

# **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação modificada, produzidos a partir de pellets e micropellets com matriz de cera de carnaúba e hidroxipropil metilcelulose**

**BORGES-DE-OLIVEIRA**, Rodinelli<sup>1,2</sup>, **NASCIMENTO**, Thais Leite<sup>1</sup>, **GOUVEIA**, Diego David de Sousa<sup>1</sup>, **LIMA**, Dione Marçal<sup>1</sup>, **LIMA**, Eliana Martins<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás – Brasil. \* emlima@farmacia.ufg.br

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFG

**Palavras-chave:** pellets, comprimido, matriz, *in vivo*.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os sistemas multiparticulados como os pellets (grânulos esféricos) e micropellets (microesferas e microcápsulas) podem ser preparados para uma liberação modificada do fármaco e apresentam várias vantagens quando comparados com uma formulação monolítica convencional (unidade simples como os comprimidos e cápsulas) e vêm ganhando bastante espaço na área farmacêutica. As partículas se espalham sobre uma larga área em todo o TGI (trato gastrointestinal). Isso resulta em uma terapia segura quando a substância ativa tem um efeito colateral de irritação local. Níveis plasmáticos controlados do fármaco absorvido também podem ser obtidos. As formulações de micropartículas também têm um amplo tempo de permanência no colon, o que torna possível uma formulação de liberação estendida por até 24 horas (SJOBLOM, 2004).

Sistemas de partículas lipídicas sólidas baseadas em materiais lipofílicos como ceras ou gorduras também têm sido desenvolvidos e estão se demonstrando um sistema carreador muito atrativo quanto à proteção do fármaco contra a degradação química e quando uma liberação prolongada é requerida. Eles oferecem algumas genuínas vantagens como baixa citotoxicidade devido à ausência de solventes no processo de produção e o relativo baixo custo dos excipientes. Por outro lado, o uso de materiais para matriz a base de polímeros sintéticos que tem sido extensivamente estudados e disponíveis no mercado, com amplas aplicações por muitos anos, geralmente apresenta problemas. Falta de biocompatibilidade, solventes residuais e efeitos danosos em fármacos incorporados durante a fabricação da formulação ou durante a erosão do polímero depois da aplicação são descritos (SCHWENDEMAN *et al.*, 1996).

Os pellets e micropellets podem passar por um processo de compressão para a produção de comprimidos para aplicação oral (DASHEVSKY *et al.*, 2004; SAWICKI; LUNIO, 2005; ÜNER *et al.*, 2005). Junto com essas partículas podem ser adicionados agentes lubrificantes e outros excipientes para facilitar o processo de compressão (ÜNER *et al.*, 2005). Os comprimidos de micropellets ou grânulos lipídicos sólidos apresentam um tipo de matriz que tem numerosas vantagens sobre matrizes hidrofílicas intumescíveis (VERGOTE *et al.*, 2002). Apesar de existir uma abundante literatura disponível a respeito da preparação dos sistemas multiparticulados, poucos artigos de pesquisa se referem à compactação destes a comprimidos.

Fármacos candidatos a formulações de liberação prolongada devem ter certas características para justificar sua aplicação. O cetoprofeno é um antiinflamatório não-esteróide que é usado em distúrbios reumáticos e dores suaves a moderadas (ÜNER *et al.*, 2005). A meia-vida curta (REYNOLDS, 1996),

baixa biodisponibilidade e perturbação local ou sistêmica no TGI (LIVERSIDGE, 1981) diminuem o interesse pelos tratamentos que podem ser feitos com cetoprofeno, e o tornam um bom candidato para formas farmacêuticas de liberação controlada (PALMIERI *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVOS

Melhor caracterização da compressão de pellets e micropellets para a produção de comprimidos, com estudos *in vitro* e *in vivo*, visando atingir boa biodisponibilidade e uma liberação estável e controlada do cetoprofeno, capaz de otimizar a posologia, a aderência do paciente à terapia e sua qualidade de vida.

## 3. RELEVÂNCIA

As inovações tecnológicas na área farmacêutica com sistemas de liberação controlada de fármacos têm provocado uma mudança radical no campo da farmacoterapia. Nessas últimas décadas poucos fármacos novos estão sendo sintetizados e a tecnologia farmacêutica tem um papel fundamental no sentido de tornar os fármacos já existentes mais eficientes do ponto de vista de efeito terapêutico e muito mais seletivos em termos de concentração no local de ação, com menos efeitos colaterais e com a maior duração em relação ao efeito farmacológico.

Este trabalho tem essa proposta de aperfeiçoamento de formulações farmacêuticas, em busca de uma melhor posologia com a redução da frequência da dose proporcionando maior conveniência e cooperação do paciente, redução das flutuações da concentração do fármaco, redução dos efeitos colaterais e promovendo melhor qualidade de vida ao paciente durante o tratamento.

Além disso, poucos trabalhos existem a respeito da compressão de micropellets e pellets para a fabricação de comprimidos. Essas formulações necessitam de melhor investigação tanto *in vitro* como *in vivo*.

