cetoprofeno (1%) (n=100). .... | 40 |
| <b>Tabela 6.</b> Porcentagem de intumescimento das amostras em diferentes meios (t=90 min; média±DP). ....              | 46 |
| <b>Tabela 7.</b> Número de partícula fixadas à mucosa durante o ensaio. ....                                            | 52 |
| <b>Tabela 8.</b> Parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco. ....                                       | 54 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |                                                |
|-------|------------------------------------------------|
| LQ    | Limite de quantificação                        |
| IC    | Coeficiente angular da curva de calibração     |
| EE%   | Eficiência de encapsulação em porcentagem      |
| $Q_r$ | Quantidade de fármaco na massa de microesferas |
| $Q_t$ | Quantidade total de fármaco adicionada         |
| %I    | Porcentagem de intumescimento                  |
| GG    | Goma gelana                                    |
| PDI   | Cálculo do índice de polidispersidade          |
| LD    | Limite de detecção                             |
| LA    | Baixo grau de acetilação                       |
| CP    | Cetoprofeno                                    |



## SUMÁRIO

|    |                                                                                                                           |           |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO .....                                                                                                          | 12        |
| 2. | FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....                                                                                                | 15        |
|    | 2.1. Micropartículas poliméricas .....                                                                                    | 15        |
|    | 2.2. Goma gelana .....                                                                                                    | 17        |
| 3. | OBJETIVOS .....                                                                                                           | 21        |
| 4. | MATERIAIS .....                                                                                                           | 22        |
|    | 4.1. Matérias-primas principais .....                                                                                     | 22        |
|    | 4.2. Equipamentos principais.....                                                                                         | 22        |
| 5. | MÉTODOS .....                                                                                                             | 23        |
|    | 5.1. Obtenção das microesferas de goma gelana reticuladas com Al <sup>3+</sup> .....                                      | 23        |
|    | 5.2. Validação do método analítico de espectroscopia na região do ultravioleta para<br>quantificação do cetoprofeno. .... | 24        |
|    | <b>5.2.1. Determinação do espectro de absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta .....</b>                         | <b>24</b> |
|    | <b>5.2.2. Linearidade.....</b>                                                                                            | <b>24</b> |
|    | <b>5.2.3. Especificidade/Seletividade .....</b>                                                                           | <b>25</b> |
|    | <b>5.2.4. Precisão .....</b>                                                                                              | <b>25</b> |
|    | <b>5.2.5. Limite de detecção e de quantificação .....</b>                                                                 | <b>25</b> |
|    | <b>5.2.6. Exatidão .....</b>                                                                                              | <b>26</b> |
|    | 5.3. Avaliação da eficiência de encapsulação.....                                                                         | 26        |
|    | 5.4. Análise de tamanho, forma e morfologia das partículas.....                                                           | 27        |
|    | <b>5.4.1. Análise de tamanho e forma.....</b>                                                                             | <b>27</b> |
|    | <b>5.4.2. Análise de morfologia de superfície e estrutura interna.....</b>                                                | <b>27</b> |
|    | 5.5. Determinação do perfil de intumescimento .....                                                                       | 28        |
|    | 5.6. Análise da variação do potencial zeta com a variação de pH de dispersões<br>aquosas de goma gelana.....              | 29        |
|    | 5.7. Análise das propriedades mucoadesivas.....                                                                           | 29        |
|    | <b>5.7.1. Análise <i>in vitro</i> da interação com mucina .....</b>                                                       | <b>29</b> |
|    | <b>5.7.2. Avaliação da mucoadesão <i>ex-vivo</i>.....</b>                                                                 | <b>30</b> |
|    | 5.8. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco .....                                                    | 31        |
|    | 5.9. Análise da cinética de liberação do fármaco .....                                                                    | 32        |
|    | 5.10. Análise estatística dos resultados.....                                                                             | 32        |
| 6. | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                              | 32        |
|    | 6.1. Obtenção das microesferas de goma gelana reticuladas com Al <sup>3+</sup> .....                                      | 32        |

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.2. Validação do método analítico utilizado para quantificação do cetoprofeno por espectroscopia na região do ultravioleta ..... | 34        |
| <b>6.2.1. Determinação do espectro de absorção do cetoprofeno na região do UV .....</b>                                           | <b>34</b> |
| <b>6.2.2. Linearidade.....</b>                                                                                                    | <b>34</b> |
| <b>6.2.3. Especificidade/Seletividade .....</b>                                                                                   | <b>35</b> |
| <b>6.2.4. Precisão .....</b>                                                                                                      | <b>36</b> |
| <b>6.2.5. Limite de detecção e de quantificação .....</b>                                                                         | <b>37</b> |
| <b>6.2.6. Exatidão .....</b>                                                                                                      | <b>37</b> |
| 6.3. Avaliação da eficiência de encapsulação.....                                                                                 | 38        |
| 6.4. Análise de tamanho, forma e morfologia das partículas.....                                                                   | 39        |
| <b>6.4.1. Análise de tamanho e forma das partículas.....</b>                                                                      | <b>39</b> |
| <b>6.4.2 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna.....</b>                                                         | <b>43</b> |
| 6.5. Determinação do perfil de intumescimento .....                                                                               | 45        |
| 6.6. Análise da variação do potencial zeta com a variação de pH de dispersões aquosas de goma gelana.....                         | 47        |
| 6.7. Análise das propriedades mucoadesivas .....                                                                                  | 49        |
| <b>6.7.1 Análise <i>in vitro</i> da interação com mucina .....</b>                                                                | <b>50</b> |
| <b>6.7.2 Avaliação da mucoadesão <i>ex vivo</i> .....</b>                                                                         | <b>51</b> |
| 6.8 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco .....                                                             | 52        |
| 6.9 Análise da cinética de liberação <i>in vitro</i> do fármaco.....                                                              | 53        |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                         | <b>55</b> |

## RESUMO

A vetorização de fármacos para um órgão alvo representa um grande desafio no desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos. O uso de polímeros naturais na formulação de sistemas multiparticulados e sua modificação química por meio da reação de reticulação representam valiosas estratégias para aperfeiçoar o desempenho de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos. Neste trabalho, microesferas de goma gelana, contendo cetoprofeno (CP) como fármaco modelo, foram obtidas com sucesso através do método de geleificação ionotrópica utilizando o cátion  $\text{Al}^{3+}$ . A eficiência de encapsulação (EE%), foi elevada (68,79 a 87,52%), sendo as amostras com 2% de polímero as que apresentaram melhor EE%. As partículas apresentaram forma esférica, com circularidade entre 0,641 e 0,796 e diâmetro médio entre 701,292 e 980,322  $\mu\text{m}$ . Observou-se uma estrutura interna homogênea, sendo visível a presença de cristais de CP distribuídos no interior das microesferas, evidenciando a formação de sistema matricial. A morfologia de superfície revelou partículas com superfície irregular e a presença de fármaco aumentou a irregularidade de superfície. Nas amostras controle, o aumento da concentração da solução reticulante levou à formação de fissuras na superfície das microesferas. As amostras apresentaram elevada capacidade de intumescimento (%I), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na %I para os meios com diferentes valores de pH testados. O estudo de mucoadesão *in vitro* demonstrou a elevada quantidade de mucina adsorvida pelas microesferas e o ensaio *ex vivo* comprovou a elevada capacidade mucoadesiva das microesferas estudadas. O processo de liberação do fármaco apresentou comportamento pH dependente, com baixas taxas de liberação em pH ácido e um efeito “burst” da liberação em pH 7,4. O modelo de Weibull apresentou melhor correlação com os dados de liberação. Para a amostra G2Al5A, em ambos os valores de pH testados, a liberação do fármaco ocorre segundo um mecanismo complexo de liberação, envolvendo a difusão do fármaco, o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão da matriz, para a amostra G2Al3A em meio ácido o mesmo comportamento foi observado, entretanto no meio com valor de pH 7,4, o mecanismo de liberação do fármaco é governado principalmente pelo intumescimento da matriz e relaxamento das cadeias poliméricas.

## 1. INTRODUÇÃO

A via de administração oral de fármacos é de fácil adesão e administração por parte do paciente, sendo este um dos motivos para essa via ser extensamente utilizada na terapêutica, em relação a outras vias de administração, pela flexibilidade de dose, segurança e por ser capaz de explorar a capacidade absorptiva do trato gastrointestinal (TGI) (Fasano, 1998; Khafagy *et al.*, 2007; Pinto, 2010; Isha *et al.*, 2012).

As formas farmacêuticas sólidas convencionais de administração oral, após administradas, liberam o fármaco no sítio de absorção de forma relativamente rápida. Estes sistemas normalmente são compostos por excipientes como aglutinantes e desintegrantes que são responsáveis por alterar a velocidade de dissolução do fármaco (Pezzini *et al.*, 2007). Devido à variabilidade fisiológica, ocorre uma grande variação na resposta ao tratamento que utiliza formas farmacêuticas convencionais por essa via. (Pezzini *et al.*, 2007).

Em contrapartida, as formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada são capazes de vetorizar e/ou modular a liberação do fármaco, de modo a modificar seu tempo ou local de ação (Pezzini *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, reduzir as variações dos níveis plasmáticos e a frequência de administração, melhorando a adesão do paciente ao tratamento, reduzindo os efeitos colaterais do fármaco e, conseqüentemente, a variabilidade na resposta terapêutica (Ansel *et al.*, 2000).

A vetorização de fármacos para sítios específicos (órgãos, tecidos, células), representa um grande desafio no desenvolvimento de novos sistemas de liberação oral de fármacos, pois diversas barreiras impostas pelos diferentes ambientes do TGI devem ser transpostas até que o fármaco alcance com êxito o sítio de absorção. Dentre os diversos sítios de absorção do TGI, o cólon desperta particular interesse, tanto para o tratamento de patologias locais quanto sistêmicas, por apresentar tempo de trânsito mais prolongado, reduzida atividade proteolítica e

pH próximo da neutralidade (Philip & Philip, 2000). Portanto, o cólon torna-se um sítio ideal para a liberação de fármacos, principalmente aqueles de baixa permeabilidade e/ou estabilidade nas porções superiores do TGI (Friend, 1991; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

Almejando a liberação sítio específica, as abordagens mais frequentes incluem a obtenção de sistemas com propriedades pH dependentes, ligação covalente do fármaco a carreadores ou sistemas que são degradados por enzimas específicas da região alvo. Entre eles, os pH-dependentes e de degradação enzimática específica demonstram ser alternativas mais viáveis e seguras, tendo em vista a variação do tempo de trânsito e valores de pH ao longo do TGI (Maior *et al.*, 2008; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

Uma grande variedade de polímeros sintéticos, naturais ou semissintéticos, podem encontrar aplicações no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (Coimbra, 2010). O crescente interesse na utilização de polímeros naturais hidrofílicos na composição de sistemas carreadores de fármacos é justificável por sua ampla disponibilidade na natureza e relativo baixo custo (Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014).

A grande variedade de estruturas permite que esses polímeros sejam modificados quimicamente e/ou fisicamente, conferindo novas propriedades que podem ser moduladas de acordo com necessidades específicas (Friend, 2005; Carbinatto *et al.*, 2012; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

Dentre as formas farmacêuticas de liberação modificada, a utilização de sistemas matriciais como carreadores de fármacos é uma estratégia amplamente explorada devido às vantagens inerentes a estes sistemas, como versatilidade, eficácia e baixo custo de produção. Durante a liberação do fármaco da matriz, estão envolvidos processos físicos e químicos, que ocorrem por mecanismos isolados ou por uma combinação de mecanismos, que são a difusão

do meio para o interior da matriz, a dissolução do fármaco, o intumescimento e/ou a erosão do polímero e a difusão do fármaco (Lyra *et al.*, 2007).

A microencapsulação é um dos procedimentos utilizados visando a obtenção de sistemas que permitam a liberação em um sítio específico. Sistemas multiparticulados apresentam vantagens em relação às formas monolíticas, como tempo de esvaziamento gástrico mais previsível, distribuição mais uniforme do fármaco sobre a superfície do TGI e redução do risco de irritação da mucosa por acúmulo do fármaco em um único ponto do tecido (Suave *et al.*, 2006). Para a obtenção de micropartículas, existem diversos métodos propostos, como emulsificação-remoção do solvente, coacervação, geleificação ionotrópica, polimerização, spray-drying, atomização em fluidos supercríticos, dentre outros (José *et al.*, 2000).

A geleificação ionotrópica é um método que se baseia na complexação entre polieletrólitos e íons de carga contrária, os quais sofrem reticulação ao entrarem em contato. A formação de ligações cruzadas intra e intermoléculas do polímero origina hidrogéis, que são redes tridimensionais hidrofílicas capazes de aprisionar o fármaco no seu interior e, posteriormente, absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (Patil *et al.*, 2010).

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo linear e aniônico, produzido a partir de fermentação microbiológica (Milas *et al.*, 2007) e é amplamente utilizada como aditivo na indústria de alimentos.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de microesferas a partir hidrogéis de polissacarídeos por geleificação ionotrópica tem sido foco de importantes estudos, pois alterações na concentração de polímero e no grau de reticulação podem levar à produção de sistemas que possibilitem diferentes perfis de liberação do fármaco e a adequação a objetivos específicos (Agnihotri *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2013; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

O cetoprofeno é um antiinflamatório não-esteroidal, amplamente utilizado para o tratamento de doenças musculoesqueléticas e articulares. Ele é rapidamente absorvido a partir do TGI e apresenta meia vida biológica curta, de 2 h. Quando administrado por via oral, provoca certos efeitos colaterais, como irritação gástrica, ulceração e hemorragia. A curta meia vida biológica e os efeitos colaterais associados fazem do cetoprofeno um fármaco apropriado para as formulações de liberação controlada (Mangond *et al.*, 2009).

