

EFEITO DO USO DE ETANOL COMO COSSOLVENTE NA IMPREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA DE CETOPROFENO EM FILMES DE QUITOSANA-XANTANA

I. G. VEIGA¹, M. E. M. BRAGA², H. C. SOUSA², P. T. V. ROSA³ e A. M. MORAES⁴

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

² Universidade de Coimbra , Departamento de Engenharia Química

³ Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química

⁴ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: itiara@furg.br

RESUMO – Filmes de quitosana-xantana (Q-X) apresentam grande potencial na cicatrização de lesões dérmicas, auxiliando no tratamento e na diminuição da dor. Estes filmes podem ser associados a um anti-inflamatório com efeito analgésico como o cetoprofeno. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo verificar a incorporação de cetoprofeno em filmes de Q-X por impregnação supercrítica com CO₂. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental 2³, variando a temperatura (40 e 50°C), a pressão de operação (150 e 300 bar) e a presença do cossolvente etanol. A análise da incorporação de cetoprofeno foi realizada através da liberação deste em solução de PBS por 24 h (37°C, 100 rpm) e quantificação por espectrofotometria a 260 nm. Foram obtidos resultados para a incorporação entre 1,6 e 20,0 mg/g de filme. A adição de etanol e o aumento da pressão de operação resultaram no aumento da incorporação, enquanto que a temperatura não teve efeito significativo na impregnação. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de impregnação de cetoprofeno em filmes de Q-X utilizando o método de impregnação supercrítica.

1. INTRODUÇÃO

A incorporação de fármacos em dispositivos formados por polímeros biocompatíveis tem recebido atenção crescente nos últimos anos na área farmacêutica (Duarte *et al.*, 2006). Muitos compostos ativos apresentam pouca solubilidade em água e sua incorporação é dificultada em tais dispositivos (Coimbra *et al.*, 2008).

As tecnologias envolvendo fluido supercrítico têm sido cada vez mais aplicadas na formação de dispositivos, polimerização, intumescimento e impregnação de polímeros. O interesse no uso dessas tecnologias é atribuído aos efeitos substanciais destes fluidos em polímeros, tais como a diminuição da temperatura de transição vítreia (efeito plastificante) e o seu intumescimento reversível (Kikik e Vecchione, 2003).

Os processos de impregnação utilizando fluidos supercríticos são viáveis quando o

fármaco é solúvel no fluido, a matriz polimérica é intumescida pela solução supercrítica e o coeficiente de partição do fármaco no polímero é favorável (Kikik e Vecchione, 2003). Neste caso, o fármaco é solubilizado, por exemplo, em dióxido de carbono supercrítico, e introduzido em uma célula de alta pressão que contenha o dispositivo polimérico. Posteriormente é realizada a descompressão lenta nesta célula para remoção do dióxido de carbono sem danificar a matriz polimérica (Braga *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2008).

As principais vantagens desta abordagem são a obtenção de produtos com elevada pureza e isentos de solventes nocivos, bem como a redução de custos, uma vez que não é necessária a remoção de solventes residuais (Kikik e Vecchione, 2003). Outra vantagem é que os fluidos supercríticos, como o dióxido de carbono, podem atuar como um agente plastificante, ajudando na difusão do fármaco para a matriz (Braga *et al.*, 2008).

A solubilidade do soluto no meio supercrítico é um dos parâmetros mais importantes para a otimização do processo de impregnação. O uso de um cossolvente pode modificar as interações entre o fármaco, a matriz polimérica e o fluido, alterando as taxas de impregnação. Cossolventes podem contribuir significativamente para o aumento da eficiência do processo de impregnação supercrítica através do aumento da polaridade do dióxido de carbono e, consequentemente, da solubilidade de fármacos polares. É possível também melhorar a impregnação de fármacos hidrofóbicos em matrizes hidrofílicas, como hidrogéis, pela redução da polaridade da água na matriz (Braga *et al.*, 2011).

Matrizes hidrofílicas biocompatíveis podem ser obtidas com sucesso pela complexação dos polímeros quitosana e xantana (Veiga e Moraes, 2012). Tais matrizes podem ser empregadas como curativos, dispositivos de liberação controlada, *scaffolds* em engenharia de tecidos e como cobertura para alimentos. Para esse fim, os filmes devem apresentar adequada estabilidade em soluções aquosas, assim como satisfatória permeabilidade ao soluto que será incorporado, além de outras propriedades relevantes.

Frente a isto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a viabilidade de incorporação de cetoprofeno, um agente anti-inflamatório, em filmes de quitosana e xantana utilizando a técnica de impregnação supercrítica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os filmes foram obtidos de acordo com o procedimento descrito por Veiga e Moraes (2012). O fármaco utilizado foi o cetoprofeno (Sigma-Aldrich), os solventes foram dióxido de carbono (Praxair) e etanol absoluto (Synth). Os experimentos de liberação do fármaco foram realizados em tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4 (Sigma-Aldrich).

2.2. Experimentos de impregnação com CO₂ supercrítico

O sistema de impregnação supercrítica consistiu de uma célula de alta pressão de aço inoxidável com volume interno útil de 15,7 cm³, uma estufa com circulação de ar (Nova Ética) para manter a temperatura da célula que é instalada no seu interior, uma bomba recíproca refrigerada (Thar SFC modelo P-50A) para compressão do dióxido de carbono líquido e válvulas para o controle de entrada e saída do fluido. O efeito das variáveis independentes pressão (150 a 300 bar), temperatura (40 a 50 °C) e presença do co-solvente etanol (zero ou 0,5% em fração molar) na incorporação do cetoprofeno foi analisado por meio de um planejamento experimental do tipo 2³ (Tabela 1). Foram utilizadas amostras de 1 x 1 cm², com massa de fármaco considerando-se a saturação do sistema (determinada através dos dados de solubilidade do fármaco nas condições utilizadas e do volume interno da célula), por um tempo de contato de 4 h e taxa de despressurização de 5 bar/min. Os resultados foram analisados estatisticamente através do software Statistica 7.0.