## 4. ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS

### 4.1. Preparação de micropellets

#### 4.1.1. Preparação dos micropellets pela técnica de emulsão congelante

Os micropellets lipídicos sólidos serão preparados pela técnica de emulsão congelante e o cetoprofeno será incorporado nestas partículas em diferentes proporções fármaco/cera de carnaúba. Para este propósito, a cera de carnaúba será fundida em um banho com água a 90 °C e a apropriada quantidade de cetoprofeno será adicionada. A mistura será vertida em 150 ml de uma solução aquosa aquecida de Tween<sup>®</sup> 80 com agitação a 800 rpm. O processo de agitação será mantido até que a emulsão esfrie a temperatura ambiente por 20 min. Os micropellets obtidos serão lavados três vezes com água e secos a temperatura ambiente após filtrados. Em seguida serão calibrados em tamis.

#### 4.1.2. Preparação dos micropellets pela técnica de spray-drying

Pela técnica de aspensão (“spray drying”) serão produzidos micropellets com matriz de cera de carnaúba ou HPMC contendo o fármaco cetoprofeno. Inicialmente serão preparadas soluções (etanólica para a cera de carnaúba e aquosa para o HPMC) do cetoprofeno contendo o agente formador de matriz. As soluções serão

preparadas em diversas concentrações para se avaliar a eficiência de incorporação do fármaco nas micropartículas. A solução devidamente preparada irá alimentar o bico aspersão por uma bomba peristáltica. A pulverização irá ocorrer pela força do ar comprimido, separando o líquido em pequenas gotículas. As gotículas, juntamente com o ar quente, serão lançados para dentro de uma câmara onde o solvente nas gotículas irá evaporar e ser eliminado através de um tubo de exaustão. O produto seco será então coletado em um frasco coletor.

#### *4.2. Preparação dos pellets*

Os pellets serão preparados por granulação úmida através de um leito fluidizado (Mycrolab<sup>®</sup>, Hüttlin). A matriz desses pellets será de cera de carnaúba ou HPMC. Inicialmente, um destes dois constituintes será transferido para o container do equipamento juntamente com o fármaco. Em seguida, será aspergido (aspersão inferior) um líquido granulante para a formação dos pellets.

Estes pellets também serão produzidos pela técnica de emulsão congelante modificando-se alguns parâmetros da técnica para a produção de micropellets.

#### *4.3. Eficiência de incorporação do fármaco nos micropellets e pellets*

A eficiência de incorporação será determinada pela extração do cetoprofeno dos micropellets e pellets e posterior quantificação por espectrofotometria, com auxílio de uma curva de calibração que será construída utilizando-se um intervalo de concentração entre 2 e 12 µg/ml (6 pontos), em tampão fosfato pH 7,4.

#### *4.4. Investigação da interação fármaco-lipídio ou fármaco-polímero*

Este estudo será realizado usando-se calorimetria exploratória diferencial (DSC). As amostras serão pesadas em 40 µl de alumínio padrão (quantidade contendo 1-2 mg de sólido) e aquecidas de 25 a 125 °C com uma taxa de aquecimento de 5 K/min, 80 ml N<sub>2</sub>/min. Os picos de fusão e entalpias serão então calculados.

#### *4.5. Medida do tamanho das partículas dos pellets e micropellets*

O tamanho e distribuição do tamanho das partículas de pellets e micropellets serão examinados empregando-se técnicas de microscopia óptica, eletrônica e tamis.

#### *4.6. Microscopia eletrônica de varredura*

Os comprimidos quebrados terão a superfície recoberta com um filme metálico (ouro) fino produzido ou evaporação em vácuo por 230 segundos e então observados com um microscópio eletrônico de varredura.

#### *4.7. Compressão das partículas de pellets e micropellets*

15 % de celulose microcristalina e 1 % de estearato de magnésio serão adicionados às formulações de micropellets e pellets e misturados em um misturador planetário. A partir das misturas serão produzidos comprimidos com 200 mg de cetoprofeno usando uma máquina compressora.

#### 4.8. Métodos de análise dos comprimidos

Os comprimidos serão analisados aplicando-se os testes físico-químicos preconizados pela Farmacopéia Brasileira (F.B., 1988), e, quando esta não fizer referência, pela última versão de uma farmacopéia internacional como a Americana. Os testes aos quais os comprimidos serão submetidos incluem: determinação de peso médio, dureza, friabilidade, tempo de desintegração e estudo de liberação *in vitro* do cetoprofeno. A liberação do fármaco dos comprimidos contendo 200 mg de cetoprofeno será realizada em 900 ml de tampão fosfato pH 7,4 a  $37 \pm 0,5$  °C, aparato 1, com 100 rpm, por 8 h. A percentagem dissolvida será determinada espectrofotometricamente.

#### 4.9. Estudo *in vivo*

##### 4.9.1. Animais

A biodisponibilidade dos comprimidos de cetoprofeno será testada em cães beagles. O grupo de estudo consistirá de dois machos e duas fêmeas. Os experimentos em animais serão realizados de acordo com os protocolos institucionais do comitê de ética da UFG.