No presente trabalho, microesferas de goma gelana contendo cetoprofeno como fármaco modelo foram desenvolvidas pelo método de geleificação ionotrópica com íons  $Al^{3+}$ . Os sistemas desenvolvidos foram caracterizados quanto ao tamanho, forma e morfologia de superfície. Também foram avaliados o perfil de intumescimento, a eficiência de encapsulação, as propriedades mucoadesivas e o perfil de liberação do fármaco das amostras a partir do teste de dissolução. Buscou-se estudar a influência da alteração de parâmetros como pH e concentração da dispersão polimérica e concentração da solução reticulante nas características das amostras.

## **2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **2.1. Micropartículas poliméricas**

É crescente o interesse na veiculação de fármacos em micropartículas poliméricas, devido à variedade de materiais e técnicas de obtenção, relativamente simples, de baixo custo e que recorrem a equipamentos convencionais.

Sistemas multiparticulados são capazes de alterar a liberação e absorção do fármaco, protegendo-o de ambientes pouco favoráveis e vetorizando sua liberação para órgãos específicos, em quantidade suficiente para maximizar a concentração local e minimizar os efeitos colaterais sistêmicos (Patil & Sawant, 2011). As micropartículas podem apresentar tamanho de 1 a 1000 $\mu m$  e, devido ao tamanho reduzido, apresentam comportamento

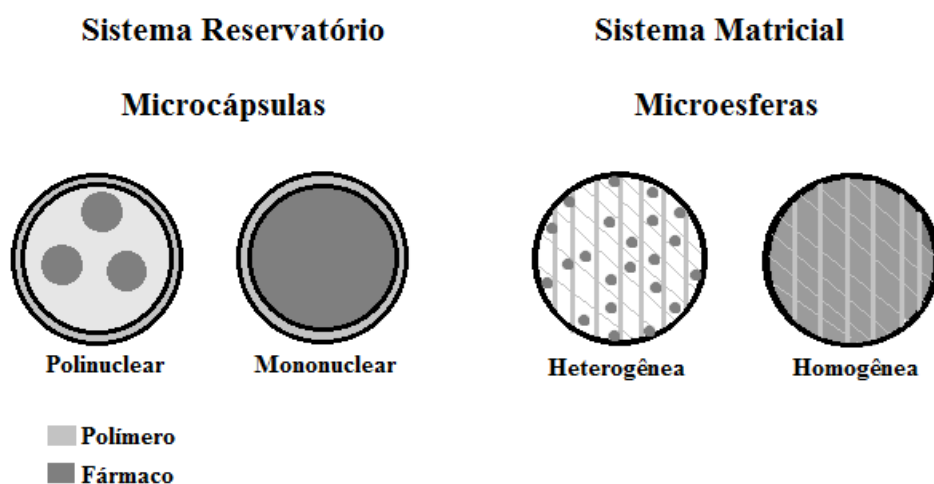
semelhante ao dos líquidos no TGI; portanto, sua passagem pelo piloro estomacal não é limitada pela presença de alimentos (Bitencourt, 2011).

Estes sistemas são divididos em dois tipos: os reservatórios e os matriciais que incluem as microcápsulas e as microesferas, respectivamente (Figura 1) (Suave *et al.*, 2006).

As microcápsulas são sistemas do tipo reservatório, constituídos de um núcleo interno (fármaco) o qual pode ser sólido, líquido ou gasoso, revestidas por uma membrana controladora das taxas de liberação, geralmente polimérica (Suave *et al.*, 2006). Essas microcápsulas podem ser mononucleares, apresentando um único núcleo, ou polinucleares, constituídas por vários núcleos (Silva *et al.*, 2003).

Já as microesferas são sistemas do tipo matricial ou monolítico, ou seja, de estrutura compacta, constituída por uma matriz, geralmente polimérica, na qual o fármaco pode estar dissolvido ou disperso. Estes sistemas podem ser classificados como homogêneos, quando o fármaco encontra-se no estado molecular ou dissolvido, ou heterogêneos se o fármaco estiver disperso (Figura 1).

**Figura 1.** Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Adaptado de Silva *et al.*, 2003).





Dentre os métodos de microencapsulação mais descritos, podemos citar o de geleificação ionotrópica, que é simples, não necessita de solventes orgânicos tóxicos e possibilita a transposição para escala industrial. O método baseia-se na reticulação do polímero com íons de carga oposta, de modo a formar uma rede tridimensional que aprisiona o fármaco. Para a obtenção das partículas, utiliza-se uma dispersão do polímero e uma solução reticulante, sendo que o fármaco pode ser dissolvido ou disperso em uma das fases. Com o gotejamento de uma fase na outra, ocorre a formação das micropartículas. Para a escolha do método mais adequado, deve-se levar em consideração o tipo de fármaco que se deseja encapsular, o mecanismo de liberação desejado e a aplicação pretendida (Suave *et al.*, 2006).

## 2.2. Goma gelana

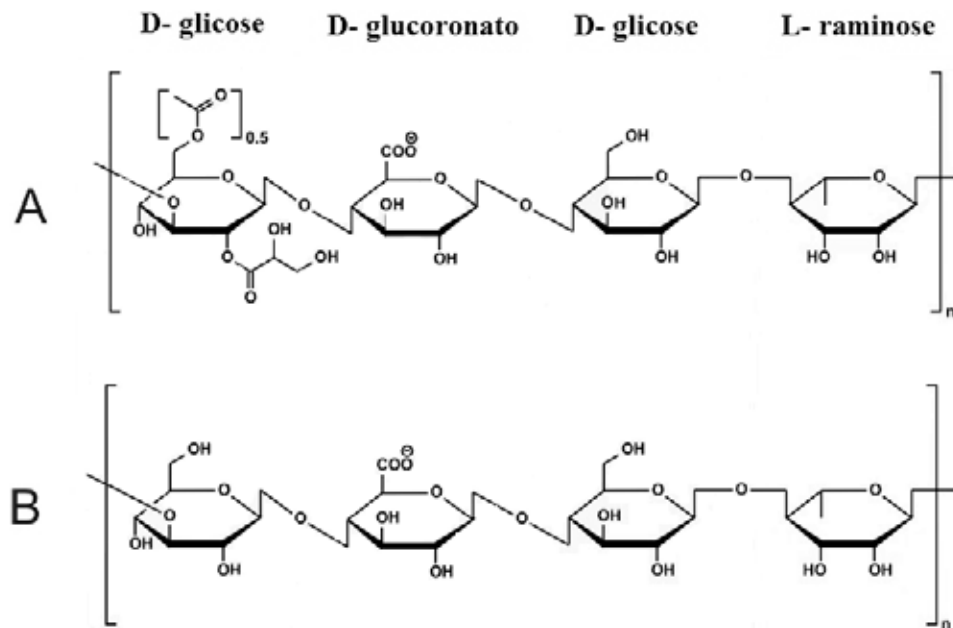
A GG é um exopolissacarídeo hidrofílico, linear e aniônico obtido pelo processo de fermentação aeróbica do microrganismo *Sphingomonas elodea* (Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014).

A GG é extensamente explorada no setor alimentício, como espessante e formador de filme, por apresentar elevada capacidade de geleificação, mesmo em baixas concentrações, ser atóxica, biodegradável e de relativo baixo custo (Picone & Cunha, 2013; Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014). Sua estrutura apresenta unidades de  $\alpha$ -L-ramnose;  $\beta$ -1,3-D-glicose,  $\beta$ -1,4-D-ácido glicurônico na razão 1:2:1 e contém dois tipos de substituintes acil, L- gliceril e acetil (Giavasis *et al.*, 2000; Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014).

A GG pode passar por um processo de hidrólise alcalina, perdendo ambos os substituintes, L-gliceril e acetil, sendo então denominada de LA, ou seja, GG de baixo grau de

acetilação (Figura 2). Seu pKa é próximo de 3,5 devido à presença dos resíduos de ácido glicurônico. (Kang *et al.*, 1982; Racovita *et al.*, 2009; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

**Figura 2.** Estrutura da GG nativa (A) e a LA (B) (Adaptada de Osmalek, Froelich & Tasarek, 2014).



Na GG nativa, a presença dos grupos acetil e gliceril na periferia da molécula, dificulta a associação das cadeias no processo de geleificação, formando um empacotamento menos efetivo. Por esta razão, utiliza-se a GG de baixo grau de acetilação. (Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014).

Em solução aquosa, a geleificação da GG é acompanhada pela transição conformacional das cadeias de espirais isoladas para dupla hélice e o arranjo das duplas hélices forma zonas de junção ordenadas, resultando em uma rede tridimensional (Bayarri *et al.*, 2001; Picone & Cunha, 2013; Osmalek; Froelich & Tasarek, 2014).

A formação de hidrogéis de GG é dependente de temperatura e pode ser induzida pela presença de cátions divalentes como o Ca<sup>2+</sup> (Racovita *et al.*, 2009).

Devido à habilidade para formar microcápsulas de hidrogel na presença de cátions divalentes, a gelana tem sido estudada para a obtenção de sistemas de liberação controlada de diferentes fármacos. Embora vários estudos tenham sido realizados empregando a reticulação iônica da gelana com  $\text{Ca}^{2+}$  (Agnihotri *et al.*, 2006; Rajinikanth & Mishra, 2007; Babu *et al.*, 2010), poucos são os relatos de estudos em que tenham avaliado a formação de microcápsulas de gelana reticuladas com  $\text{Al}^{3+}$ .

Reddy e Tammishetti (2002), em estudo com carboximetil guar, relataram que o  $\text{Al}^{3+}$ , devido à sua valência mais alta que a do íon cálcio, promoveu uma reticulação mais rápida, além de uma maior capacidade de incorporação e um tempo de liberação mais prolongado.

Embora recente estudo tenha demonstrado a possibilidade de formação de microcápsulas por reticulação da gelana com  $\text{Al}^{3+}$ , as partículas obtidas permitiram a liberação de grande parte do fármaco encapsulado, glipizide, em apenas 2 horas em meio entérico (Maiti *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de novas matrizes poliméricas em formas farmacêuticas sólidas têm sido foco de importantes pesquisas realizadas em nosso grupo de pesquisa, particularmente explorando a mistura de biopolímeros naturais, para a obtenção de carreadores de fármacos com propriedades moduladas para necessidades terapêuticas específicas.

Assim, micropartículas da mistura de gelana e pectina foram obtidas com êxito pelo método de geleificação ionotrópica, utilizando  $\text{Al}^{3+}$ . As propriedades mucoadesivas e o efetivo controle das taxas de liberação ao longo do TGI foram demonstrados (Prezotti; Cury & Evangelista, 2014). Atualmente, micro e nanopartículas vêm sendo obtidas a partir dessa mistura, através de dupla reticulação, para a liberação cólon-específica de fármaco antitumoral, enquanto microcápsulas de GG revestidas com filmes de amido resistente/pectina vêm sendo investigadas para administração oral de insulina. A associação de amido

retrogradado à gelana para a obtenção de micropartículas por dupla reticulação vem sendo avaliada para a liberação cólon específica de fármacos.

Dessa forma, o presente estudo com microesferas de goma gelana obtidas pela geleificação ionotrópica com  $\text{Al}^{3+}$  apresentou grande importância dentro do grupo de pesquisa, para estudos comparativos com os sistemas citados anteriormente.

### **3. OBJETIVOS**

Obtenção de microesferas de goma gelana contendo cetoprofeno como fármaco modelo e avaliação da influência da concentração de reticulante, de polímero e da variação de pH da dispersão nas características das microesferas.

## **4. MATERIAIS**

### **4.1. Matérias-primas principais**

- cetoprofeno (Sigma)
- goma gelana (Kelcogel<sup>®</sup> CG-LA - CP Kelco)
- mucina tipo II (Sigma Aldrich<sup>®</sup>)
- cloreto de alumínio hexahidratado (Vetec)
- fosfato de sódio tribásico 12.H<sub>2</sub>O (Henrifarma)
- fosfato de potássio monobásico (Vetec)
- hidróxido de sódio (Grupo Química)
- ácido clorídrico (Quimis)

### **4.2. Equipamentos principais**

- Agitador mecânico (Quimis)
- Balança Analítica (Mettler Toledo)
- Centrífuga (Sorvall TC)
- Dispositivo para determinação de intumescimento segundo Enslin
- Espectrofotômetro UV-Vis (Hewlett Packard-Kayak<sup>®</sup> XA)
- Homogeneizador de sangue (Phoenix)
- Microscópio-Estereoscópio com dispositivo de captura e análise de imagens (Leica MZ APO)
- Aparelho dissolutor Hanson Research (ST8 *Plus*)
- Peagômetro (Micronal)

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Obtenção das microesferas de goma gelana reticuladas com $\text{Al}^{3+}$

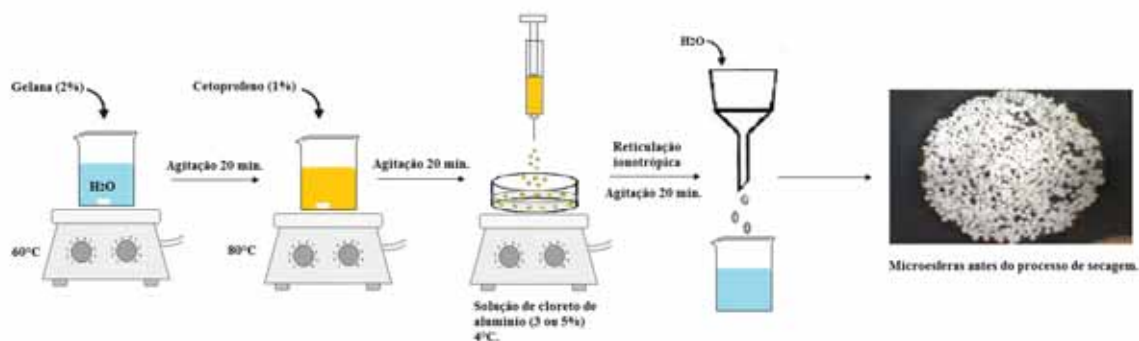
Dispersões aquosas de GG em diferentes concentrações (1,0%, 1,5% e 2%) foram preparadas, utilizando água com conservantes metilparabeno e propilparabeno nas concentrações 0,18% e 0,02%, respectivamente. Adicionou-se a goma gelana à água, sob agitação magnética e aquecimento (60 °C) até completa dispersão do polímero e essas condições foram mantidas por 20 minutos para completa homogeneização.

As dispersões poliméricas foram preparadas em valores de pH diferentes: 4,0 (acidificado com HCl 0,1N) e 8,0 (alcalinizado com NaOH 0,1N). As dispersões poliméricas foram gotejadas com auxílio de seringa e agulha sem bisel 23G (0,6mm) sobre solução reticulante  $\text{AlCl}_3$  nas concentrações 3% e 5% (m/V), previamente resfriadas em banho de gelo (4°C). O sistema foi mantido sob agitação magnética durante 20 minutos adicionais a fim de completar a reação de reticulação. As partículas obtidas foram separadas por filtração, lavadas com 150mL de água purificada, secas em temperatura ambiente e armazenadas em dessecador sob vácuo (Prezotti; Cury & Evangelista, 2014).

Para obtenção de microesferas com fármaco, cetoprofeno 1% (m/V) foi adicionado à dispersão polimérica, sob agitação e aquecimento (80°C) até sua completa dispersão, a qual foi gotejada em solução de  $\text{Al}^{3+}$ , seguindo o procedimento descrito anteriormente (Figura 3).

As amostras foram denominadas de acordo com a concentração de gelana (1,0%; 1,5% e 2,0% como 1; 1,5 e 2, respectivamente), a concentração da solução reticulante (3,0 ou 5,0% como Al3 ou Al5, respectivamente) e acrescidas da letra A ou B, representando o pH ácido ou alcalino da dispersão polimérica (pH 4,0 e 8,0), respectivamente e C, representando as amostras sem fármaco. Como exemplo, G1Al3A que representa a dispersão ácida contendo 1% de polímero e reticulada em solução de alumínio 3%.

**Figura 3.** Esquema de obtenção das microesferas.



## 5.2. Validação do método analítico de espectroscopia na região do ultravioleta para quantificação do cetoprofeno.

Para validação do método analítico para quantificação do CP por espectrofotometria na região do UV, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, especificidade/seletividade, precisão intracorrida, precisão intercorrida, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão, como preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; USP, 2011; ICH, 2005).

### 5.2.1. Determinação do espectro de absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta

Uma solução de cetoprofeno (50µg/mL) em etanol absoluto foi submetida a uma varredura entre 200 e 400nm, em espectrofotômetro UV-Vis para a verificação do comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção.

### 5.2.2. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de uma curva analítica do cetoprofeno, a partir de uma solução estoque de concentração de 200µg/mL do fármaco em etanol absoluto.



Por diluição, foram preparadas as soluções, com concentrações variando de 5 a 22,5µg/mL, em triplicata.

### 5.2.3. Especificidade/Seletividade

Neste ensaio buscou-se observar a interferência da matriz polimérica no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco ( $\lambda=254\text{nm}$ ). A especificidade/seletividade foi determinada avaliando-se o espectro de absorção da GG em solução. Preparou-se uma solução contendo 20µg/mL de polímero, a qual foi submetida a varredura entre 200 e 400nm em espectrofotômetro UV-VIS.

### 5.2.4. Precisão

Para avaliação deste parâmetro foram consideradas a repetibilidade e a precisão intermediária. Partindo-se de uma solução etanólica de CP na concentração de 200µg/mL, foram preparadas três diluições nas concentrações 7,5µg/mL; 15µg/mL e 20µg/mL representantes, respectivamente, das concentrações baixa, média e alta, para análise na região do UV.

### 5.2.5. Limite de detecção e de quantificação

Para determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) foram utilizadas soluções do fármaco em concentrações decrescentes: 5µg/mL; 4µg/mL e 3µg/mL.

As absorbâncias das soluções foram medidas em triplicata e o LD e LQ foram calculados através das equações 1 e 2:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: LD= limite de detecção,  $DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do y, IC = inclinação da curva de calibração e LQ=limite de quantificação.

### 5.2.6. Exatidão

A partir de uma solução de CP de 200µg/mL, foram feitas diluições para as concentrações 5, 10 e 15µg/mL, (baixa, média e alta, respectivamente). Foram realizadas cinco medidas por concentração e a exatidão foi calculada pela equação 3.

$$\text{Exatidão}(\%) = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:  $C$  é a concentração média determinada experimentalmente e  $C_0$  é a concentração teórica.

### 5.3. Avaliação da eficiência de encapsulação

Para determinar as melhores condições experimentais do teste de eficiência de encapsulação (EE%), foi realizado um teste preliminar em que se submeteu as amostras a diferentes períodos de agitação.

Uma massa de microesferas foi precisamente pesada e colocada em tubo de centrífuga de forma que, teoricamente, houvesse 1mg de fármaco em cada amostra. Adicionou-se às amostras 2 gotas de solução tampão fosfato pH 7,4 para permitir o intumescimento das microesferas. Em seguida, as microesferas foram trituradas no próprio tubo com bastão de vidro, para que não houvesse perda de material e, em seguida, foram adicionados 10mL de etanol absoluto para total extração do fármaco. Os tubos foram fechados e selados com filme plástico e a preparação foi mantida em temperatura ambiente sob agitação em homogeneizador de sangue por 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5 e 6 horas, a fim de se determinar o melhor tempo para a completa extração do fármaco.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o conteúdo de fármaco no sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro UV-VIS ( $\lambda=254\text{nm}$ ).

Após a realização do teste preliminar, padronizou-se tempo de agitação de 1,5 horas e eficiência de encapsulação foi calculada através da equação 4.

$$EE\% = \frac{Q_r}{Q_t} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: EE% = eficiência de encapsulação,  $Q_t$  = quantidade total de fármaco adicionada e  $Q_r$  = quantidade de fármaco na massa de microesferas.

## 5.4. Análise de tamanho, forma e morfologia das partículas

### 5.4.1. Análise de tamanho e forma

O tamanho e a forma das partículas foram analisados em estereoscópio Leica MZ APO®. As amostras foram dispostas em vidro de relógio e as imagens captadas com o auxílio do programa *Motic Images Advance 2.0*, utilizando-se aumento de 10 vezes. Foram avaliados a circularidade e o diâmetro do círculo equivalente de 100 microesferas de cada formulação, a partir da digitalização das imagens em computador, utilizando-se o programa analisador de imagem, *Motic Images Advance 3.2*. A média e o desvio padrão dos resultados obtidos foram calculados, assim como o índice de Span, por meio da equação 5.

$$\text{Span} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que  $D_{90}$ ,  $D_{10}$  e  $D_{50}$  são os diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente

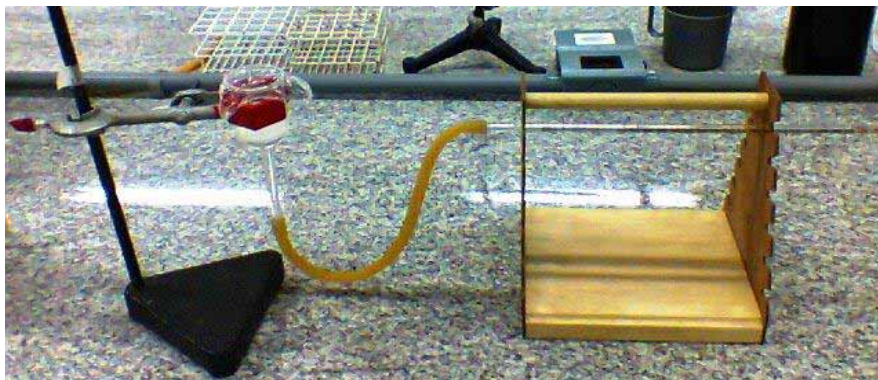
### 5.4.2. Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F. Para avaliação da estrutura interna, as microesferas passaram por um processo de criofratura. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla face e fotomicrografias foram obtidas no aumento de até 1000 vezes.

### 5.5. Determinação do perfil de intumescimento

O perfil de intumescimento foi determinado utilizando-se dispositivo de Enslin adaptado (Voigt, 2000; Cury, 2005). O dispositivo foi montado, utilizando-se funil com placa de vidro sinterizado e pipeta graduada de 2mL (Figura 4). O perfil de intumescimento das amostras foi determinado em meios com valores de pH que simulassem as diferentes porções do TGI: HCl pH 1,2, tampão fosfato pH 7,4 e tampão fosfato pH 6,0. Para realização do ensaio, uma massa precisamente pesada das amostras foi disposta sobre a placa de vidro sinterizado do funil do dispositivo de Enslin. .

**Figura 4.** Dispositivo de Enslin adaptado para determinação de intumescimento



O volume do meio absorvido pela amostra foi determinado nos tempos de 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos em % de meio absorvido em relação à massa da amostra, de acordo com a equação 6.

$$\%I = \frac{V(\text{mL})}{m(\text{g})} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que: %I = porcentagem de intumescimento, V (mL) = volume de meio absorvido e m(g) = massa inicial da amostra.

## **5.6. Análise da variação do potencial zeta com a variação de pH de dispersões aquosas de goma gelana**

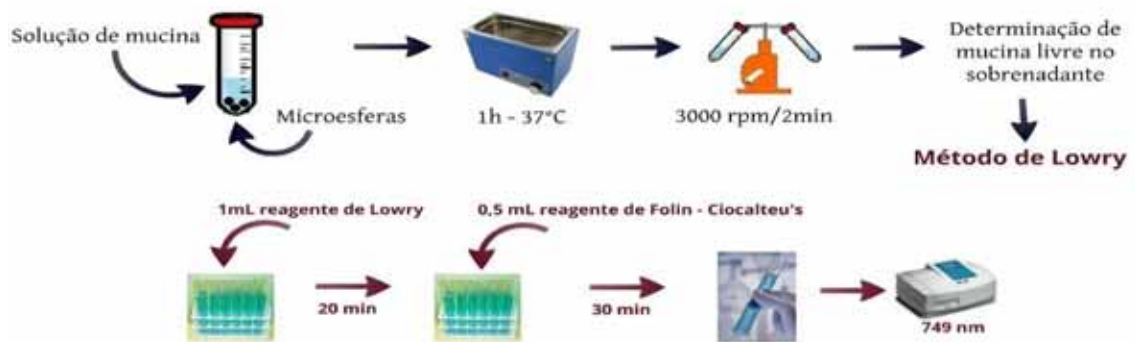
O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas. Para medição do potencial zeta utilizou-se o equipamento Zetasizer-Nano ZS<sup>®</sup> (Malvern Instruments) por meio da técnica de espalhamento de luz eletroforético. A avaliação da influência do pH na carga da GG pode auxiliar no esclarecimento do mecanismo de mucoadesão do sistema desenvolvido. Para a avaliação da influência do pH nos valores de potencial zeta, escolheu-se a concentração de 0,5mg/mL e o pH foi ajustado para os valores 1,6; 3,2; 4,5; 5,4; 6,1; 7,4; 8,2; 9,5 e 11, utilizando-se HCl ou NaOH (0,1 e 1M).

## **5.7. Análise das propriedades mucoadesivas**

### **5.7.1. Análise *in vitro* da interação com mucina**

Para esse ensaio foram selecionadas as amostras G2Al3A e G2Al5A, as quais apresentaram maior circularidade e melhor eficiência de encapsulação. Amostras sem fármaco foram utilizadas como controle. A propriedade mucoadesiva das microesferas foi analisada por meio da interação *in vitro* com a mucina (Dhawan *et al.*, 2004). Para o teste, 20 mg de cada amostra foram mantidas em contato com soluções aquosas de mucina tipo II em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200µg/mL) durante 1 hora, em banho termostatizado a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de mucina livre, através do ensaio colorimétrico com reagente de Lowry. A leitura foi realizada por espectrofotometria na região do visível no comprimento de onda de 749nm (Figura 5) e as concentrações calculadas a partir da equação da reta  $y = 0,0089x + 0,0624$ , obtida por meio da curva de calibração com albumina de soro bovino.

**Figura 5.** Esquema teste de interação com a mucina



O ensaio foi realizado em triplicata.

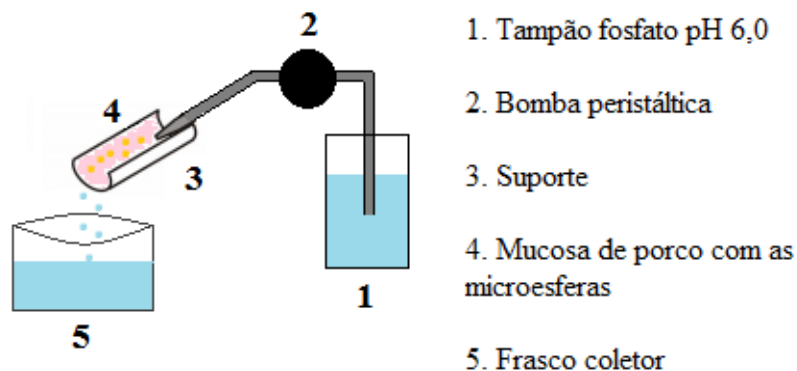
#### 5.7.2. Avaliação da mucoadesão *ex-vivo*.

A camada de muco apresenta uma estrutura complexa e os mecanismos que regem o processo de mucoadesão são complexos e não ocorrem de forma isolada. Dessa forma, o teste *ex vivo* tem como objetivo mimetizar as condições em que o sistema será exposto, avaliando a capacidade de aderir ao muco que reveste o epitélio.

O teste de mucoadesão *ex vivo* utilizando mucosa de porco foi baseado no procedimento proposto por Rao e Buri (1989) e adaptado por Prezotti; Cury & Evangelista (2014).