##### 4.9.2. Amostras de sangue

As amostras de sangue (5 mL) serão coletadas de cada animal em 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3 e 8 horas após a administração dos comprimidos de cetoprofeno. As amostras coletadas serão transferidas para tubos de ensaio contendo heparina (anticoagulante) e, para prevenir a decomposição, elas serão colocadas em um recipiente com gelo antes da centrifugação. O plasma será separado por uma centrifugação a frio e congelado em frascos de vidro âmbar a  $-20$  °C antes da análise.

##### 4.9.3. Análise da concentração de cetoprofeno no plasma

Os níveis plasmáticos de cetoprofeno serão analisados usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa descrito por Patil *et al.* (2004). Soluções estoque de cetoprofeno e naproxeno serão preparadas em tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) contendo 1,0 % v/v de acetonitrila. Os plasmas padrões (1 ml) serão preparados por adição da apropriada solução de cetoprofeno no plasma livre do fármaco, para se obter concentrações variando de 0,045 – 20 mcg/ml. As amostras do plasma para calibração e clínica serão processadas e submetidas à análise por CLAE de maneira idêntica. Em síntese, 50 µL de solução de naproxeno (padrão interno) (10 mcg/ml) serão adicionados a um ml de plasma, que será então acidificado com 0,2 ml de tampão fosfato 1,0 M (pH 2,0). A amostra será então extraída com 5 ml de dietil éter e agitada em vortex por 5 min. A fase orgânica superior será separada e evaporada para secagem a 40 °C sob uma corrente de gás nitrogênio. O resíduo seco será dissolvido em 0,3 ml de fase móvel para análise por CLAE. A fase móvel consiste de tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) : acetonitrila (80:20 partes, por volume). Cetoprofeno e naproxeno serão eluídos em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min e monitorados em 254 nm.

## 5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os perfis de dissolução, ensaio *in vitro*, serão avaliados e comparados aplicando-se o teste *t* de Student. Os modelos de liberação de ordem zero, primeira ordem, Higuchi (1963) e modelo exponencial de Korsmeyer – Peppas (1983) serão aplicados e definido os que melhor se ajustam à curva de liberação do cetoprofeno. Comparações também serão feitas em relação ao tempo de dissolução médio (MDT).

Os parâmetros farmacocinéticos, ensaio *in vivo*, como a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) e o tempo para se alcançar a concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ) serão diretamente obtidos dos dados de análise do plasma. A área sob a curva concentração plasmática – tempo ( $AUC_{(0-8)}$ ) também será analisada. Esses dados serão comparados por análise de variância e/ou teste *t*.

### Agradecimentos

FINEP, FUNAPE, CAPES e CNPq.

### Referências

- DASHEVSKY, A.; KOLTER, K.; BODMEIER, R. Compression of pellets coated with various aqueous polymer dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 279, p. 19-26, 2004.
- Farmacopéia Brasileira (F.B.), 4. ed., Atheneu: São Paulo, 1988.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* v. 52, p. 1145-1149, 1963.
- KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.M.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* v. 15, p. 25-35, 1983.
- LIVERSIDGE, G.G.; KETOPROFEN, in: K. Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substance*, Academic Press, Inc, New York, p. 443-471, 1981.
- PALMIERI, G.F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres, *Int. J. Pharm.* v. 242, p. 175-178, 2002.
- PATIL, P.; PRAVEEN, S.; SHOBHA RANI, R. H.; PARADKAR, A. Bioavailability Assessment of Ketoprofen incorporated in Gelled Self-emulsifying Formulation: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech.*, p. 1-12, 2004.
- REYNOLDS, J.E.F. in: Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 31st ed, Royal Pharmaceutical Society, London, pp. 55, 1996.
- SAWICKI, W; LUNIO, R. Compressibility of floating pellets with verapamil hydrochloride coated with dispersion Kollicoat SR 30 D. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. xx, p. 1-6, 2005.
- SCHWENDEMAN, S.P.; CARDAMONE, M.; BRANDON, M.R.; KLIBANOV, A.; LANGER, R. Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microparticles, in: *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, Marcel Dekker, New York, pp. 1-49, 1996.
- SJOBLOM, B. Method to obtain microparticles. /US Patent n. 20046753014/ (22 de junho de 2004).
- ÜNER, M.; GÖNÜLLÜ, Ü.; YENER, G.; ALTINKURT, T. A new approach for preparing a controlled release ketoprofen tablets by using beeswax. *IL FÁRMACO*, v. 60, p. 27-31, 2005.
- VERGOTE, G.J.; VERVAET, C.; VAN DRIESSCHE, I.; HOSTE, S.; DE SMEDT, S.; DEMEESTER, J.; JAIN, R.A.; RUDDY, S.; REMON, J.P. In vivo evaluation of matrix pellets containing nanocrystalline ketoprofen, *Int. J. Pharm.* v. 240, p. 79-84, 2002.