Inicialmente a mucosa da região colônica foi cortada longitudinalmente, lavada com solução salina por 10 minutos para remover sujidades e fixada em um suporte. Em seguida, 30 microesferas foram cuidadosamente dispostas sobre a mucosa e permitiu-se um tempo de repouso de 20 minutos para que ocorresse o intumescimento das partículas e o processo de mucoadesão fosse estabelecido. O conjunto foi transferido para um suporte inclinado ( $\sim 30^\circ$ ) e irrigado com tampão fosfato pH 6,0, em fluxo constante (30mL/min) durante 5 minutos (Figura 6).

**Figura 6.** Representação esquemática do ensaio de mucoadesão *ex vivo* (Adaptada de Carvalho *et al.*, 2010).



A porcentagem de mucoadesão foi determinada visualmente de acordo com o número de partículas que permaneceram fixadas à mucosa.

### 5.8. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco

Para avaliação do perfil de liberação do fármaco, realizou-se o teste de dissolução *in vitro*, utilizando o aparelho dissolutor Hanson Research (ST8 Plus), equipado com o aparato I (cesto), sob agitação de 50 rpm. O teste foi conduzido em meios com diferentes valores de pH, buscando mimetizar as variações de pH ao longo do TGI a 37°C: meio gástrico simulado sem enzimas (900mL de HCl 0,1N pH 1,2 com adição de 0,75% de laurilsulfato de sódio) durante 120 minutos; meio entérico simulado sem enzimas (900mL de tampão fosfato pH 7,4) durante 240 minutos e meio colônico, pelo ajuste de pH para 6,0 através da adição de HCl 2,0 N, por 90 minutos. Alíquotas de 3mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, e os meios foram repostos à mesma temperatura. A quantidade de fármaco liberada foi determinada por espectrofotometria no UV-Visível, em 258nm e 260nm, comprimentos de onda de máxima absorção do fármaco, determinados por meio de testes preliminares, para cada um dos meios, respectivamente. O ensaio foi realizado com as

amostras com elevada eficiência de encapsulação e circularidade e com o fármaco livre para uma análise comparativa. A quantificação foi feita por espectrofotometria, utilizando uma metodologia validada por Prezotti (2012), a partir das equações da reta obtidas em todos os meios testados.

### **5.9. Análise da cinética de liberação do fármaco**

A liberação do fármaco a partir de variados sistemas pode ser descrita utilizando diversos modelos cinéticos, entre os quais o perfil de dissolução é representado em função do tempo relacionado à quantidade de fármaco liberado do sistema (Costa; Lobo & Costa, 2002).

Diferentes modelos matemáticos (primeira ordem, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Baker and Lonsdale e Hixon and Crowell) foram aplicados aos dados de dissolução *in vitro*. Para a escolha do modelo que melhor representasse a cinética de dissolução, utilizou-se o coeficiente de correlação  $R^2$ , sendo que os valores obtidos mais próximos de 1,0, correspondem à maior adequação ao modelo (Costa; Lobo & Costa, 2002, Dash *et al.*, 2010).

### **5.10. Análise estatística dos resultados**

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Obtenção das microesferas de goma gelana reticuladas com $Al^{3+}$**

A concentração polimérica de 1% foi de fácil dispersão, necessitou ser mantida sob aquecimento para o gotejamento e, em todos os valores de pH e em ambas as concentrações de reticulante, houve a formação de microesferas irregulares, com formação de caudas e levemente achatadas, mas foram utilizadas na caracterização de tamanho, morfologia e eficiência de encapsulação.



As dispersões nas concentrações 1,5% e 2% de polímero foram de fácil dispersão e possibilitaram a formação de microesferas regulares e esféricas, quando gotejadas em solução reticulante 3%.

A dispersão contendo fármaco apresentou pH 4,0 e esse valor foi mantido sem necessidade de alteração para as amostras de pH ácido. Para as amostras de pH alcalino, adicionou-se NaOH 0,1N até atingir o valor de pH 8,0. A alteração de pH para a faixa alcalina foi de difícil execução, por ocorrer precipitação do cetoprofeno com o resfriamento da dispersão e por ser necessário adicionar um grande volume de NaOH, por isso realizou-se a alteração de pH nas amostras com 2% de goma gelana, que eram de fácil gotejamento e permitiam a obtenção de micropartículas com forma mais esférica.

As amostras controle também foram obtidas apenas na concentração 2% de polímero, pois em concentrações inferiores, após a secagem, as micropartículas apresentavam forma muito irregular e aglomeração. Cada amostra foi denominada de acordo com sua composição, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Nomenclatura e composição das microesferas.

| Sigla    | Concentração de goma gelana (%) | Concentração de $Al^{3+}$ (%) | Concentração de fármaco (%) | Valor de pH da dispersão |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| G1Al3A   | 1                               | 3                             | 1                           | 4                        |
| G1Al5A   | 1                               | 5                             | 1                           | 4                        |
| G1,5Al3A | 1,5                             | 3                             | 1                           | 4                        |
| G1,5Al5A | 1,5                             | 5                             | 1                           | 4                        |
| G2Al3A   | 2                               | 3                             | 1                           | 4                        |
| G2Al5A   | 2                               | 5                             | 1                           | 4                        |
| G2Al3B   | 2                               | 3                             | 1                           | 8                        |
| G2Al5B   | 2                               | 5                             | 1                           | 8                        |
| G2Al3A-C | 2                               | 3                             | 0                           | 4                        |
| G2Al5A-C | 2                               | 5                             | 0                           | 4                        |

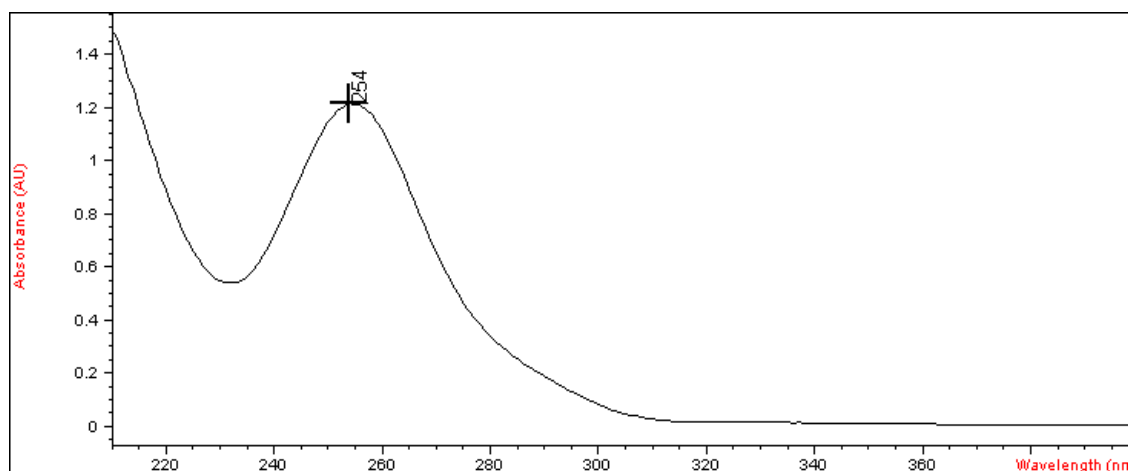
## 6.2. Validação do método analítico utilizado para quantificação do cetoprofeno por espectroscopia na região do ultravioleta

Para a determinação da eficiência de encapsulação foi necessária a validação do método analítico, demonstrando assim que o método escolhido é apropriado, conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; USP, 2011; ICH, 2005).

### 6.2.1. Determinação do espectro de absorção do cetoprofeno na região do UV

A Figura 7 mostra o espectro de absorção do cetoprofeno (50µg/mL) na região UV a partir de uma solução obtida em etanol absoluto como solvente. O pico de máxima absorção ocorre em 254nm.

**Figura 7.** Espectro de absorção do cetoprofeno em etanol absoluto na região do UV.

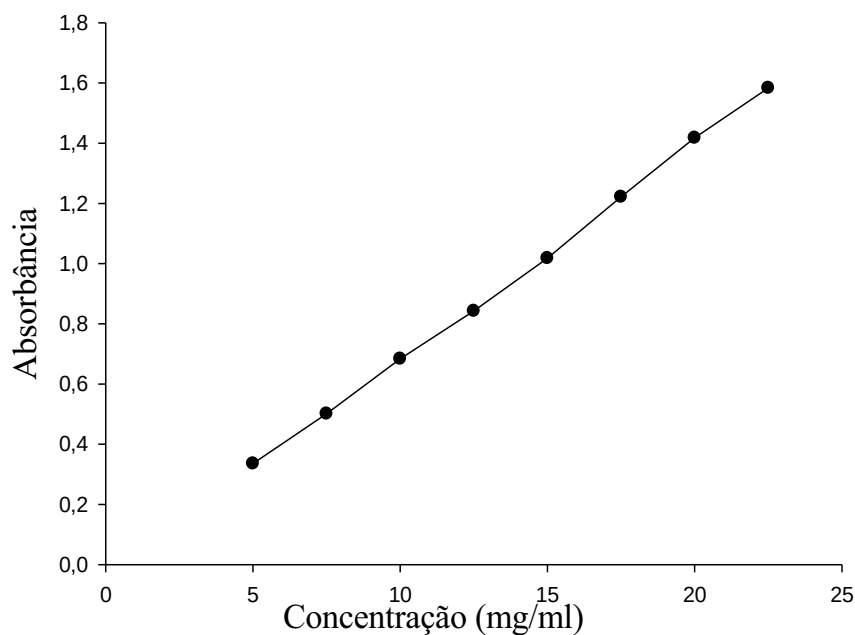


### 6.2.2. Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco nas amostras, dentro de um intervalo definido (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011). A absorbância das amostras foi avaliada em 254nm e calculou-se a média para cada concentração.

A partir dos valores obtidos, construiu-se a curva analítica de absorvância em função da concentração (Figura 8).

**Figura 8.** Curva analítica da absorvância em função da concentração de cetoprofeno.



A partir da curva analítica obteve-se a equação da regressão linear da curva analítica  $y = 0,0719x - 0,0385$ , em que  $y$  é a absorvância medida em 254nm e  $x$  é a concentração do fármaco ( $\mu\text{g/mL}$ ). O coeficiente de correlação linear obtido a partir da curva foi  $r = 0,999$ , indicando a linearidade do método para a análise proposta (BRASIL, 2003).

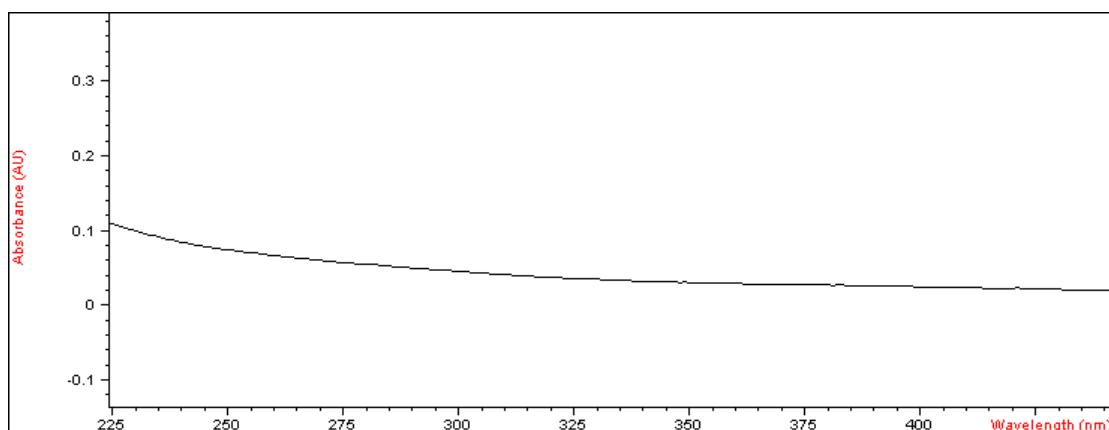
### 6.2.3. Especificidade/Seletividade

Representa a capacidade que o método possui de medir de forma exata um composto em presença de outros, como componentes do sistema, impurezas ou produtos de degradação, sem que estes interfiram significativamente no resultado (BRASIL, 2003).

A varredura do espectro de absorção da solução de GG foi avaliada e observou-se que o polímero não apresentava pico de absorção na região do UV (Figura 9), não coincidindo com

o do fármaco (pico máximo de absorção em 254nm). Portanto, o método é seletivo e específico para quantificar o fármaco presente nas microesferas.

**Figura 9.** Espectro de absorção na região do ultravioleta da gelana em etanol absoluto.



#### 6.2.4. Precisão

Avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma múltipla amostragem de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

##### Repetibilidade

É a precisão intracorrida, ou seja, precisão entre os resultados obtidos pelo mesmo manipulador, utilizando os mesmos equipamentos, dentro de um curto período de tempo (BRASIL, 2003). A absorbância de cada amostra foi medida em triplicata e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Absorbância média de soluções de cetoprofeno medidas em curtos intervalos.

| Concentração teórica (µg/mL) | Absorbância média | Desvio padrão | CV (%) |
|------------------------------|-------------------|---------------|--------|
| 7,5                          | 0,5564            | 0,0043        | 0,7747 |
| 15                           | 1,0702            | 0,0144        | 1,3535 |
| 20                           | 1,3909            | 0,0064        | 0,4566 |

##### Precisão intermediária

Avalia a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com manipuladores diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Foram realizadas medidas em dias diferentes por manipuladores diferentes e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Absorbância média soluções cetoprofeno medidas em dias diferentes por manipuladores diferentes.

| Concentração teórica<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Absorbância média | Desvio Padrão | CV (%) |
|----------------------------------------------|-------------------|---------------|--------|
| 7,5                                          | 0,5213            | 0,0198        | 3,8    |
| 15                                           | 1,061             | 0,0396        | 3,73   |
| 20                                           | 1,417             | 0,0445        | 3,14   |

Os valores de CV obtidos para as diferentes concentrações analisadas, em ambos os testes, foram menores que 5%, conforme preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2003). Portanto, o método é preciso.

#### 6.2.5. Limite de detecção e de quantificação

O LD representa a menor quantidade do fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. O LQ representa a menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser medida com precisão e exatidão pelo ensaio escolhido (BRASIL, 2003).

Os valores de limite de detecção e de limite de quantificação calculados, a partir das equações, foram de  $0,7611\mu\text{g}$  e  $2,5369\mu\text{g}$ , respectivamente, demonstrando a capacidade da metodologia desenvolvida de detectar e quantificar baixas concentrações de fármaco.

#### 6.2.6. Exatidão

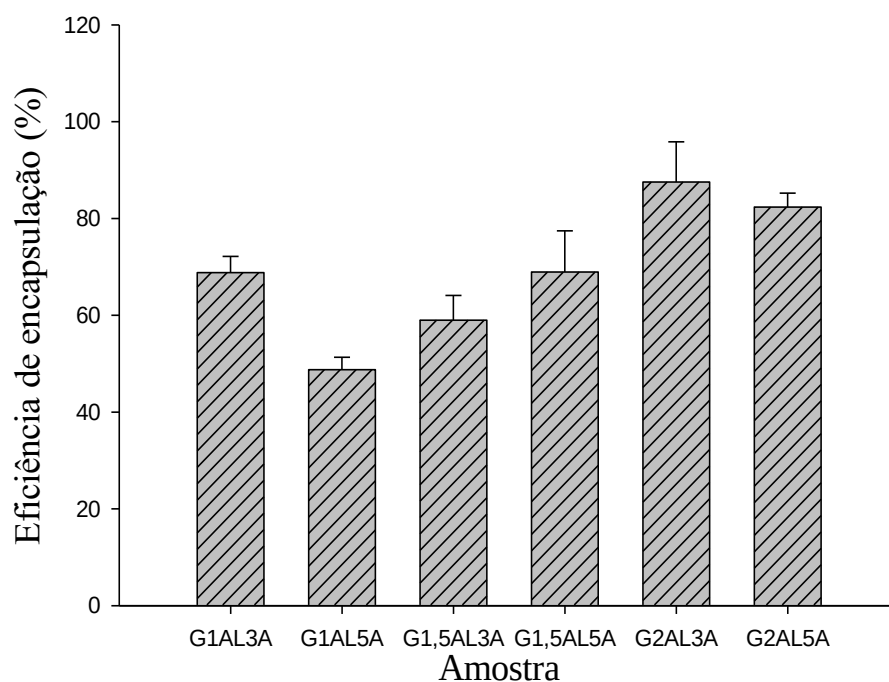
É a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico utilizado em relação ao valor teórico real. Valores próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A exatidão foi calculada e os valores apresentados na Tabela 4, mostrando que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação do fármaco.

**Tabela 4.** Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de cetoprofeno.

| Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Concentração média experimental ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Exatidão (%) |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------|
| 5                                         | 5,02                                                 | 100,4        |
| 10                                        | 9,98                                                 | 99,8         |
| 15                                        | 15,04                                                | 100,27       |

### 6.3. Avaliação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) representa a porcentagem de fármaco que foi incorporado pelo sistema em relação à quantidade adicionada (Ahuja; Yadav & Kumar, 2010). Quanto maior a EE%, mais eficiente o processo de microencapsulação (BRASIL, 2003). No teste preliminar realizado avaliou-se que não houve diferença significativa entre a EE% nas primeiras 1,5 h de teste e após 6 h. Assim, o teste padrão foi realizado com  $t=1,5$  h de agitação, evitando eventual perda de solvente por evaporação. A eficiência de encapsulação foi avaliada e os resultados obtidos são apresentados na Figura 10.

**Figura 10.** Gráfico da eficiência de encapsulação.

A EE% variou em um intervalo de 48,76% a 87,52% (Figura 10). Os resultados obtidos demonstraram que com o aumento da concentração de GG, aumenta-se o teor de encapsulação de CP, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), com isso as amostras que continham 2% de GG foram as que apresentaram maior porcentagem de encapsulação (87,52% e 82,34% para G2Al3A e G2Al5A, respectivamente).

Os valores sugerem que em maiores concentrações de polímero há maior número de sítios disponíveis para ocorrer a reticulação com íons  $Al^{3+}$ , originando redes com maior capacidade de aprisionar o fármaco em seu interior (Nayak; Das & Maji, 2012).

A variação na concentração da solução reticulante de 3% para 5%, não influenciou de forma significativa a EE% ( $p > 0,05$ ), exceto na concentração de 1% de goma gelana.

Como o CP é um fármaco pouco solúvel e estável, esperava-se elevadas EE%, pois é pouco provável que o fármaco se dissolva na solução de cloreto de alumínio ou seja degradado durante o processo de reticulação. Elevados teores de encapsulação de CP também foram observados e descritos por Prezotti e co-autores (2014), com microesferas de gelana:pectina, reticuladas com  $Al^{3+}$ .

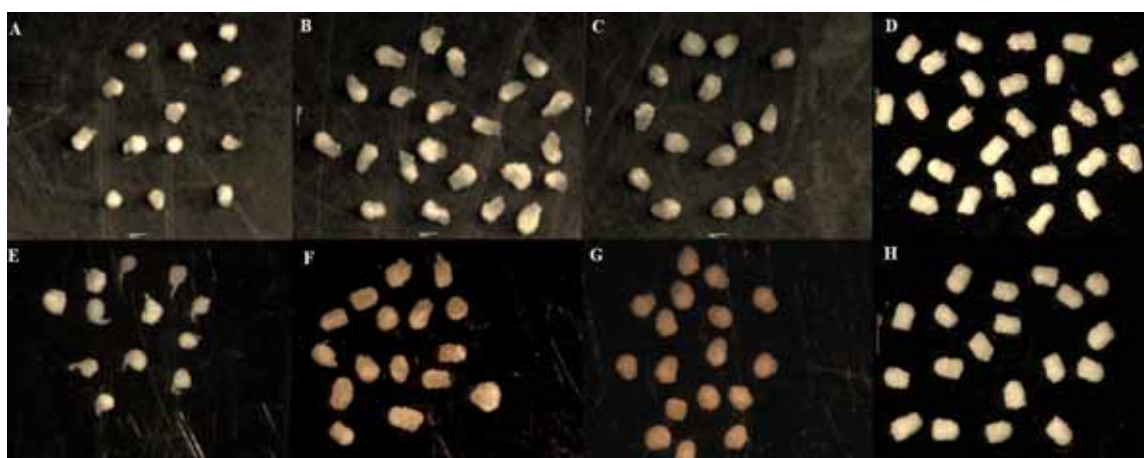
## **6.4. Análise de tamanho, forma e morfologia das partículas**

### **6.4.1. Análise de tamanho e forma das partículas**

O controle do tamanho e da distribuição granulométrica das partículas são importantes, pois esses parâmetros interferem na reprodutibilidade da liberação do fármaco, na absorção e, conseqüentemente, na biodisponibilidade (Khafagy *et al.*, 2007). Para uma melhor comparação entre os grupos, as fotomicrografias foram compiladas na Figura 11. Para avaliar o tamanho e a forma das partículas, mediu-se o diâmetro do círculo equivalente e o grau de circularidade, que é um fator de forma que expressa a regularidade da partícula, sendo 1,0 o

valor que representa um círculo perfeito (Barreiros *et al.*, 1996). A média e o desvio padrão dos resultados obtidos foram calculados. As formulações analisadas foram as que continham 1,0%, 1,5% e 2% de polímero em pH 4,0 e as amostras contendo 2% de polímero em pH 8,0, reticuladas em solução catiônica de alumínio 3% e 5%, também foram analisadas.

**Figura 11.** Fotomicrografia das microesferas contendo cetoprofeno 1%: (A) G1Al3A, (B) G1,5Al3A, (C) G2Al3A, (D) G2Al3B, (E) G1Al5A, (F) G1,5Al5A (G) G2Al5A e (H) G2Al5B, em aumento 10x lupa.



As amostras reticuladas em solução de  $Al^{3+}$  3% apresentaram diâmetro médio entre 701,292 $\mu$ m e 959,767 $\mu$ m e a circularidade média entre 0,660 e 0,750. As reticuladas em solução catiônica 5% apresentaram valores entre 709,9 $\mu$ m e 1049,9 $\mu$ m e 0,522 e 0,830, respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Diâmetro, circularidade média e índice de span de microesferas contendo cetoprofeno (1%) (n=100).

| Amostra  | Circularidade     | Diâmetro ( $\mu$ m)   | Span |
|----------|-------------------|-----------------------|------|
| G1Al3A   | 0,739 $\pm$ 0,059 | 701,292 $\pm$ 64,971  | 0,13 |
| G1Al5A   | 0,641 $\pm$ 0,119 | 812,461 $\pm$ 102,593 | 0,18 |
| G1,5Al3A | 0,672 $\pm$ 0,062 | 909,597 $\pm$ 78,705  | 0,17 |
| G1,5Al5A | 0,724 $\pm$ 0,058 | 980,322 $\pm$ 69,575  | 0,07 |
| G2Al3A   | 0,679 $\pm$ 0,079 | 866,515 $\pm$ 55,667  | 0,08 |
| G2Al5A   | 0,796 $\pm$ 0,034 | 939,322 $\pm$ 43,788  | 0,14 |
| G2Al3B   | 0,750 $\pm$ 0,040 | 959,767 $\pm$ 46,274  | 0,13 |
| G2Al5B   | 0,749 $\pm$ 0,061 | 956,440 $\pm$ 104,388 | 0,28 |



A partir dos valores encontrados foi possível observar que entre as amostras obtidas a partir de dispersões ácidas, a menor proporção de gelana (1%) contribuiu para a formação de microesferas com menores diâmetros (faixa de 701,292 $\mu$ m e 812,461 $\mu$ m) em ambas as concentrações de reticulante, 3% e 5% ( $p < 0,05$ ), o que pode estar relacionado a menor viscosidade da dispersão, que permitiu a formação de gotículas menores. Para as concentrações 1,5% e 2%, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros, em ambas as concentrações de solução reticulante ( $p > 0,05$ ).

Comparando-se as microesferas com 2% de polímero, obtidas a partir de dispersões ácidas e básicas, houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro das amostras reticuladas para ambas as concentrações de reticulante, sendo as amostras básicas as que apresentaram maior diâmetro ( $p < 0,05$ ). Em pH básico, a GG apresenta maior densidade de carga negativa devido à ionização dos grupos carboxílicos, dessa forma a migração dos íons  $Al^{3+}$  da solução reticulante para a superfície da gotícula é mais rápida e a reticulação ocorre prontamente, originando uma matriz mais densa e evitando a perda de massa de polímero da gotícula (Agnihotri *et al.*, 2006).

Em relação à circularidade, as microesferas com 2% de GG apresentaram maiores valores de circularidade, sem exceção, e as obtidas a partir de dispersões 1% e 1,5% não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Para as microesferas apresentarem uma forma circular, a gota de hidrogel formada, no momento do gotejamento, deve ser o mais regular possível e, ao entrar em contato com a solução reticulante, deve tender à forma esférica. A maior viscosidade das dispersões com maior concentração do polímero deve ter permitido uma maior resistência à deformação durante o gotejamento (Cellesi *et al.*, 2004).

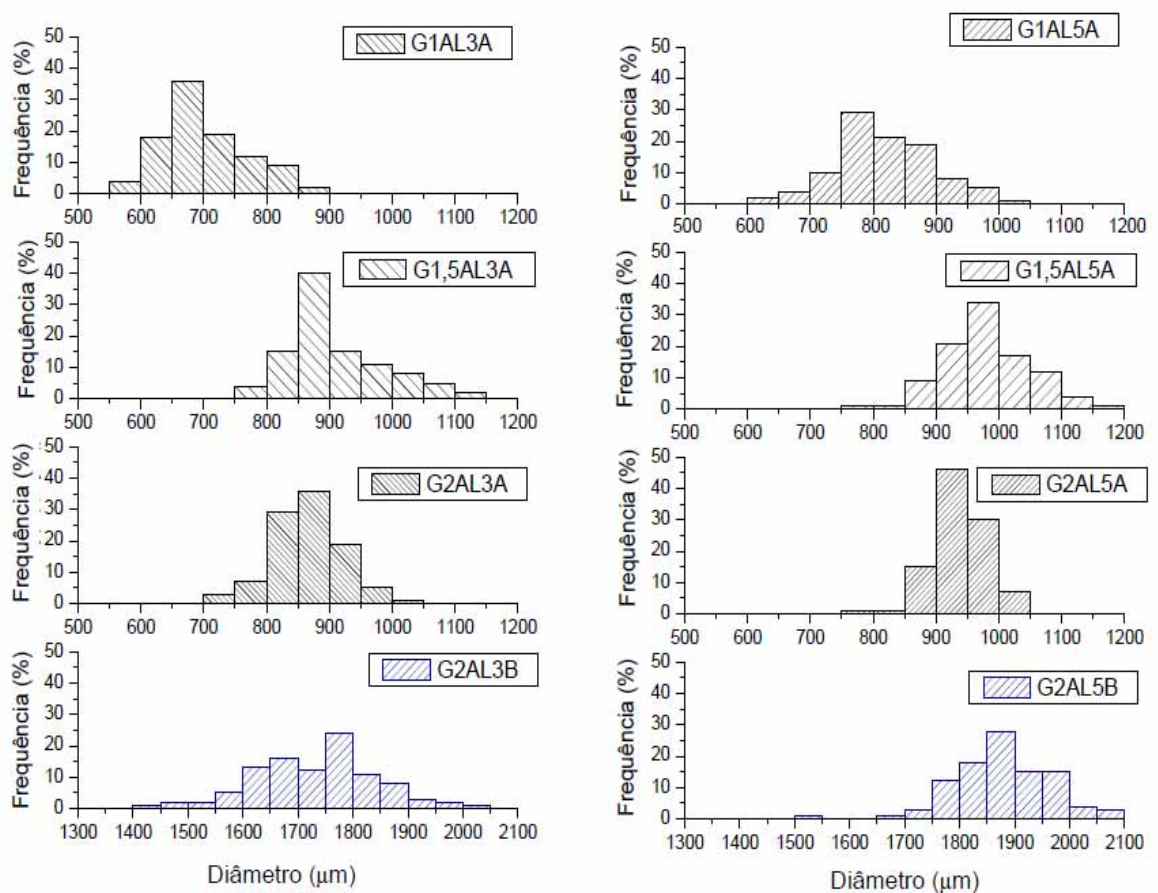
As microesferas reticuladas em solução de  $Al^{3+}$  a 5% apresentaram maior circularidade em relação às reticuladas em solução de  $Al^{3+}$  a 3%, em pH ácido e básico. O aumento do

número de íons disponíveis em solução para formação do gel permite uma reticulação mais rápida e a formação de uma rede polimérica mais rígida, que permitiu a formação de micropartículas mais esféricas (Mangond *et al.*, 2009).

Com o aumento da concentração de solução reticulante de 3% para 5% houve um aumento significativo no diâmetro das microesferas em todas as concentrações de GG.

As distribuições de tamanho podem ser classificadas quanto à sua amplitude de variação, que quando estreita é classificada como monodispersas e quando ampla em polidispersas (Gaumet *et al.*, 2008). O estudo do tamanho permitiu a construção de perfis de distribuição granulométricas, apresentados na Figura 12.

**Figura 12.** Distribuição granulométrica das micropartículas.



O cálculo do índice de Span pode ser utilizado para se avaliar a distribuição de tamanho de uma amostra, representando sua polidispersidade, ou seja, a amplitude da distribuição granulométrica (Tabbakhian *et al.*, 2006; Kawadkar & Chauhan, 2012).

Quanto menor o valor da polidispersidade, mais homogênea é a amostra, ou seja, menor a amplitude de distribuição de tamanho das partículas (Win & Feng, 2005). A Tabela 5 apresenta os valores de Span das amostras.

Em uma escala de 0 a 1, valores de “Span” abaixo de 0,1 estão correlacionados à elevada homogeneidade na população das partículas. Portanto, somente as amostras G1,5Al5A e G2Al3A, que apresentaram Span de 0,07 e 0,08, respectivamente, podem ser classificadas como monodispersas, todas as demais são consideradas polidispersas (Gaumet *et al.*, 2008).

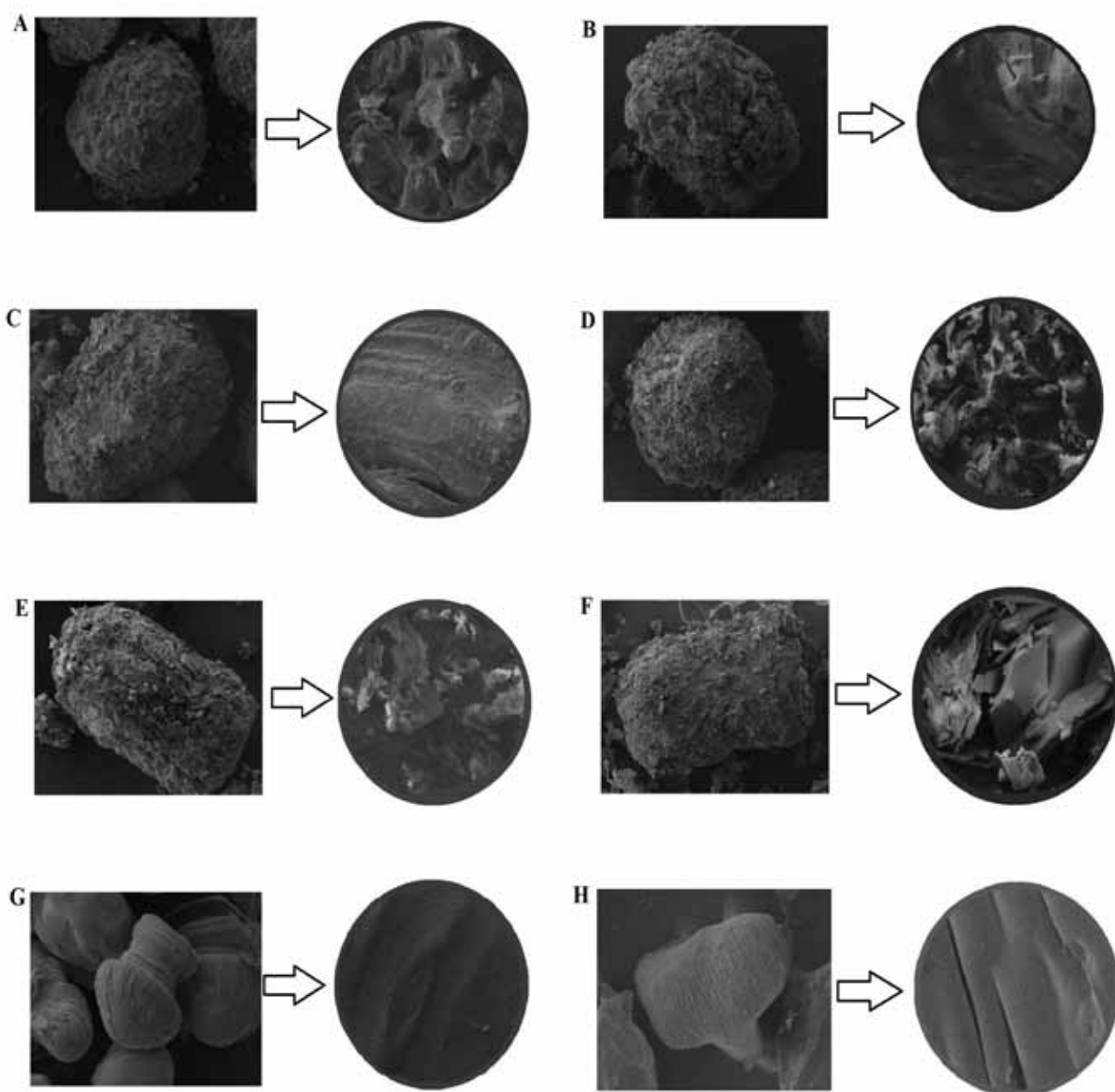
#### **6.4.2 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna**

A partir das fotomicrografias observou-se que as superfícies das microesferas são irregulares (Figura 13).

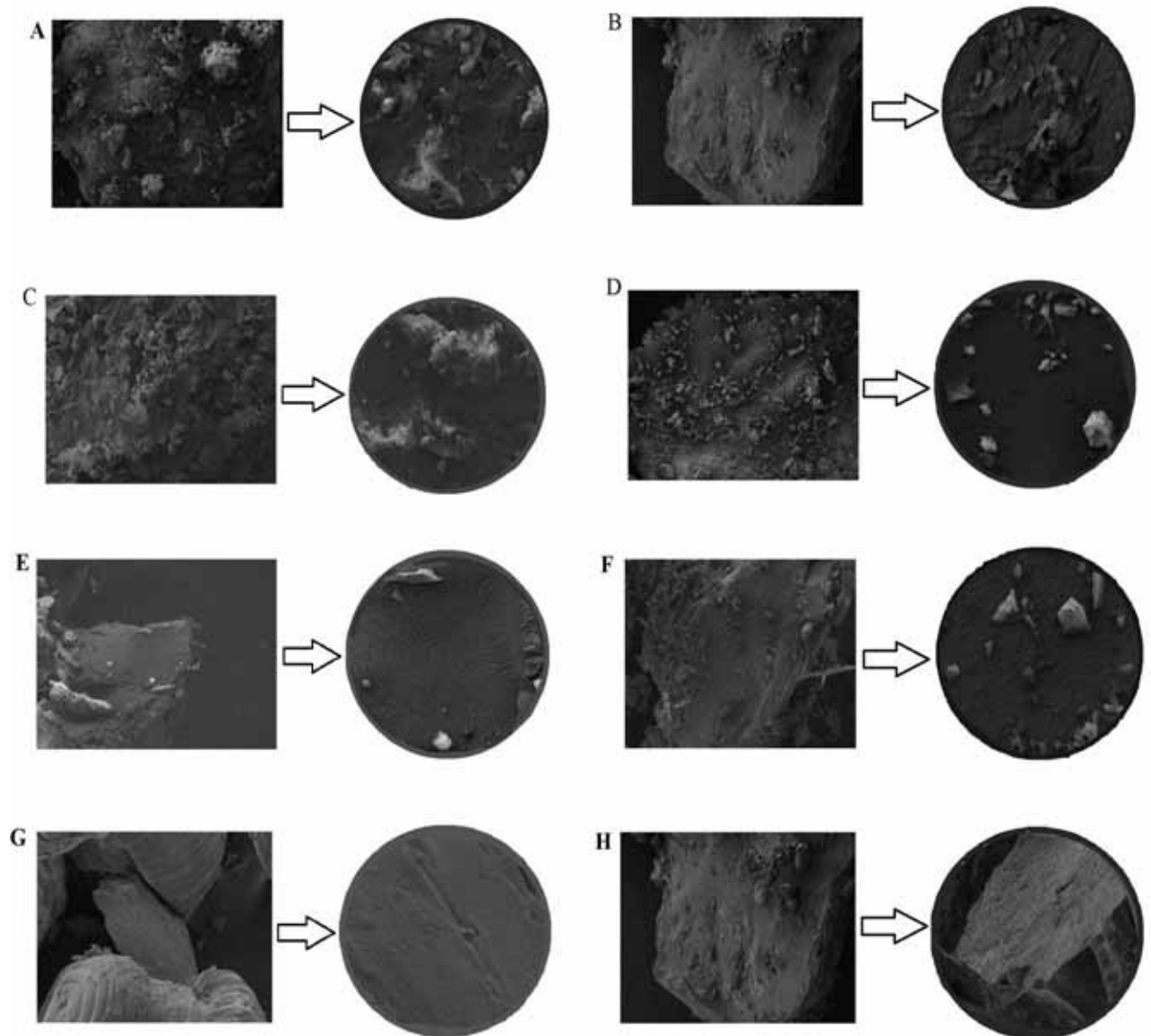
Com o aumento da concentração de polímero e da concentração de reticulante, observou-se um aumento na rugosidade da superfície das microesferas. A presença de fármaco também torna a superfície mais irregular, em comparação com as sem fármaco, provavelmente pela deposição do cetoprofeno nesta região. Nas amostras controle, o aumento da concentração da solução reticulante, provocou formação de fissuras na superfície das microesferas.

Analisando-se as fotomicrografias da estrutura interna das microesferas, observou-se uma matriz homogênea e pouco porosa. É visível a presença de cristais de CP distribuídos no interior das mesmas em comparação com as amostras controle, sendo os cristais do fármaco mais evidentes nas amostras reticuladas em solução menos concentrada de  $Al^{3+}$  (Figura 14).

**Figura 13.** Fotomicrografias das amostras evidenciando a morfologia de superfície das microesferas no aumento de 100X e 1000X. (A) G1Al3A; (B) G1,5Al3A; (C) G2Al3A; (D) G2Al5A; (E) G2Al3B; (F) G2Al5B; (G) G2Al3A-C e (H) G2Al5A-C.



**Figura 14.** Fotomicrografias evidenciando a morfologia interna das microesferas no aumento 200x e 1000X. (A) G1Al3A; (B) G1,5Al3A; (C) G2Al3A; (D) G2Al5A; (E) G2Al3B; (F) G2Al5B; (G) G2Al3A-C e (H) G2Al5A-C.



### 6.5. Determinação do perfil de intumescimento

Os hidrogéis têm a habilidade de intumescer com a hidratação, formando uma camada geleificada que controla a posterior difusão da água para o interior da matriz e a difusão do fármaco para o meio de externo de eluição, resultando na liberação do fármaco de forma controlada. Assim, a avaliação da capacidade de intumescimento pode representar o primeiro

passo para a elaboração de um modelo matemático capaz de prever a cinética de liberação do fármaco (Mulhbach, *et al.*, 2004).

O processo de intumescimento de um material polimérico ocorre em nível molecular e envolve a difusão de moléculas de um líquido para o interior do polímero. Esta difusão é possível, devido à mobilidade dos segmentos locais das cadeias do polímero, que permite alojar as moléculas do líquido. Na presença de solventes adequados, os polímeros reticulados intumescem, incorporando solvente, enquanto as cadeias puderem ser distendidas, e os segmentos são forçados a assumir uma conformação mais alongada (José *et al.*, 2000).

Os testes realizados permitiram determinar a porcentagem de intumescimento (Tabela 6), bem como os perfis de intumescimento das amostras G1Al3A; G1,5Al3A, G2Al3A, G1Al5A, G1,5Al5A e G2Al5A, no tempo de equilíbrio, como apresentado na Figura 15.

**Tabela 6.** Porcentagem de intumescimento das amostras em diferentes meios (t=90 min; média±DP).

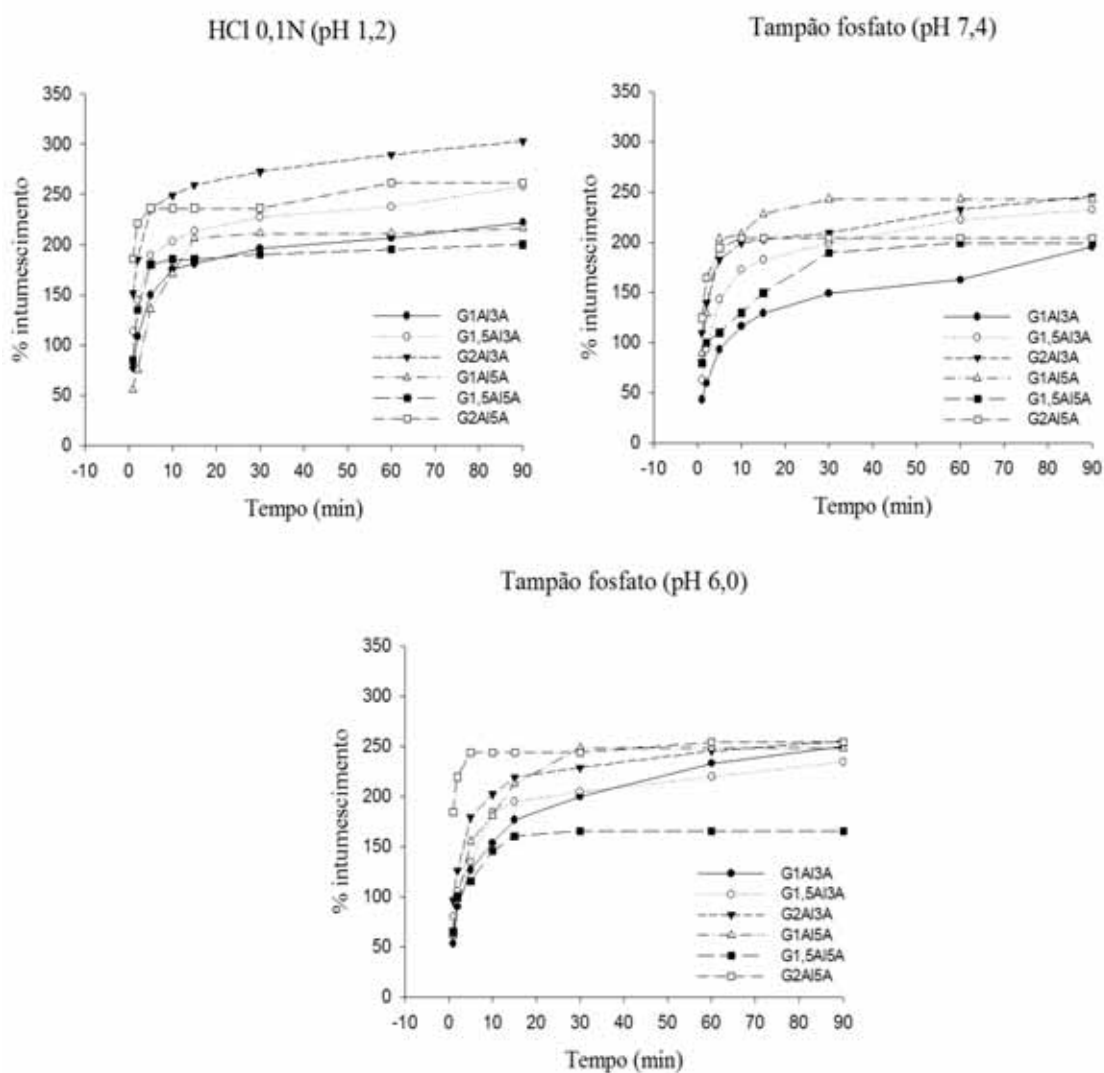
| Amostras | %I                |                         |                         |
|----------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
|          | HCl (pH 1,2)      | Tampão fosfato (pH 7,4) | Tampão fosfato (pH 6,0) |
| G1Al3A   | 222,031 ± 23,145  | 195,494 ± 15,372        | 249,584 ± 16,951        |
| G1,5Al3A | 258,2645 ± 20,163 | 232,327 ± 58,021        | 234,414 ± 20,664        |
| G2Al3A   | 303,030 ± 44,371  | 245,847 ± 5,475         | 255,220 ± 15,301        |
| G1Al5A   | 216,189 ± 36,012  | 242,935 ± 5,819         | 248,319 ± 9,636         |
| G1,5Al5A | 200,200 ± 28,029  | 194,513 ± 6,916         | 165,413 ± 6,502         |
| G2Al5A   | 261,306 ± 56,852  | 204,183 ± 21,992        | 253,858 ± 8,290         |

As amostras apresentaram elevada capacidade de intumescimento, entretanto, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes meios testados ( $p>0,05$ ), nas concentrações 1,0, 1,5 e 2,0%, em HCl pH 1,2, em tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,0. A análise estatística, entre as amostras, demonstrou que a variação da concentração de polímero e da solução reticulante não influenciaram a %I.

O menor intumescimento em meio gástrico representa uma das estratégias para se evitar a liberação do fármaco no sítio de menor absorção e/ou em que o fármaco pode ser

degradado, como o estômago contudo, o CP é um fármaco pouco solúvel em baixos valores de pH, como o do meio gástrico, portanto o perfil de intumescimento pode não ser o único fator limitante no processo de liberação do fármaco.

**Figura 15.** Perfil de intumescimento das amostras em diferentes meios.



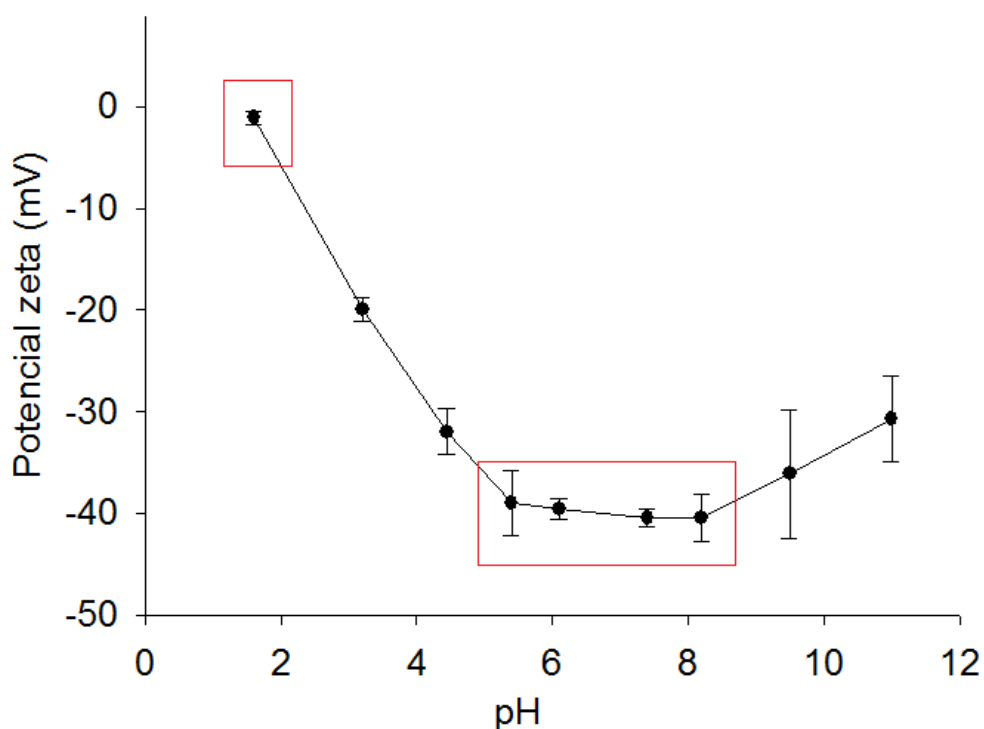
## 6.6. Análise da variação do potencial zeta com a variação de pH de dispersões aquosas de goma gelana

A avaliação do potencial zeta foi realizada com o objetivo de compreender o comportamento da GG, que compõe o sistema, em diferentes valores de pH. Esse

comportamento pode estar diretamente relacionado ao intumescimento do polímero, à propriedade mucoadesiva e consequentemente ao processo de liberação do fármaco.

Os resultados obtidos comprovaram que a variação de pH das dispersões, influenciou de forma significativa o potencial zeta (Figura 16).

**Figura 16.** Influência do pH no potencial zeta das dispersões de GG.



Em baixos valores de pH ocorreu a redução da carga negativa, com valor próximo a zero em pH 1,6. A GG-LA apresenta  $pK_a \approx 3,5$  e, na presença de excesso de íons  $H^+$ , ocorre a protonação dos ânions carboxilato, reduzindo a carga negativa da molécula. As cargas negativas máximas medidas foram de -39,1- -40,4mV, apresentadas em valores de pH entre 5,4 e 8,2, respectivamente.

No valor de pH que simula o meio gástrico, as cadeias do polímero apresentam carga próxima de zero, portanto como o sistema é reticulado, a repulsão das cadeias que formam a malha é reduzida. Em valores de pH próximos ao do meio entérico e cólon, o polímero



apresenta carga máxima negativa, com isso possivelmente ocorre repulsão das cadeias poliméricas que compõem a rede reticulada, permitindo maior fluxo de fluídos para o interior da matriz e, conseqüentemente seu intumescimento. O intumescimento da matriz pode auxiliar o processo de mucoadesão, uma vez que as cadeias do polímero tornam-se mais disponíveis para interagir com as cadeias de mucina presente no muco e conseqüentemente auxiliar nos processos de dissolução, difusão do fármaco para o meio e sua absorção.

### **6.7. Análise das propriedades mucoadesivas**

A mucosa gastrintestinal é revestida por uma camada de muco com as funções principais de proteção e lubrificação (Varum *et al*, 2008). O muco é um gel viscoelástico composto por 95% de água, 0,5- 5% de mucina, 1% de sais inorgânicos, 0,5- 1% de proteínas e lipídios. Apesar da grande percentagem de água, o principal constituinte estrutural do muco é a mucina e essa glicoproteína é a principal responsável pelas interações com os polímeros mucoadesivos (Madsen; Eberth & Smart, 1998).

A propriedade mucoadesiva dos polímeros, ou seja, a capacidade do polímero interagir e permanecer aderido ao muco está relacionada com a flexibilidade das suas cadeias e à presença de grupos funcionais que realizem essa interação. Esta propriedade agrega vantagens ao sistema desenvolvido, por prolongar o tempo de residência no sítio de absorção, e promover um contato mais íntimo com a barreira epitelial, ambos fatores que podem aumentar a permeabilidade e absorção de fármacos. A GG apresenta propriedades mucoadesivas, entretanto, quando se realiza uma reação de reticulação, a flexibilidade e o número de grupos funcionais livres podem ser reduzidos e interferir na mucoadesão do sistema (Crcarevska *et al.*, 2008).

Existem diversas teorias que explicam como ocorre a mucoadesão, entre elas a teoria eletrônica que está relacionada com a atração de cargas opostas entre o polímero e os

componentes do muco, enquanto a teoria da adsorção pode ser explicada pela formação de ligações secundárias como ligações de hidrogênio e hidrofóbicas entre o polímero e o muco. Existem ainda teoria da molhabilidade que não se aplica a sistemas sólidos, a teoria da difusão em que ocorre difusão entre as cadeias poliméricas e as cadeias de mucina, originando uma adesão temporária, a teoria da fratura e a teoria mecânica, relacionada com a rugosidade da superfície do sistema. Contudo nenhuma dessas teorias isoladamente é capaz de explicar o mecanismo de mucoadesão, pois uma série de mecanismos estão envolvidos (Carvalho *et al.*, 2010).

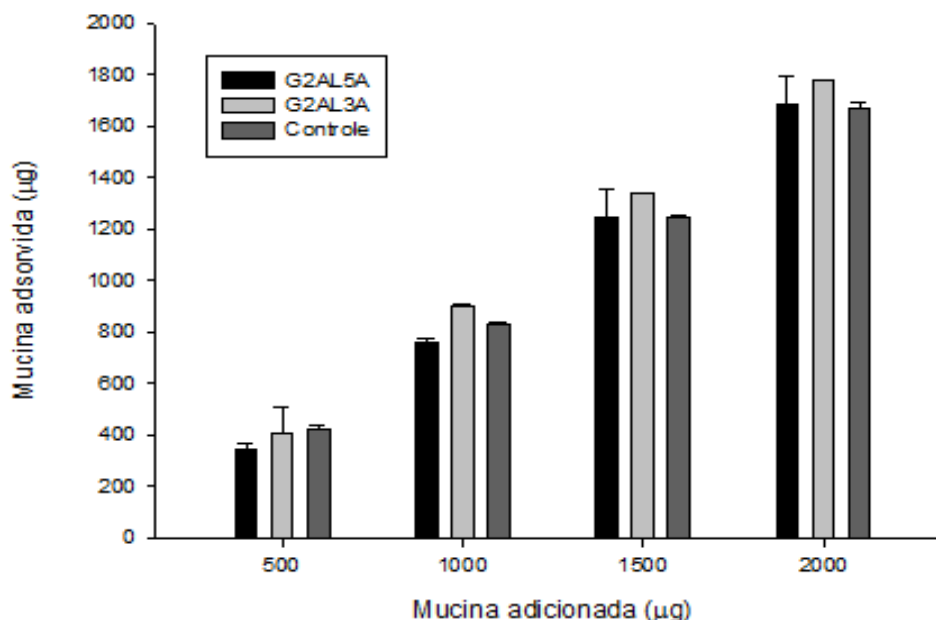
Os testes utilizados para avaliar a mucoadesão são normalmente focados para um tipo específico de resposta. Como as condições experimentais são diferentes, os ensaios *in vitro* e *ex vivo* podem ser complementares na caracterização e descrição dos mecanismos envolvidos no processo de mucoadesão.

#### **6.7.1 Análise *in vitro* da interação com mucina**

A quantidade de mucina adsorvida nas microesferas aumentou com o aumento da concentração da solução de mucina. A presença de fármaco e a concentração da solução reticulante não influenciaram de forma significativa a adsorção de mucina ( $p > 0,05$ ). Para a amostra G2Al3A, os valores de mucina adsorvida, variaram de 408,97 a 1778,84  $\mu\text{g}$  e para a amostra G2Al5A de 340,45 a 1687,67  $\mu\text{g}$  (Figura 17).

Os valores de adsorção obtidos foram aproximadamente 4 vezes superiores aos observados por Dhawan e co-autores (2004) em estudo com microesferas de quitosana e muito semelhantes aos resultados obtidos por Prezotti e co-autores (2014) em ensaio realizado com microesferas de goma gelana e pectina.

**Figura 17.** Quantidade de mucina adsorvida vs quantidade de mucina adicionada por amostra.



Considerando-se que as soluções de mucina apresentavam pH 4,79, valor superior ao pKa da GG-LA (pKa=3,5) e da mucina (pKa=2,6), ambas deviam estar carregadas negativamente, devido à ionização de grupos carboxílicos. Dessa forma, a teoria eletrônica não deve explicar o processo de mucoadesão e a adsorção da mucina ao sistema e possivelmente, ocorre pela interpenetração das cadeias e formação de interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio.

### 6.7.2 Avaliação da mucoadesão *ex vivo*

As microesferas apresentaram 100% de capacidade mucoadesiva, sendo que ao final do teste, todas as partículas encontravam-se fortemente aderidas à mucosa (Tabela 7).

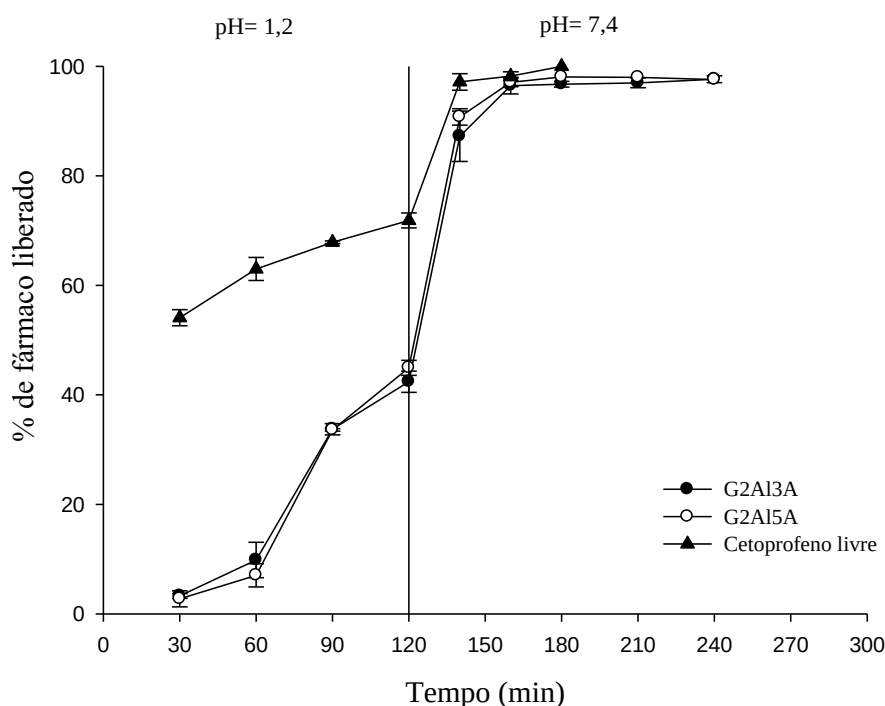
Este resultado está em concordância com os dados do teste *in vitro* e evidencia a elevada capacidade mucoadesiva das microesferas desenvolvidas neste estudo.

Tabela 7. Número de partícula fixadas à mucosa durante o ensaio.

| Amostra | Número de partículas fixadas |             |
|---------|------------------------------|-------------|
|         | Tempo inicial                | Tempo final |
| G2Al3A  | 30                           | 30          |
| G2Al5A  | 30                           | 30          |

## 6.8 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco

A dissolução do fármaco livre nos 120 minutos em meio ácido foi de 71,85%, a dissolução seguiu em meio entérico simulado e aos 160 minutos de ensaio cerca de 99% encontravam-se em solução. As amostras G2Al3A e G2Al5A foram as selecionadas, por apresentarem elevada eficiência de encapsulação e circularidade. Nos primeiros 120 minutos de ensaio em meio ácido, as microesferas G2Al3A e G2Al5A liberaram 42,40% e 44,93% do fármaco, respectivamente, sendo a liberação aproximadamente 1,65 vezes menor que a do fármaco livre (Figura 18).

Figura 18. Perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno.

Para este meio, a concentração de reticulante das amostras não influenciou significativamente as taxas de liberação do fármaco ( $p > 0,05$ ).

Em pH 7,4, um efeito *burst* foi observado e os valores da liberação percentual das amostras G2AL3A e G2AL5A foram de 87,23% e 90,75%, chegando a 97,61% e 98,89%, em 360 minutos, respectivamente, diferentemente do fármaco livre que atingiu a máxima dissolução em 160 min de ensaio (Figura 18).

O aumento do pH deve promover o aumento da capacidade de intumescimento do polímero, por aumentar o grau de dissociação dos grupos carboxílicos. Dessa forma pode ter ocorrido, em meio entérico, uma maior expansão da rede polimérica pela ação das forças repulsivas, facilitando a entrada de meio nas microesferas bem como a difusão do fármaco para o meio de liberação.

### **6.9 Análise da cinética de liberação *in vitro* do fármaco**

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é realizada utilizando equações genéricas que traduzem matematicamente a curva obtida em função de parâmetros relacionados à forma farmacêutica. Em alguns casos, essa equação pode ser deduzida por uma análise teórica do processo, entretanto para formas de liberação controlada esse fundamento teórico não se aplica, sendo mais adequado o uso de equações empíricas (Costa & Lobo, 2000).

Os perfis de liberação obtidos foram analisados utilizando modelos matemáticos com o objetivo de descrever o mecanismo de liberação do fármaco a partir das microesferas.

De acordo com o coeficiente de correlação  $R^2$ , o modelo que melhor descreve a liberação é o de Weibull (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco.

| Modelos            |                | HCl 0,1N pH 1,2 |        | Tampão fosfato pH 7,4 |         |
|--------------------|----------------|-----------------|--------|-----------------------|---------|
|                    |                | G2Al3A          | G2Al5A | G2Al3A                | G2Al5A  |
| Korsmeyer – Peppas | K              | 0,0152          | 0,005  | 41,0319               | 54,6506 |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,9418          | 0,9392 | 0,5701                | 0,5185  |
|                    | N              | 1,6677          | 1,9136 | 0,1611                | 0,1087  |
| Higuchi            | K              | 2,9292          | 2,9351 | 6,9551                | 7,0424  |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,5535          | 0,5055 | 0                     | 0       |
| Hixson – Crowell   | K              | 0,0012          | 0,0012 | 0,0037                | 0,004   |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,8062          | 0,7547 | 0,7162                | 0,696   |
| Baker – Lonsdale   | K              | 0,0002          | 0,0002 | 0,002                 | 0,0022  |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,5273          | 0,4803 | 0,6538                | 0,7768  |
| First order        | K              | 0,0038          | 0,0039 | 0,0169                | 0,0188  |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,7877          | 0,7347 | 0,6846                | 0,6896  |
| Weibull            | B              | 1,22            | 1,1943 | 0,8819                | 2,2204  |
|                    | R <sup>2</sup> | 0,9898          | 0,9546 | 0,9948                | 0,9967  |

Esse modelo expressa a quantidade de fármaco acumulado no meio de dissolução (m) em um determinado tempo (t), de acordo com a equação 7 e ajusta a diferentes perfis de dissolução (Adams *et al.*, 2001).

$$m = 1 - \exp \left[ -\frac{(t - t_i)^b}{a} \right] \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:  $t_i$  representa o intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução/liberação (na maioria dos casos é zero),  $b$  é o parâmetro de forma que caracteriza a curva e o sistema.

No modelo de Weibull, o valor do expoente  $b$  indica o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica. Valores de  $b < 0,75$  indicam difusão Fickiana, para  $0,75 < b < 1$  indicam difusão não Fickiana e  $b > 1$  indica um mecanismo complexo de liberação do fármaco que pode envolver difusão, intumescimento e/ou erosão da matriz (Papadopolou, *et al.*, 2006).

Como observado na Tabela 8, os valores de coeficiente  $b$  foram maiores que 1, no meio gástrico simulado e entérico simulado, exceto para a amostra G2Al3A, indicando que a liberação do fármaco ocorre através de um mecanismo complexo que envolve erosão e intumescimento da matriz além da difusão do fármaco. A amostra G2Al3A em pH 7,4, apresentou valor de  $b$  menor que 1 indicando que o mecanismo de liberação do fármaco da matriz segue a difusão não Fickiana, em que a difusão do fármaco é governada pelo intumescimento da matriz e relaxamento das cadeias poliméricas (Lopes, Lobo & Costa, 2005; Prezotti; Cury & Evangelista, 2014). Portanto a mudança do valor de pH do meio, alterou o perfil de dissolução do fármaco, mas não alterou o mecanismo de liberação do fármaco do sistema.

## 7. CONCLUSÃO

Microesferas de goma gelana contendo cetoprofeno como fármaco modelo por meio da reticulação iônica com  $Al^{3+}$  foram obtidas com sucesso. A análise de forma e a avaliação da eficiência de encapsulação demonstraram que as concentrações de polímero e de reticulante influenciaram diretamente estas propriedades e permitiram a seleção de amostras para a avaliação dos perfis de liberação *in vitro* do fármaco. As amostras G2Al3A e G2Al5A demonstraram comportamento de liberação pH dependente, com baixas taxas de liberação do fármaco em meio ácido e elevada capacidade mucoadesiva, características desejáveis para um sistema que tem como objetivo o controle nas taxas liberação do fármaco ao longo do TGI.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; DE MAESSCHALCK, R.; DE SPIEGELEER, B.; VANDER HEYDEN, Y.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 41-53, 2001.

AGNIHOTRI, S. A.; JAWALKAR, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Controlled Release of cefalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.63, p.249-261, 2006

AHUJA, M.; YADAV, M.; KUMAR, S. Application of response surface methodology to formulation of ionotropically gelled gum cordia/gellan beads. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.161-167, 2010.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, Jr. L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6 ed. São Paulo: Ed Premier, 2000. p.548.

BARREIROS, F. M.; FERREIRA, P. J.; FIGUEIREDO, M. M. **Calculating Shape Factors from Particle Sizing Data. Particle & Particle Systems Characterization**, v. 13, n. 6, p. 368-373, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 18 Abr. 2012.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.



CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1-17, 2010.

CELLESI, F.; WEBER, W.; FUSSENEGGER, M.; HUBBELL, J. A.; TIRELLI, N. Towards a fully-synthetic substitute of alginate: development of a new process using thermal gelation and chemical cross-linking. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 5115-51124, 2004.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. Coimbra, 2010. Dissertação (Doutorado: Engenharia química). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

CURY, B. S. F. **Reticulação da Alta Amilose: Processo de Obtenção, Caracterização e Avaliação do Desempenho em Sistemas de Liberação Prolongada de Fármacos**. 2005. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2005.

CURY, B. S. F.; DE CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789-793, 2009.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 8-15, 2009.

DHAWAN, S.; SINGLA, D. K.; SINHA, V. R. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 1-7, 2004.

FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152-157, 1998.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, Amsterdam, v.57, p.247-265, 2005.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**. Disponível em < [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em: 18 Abr.2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, 2005.

ISHA, C. et al. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JÉSSICA BITENCOURT EMILIO MENDES. **Desenvolvimento e Avaliação de Micropartículas Poliméricas Contendo Resveratrol**. 2011. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

JOSÉ, N. M.; SOUZA, C. M. L.; YOSHIDA, I. V. P.; FELISBERTI, M. I. . **Síntese de redes à base de PDMS e reticulantes dendríticos**. In :*Congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais*. 14. São Pedro, 2000. Disponível em: <http://gppol.iqm.unicamp.br/Congressos/14CBECIMAT/TC401-004.pdf>.

Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T., Cottrell, I.W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**; v. 43, p. 1086–1091, 1982.

KAWADKAR, J.; CHAUHAN, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 563-572, 2012.

KHAFAGY, E.-S. et al. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; DE LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. **Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos**. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n. 5, p. 784-93, 2007.

MAIOR, J.F.A.S. et al. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.355, p.184-194, 2008.

MAITI, S. et al. Al<sup>3+</sup> ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011. ISSN 0144-8617.

MANGOND, B. S.; SREEDHER, V.; BARASKAR, V. V.; KULKARNI, R. V. Development and Evaluation of gellan gum based hydrogel microbeads for controlled release of ketoprofen. **Indian Journal of novel Drug Delivery**, v.1, p.32-35, 2009.

MULHBACHER, J.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, M.A. Cross-linked high amylose

starch derivatives for drug release II. Swelling properties and mechanistic study.

**International Journal of Pharmaceutics** v.278, p.231-238, 2004.

NAYAK, A. K.; DAS, B.; MAJI, R. Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1070-1078, 2012.

OSMAŁEK, T.; FROELICH, A.; TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1–2, p. 328-340, 2014.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44-50, 2006.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A Review on Ionotropic Gelation Method: Novel Approach for Controlled Gastroretentive Gelispheres. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. Suppl 4, p. 27-32, 2012.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas Farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, 491-502, 2007.

PHILIP, A. K.; PHILIP, B. Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. **Oman Medical Journal**, v. 25, n. 2, p. 79-87, 2010.

PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Chitosan–gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 695-703, 2013.

PICONE, C. S. F. **Influência da conformação da gelana sobre a gelificação das proteínas do leite**. 2008. 141f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 44-52, 2010.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**. v. 113, n. 0, p. 286-295, 2014.

RACOVITA, S. et al. Polysaccharides baased on micro and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Drug delivery systems**. v. 54, n. 9, p. 709-718, 2009.

REDDY, T.; TAMMISHETTI, S. Gastric resistant microbeads of metal ion cross-linked carboxymethyl guar gum for oral drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 3, p. 311-318, 2002.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.

SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.; GLAVAS DODOV, M.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 565-578, 2008.

SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

US PHARMACOPOEIA 34–NF 29, Chapter <1225> Validation of compendial procedures. 2011.

YIN WIN, K.; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713-2722, 2005.

**Dados finais**

05 de Janeiro de 2015.

---

Fernanda Isadora Boni

De acordo,

---

Profa. Dra. Ana Dóris de Castro