Tabela 1 - Planejamento experimental utilizado nos experimentos de impregnação de cetoprofeno em filmes quitosana-xantana.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Presença de co-solvente
1	40	150	-
2	50	150	-
3	40	300	-
4	50	300	-
5	40	150	+
6	50	150	+
7	40	300	+
8	50	300	+

2.3. Análise da morfologia dos filmes

A morfologia dos filmes foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Leica (modelo LEO 440). As amostras foram previamente mantidas em ambiente com sílica-gel ativada por 24 h, após foram criofraturadas com nitrogênio líquido, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies.

2.4. Determinação da eficiência de incorporação de cetoprofeno

A eficiência de incorporação (ϵ), foi calculada de acordo com a Equação 1, após a extração do fármaco das amostras com PBS a 37 °C por 24 h e analisado em espectrofotômetro a 260 nm.

$$\epsilon = \frac{\text{massa final defármaco/massa de filme}}{\text{massa inicial defármaco/massa de filme}} \times 100\% \quad (1)$$

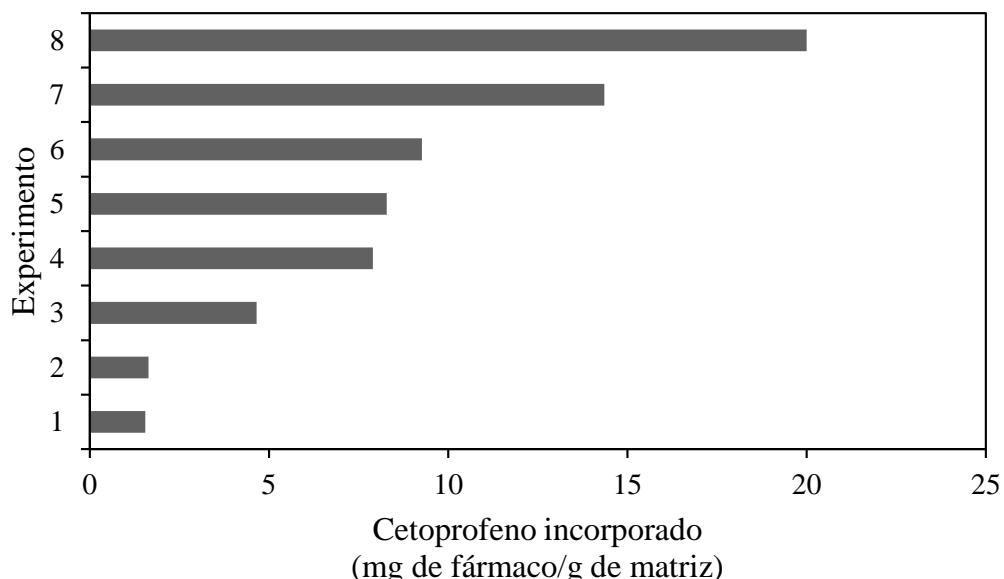
2.5. Liberação *in vitro* do cetoprofeno

Para o estudo da liberação *in vitro* do fármaco, amostras de 1 x 1 cm² foram colocadas em cubetas de quartzo contendo 3,5 ml de PBS. Estas cubetas foram mantidas à 37 °C sob agitação orbital de 100 rpm e a absorbância da fase líquida a 260 nm foi analisada periodicamente para a determinação da concentração do fármaco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da variação da pressão, da temperatura e da adição de etanol na incorporação de cetoprofeno nas matrizes estão apresentados na Figura 1. Observa-se variações na incorporação de 1,6 até 20 mg de fármaco por g de matriz.

Figura 1 - Resultados obtidos para incorporação de cetoprofeno nos filmes quitosana-xantana



O diagrama de Pareto obtido pela análise estatística dos resultados de massa de cetoprofeno incorporado por massa de matriz polissacarídica é mostrado na Figura 2, na qual se observa que todas as variáveis tiveram efeito positivo na incorporação do fármaco. Entretanto, apenas a pressão e a presença de cossolvente apresentaram efeito significativo no sistema, sendo estes duas e três vezes maiores que o efeito da temperatura, respectivamente. O uso de etanol, adicionado na célula anteriormente ao CO₂, resulta no aumento da polaridade da fase móvel, possibilitando o aumento da solubilidade do cetoprofeno no meio supercrítico e da quantidade de fármaco transportado até o interior do filme. Além disso, o fluido supercrítico é capaz de

aumentar o volume livre e a mobilidade das cadeias poliméricas, facilitando o processo de difusão do fármaco em matrizes poliméricas (Natu *et al.*, 2008).

De acordo com Sabegh *et al.* (2012), as variáveis temperatura e pressão têm efeito direto e positivo na solubilidade do cetoprofeno em dióxido de carbono supercrítico. Este comportamento está associado à maior densidade do CO₂ quando em maiores pressões, aumentando a capacidade de solvatação no meio e, consequentemente, a solubilidade do fármaco. O aumento da temperatura nas faixas estudadas ocasiona diminuição da densidade do fluido supercrítico, entretanto eleva a pressão de vapor, havendo assim competição destes dois fatores no efeito da temperatura na modificação da solubilidade do cetoprofeno. Neste caso e nas condições testadas pelos autores, o efeito da temperatura na pressão de vapor é dominante em relação à diminuição da densidade, elevando a solubilidade do cetoprofeno (Sabegh *et al.*, 2012).

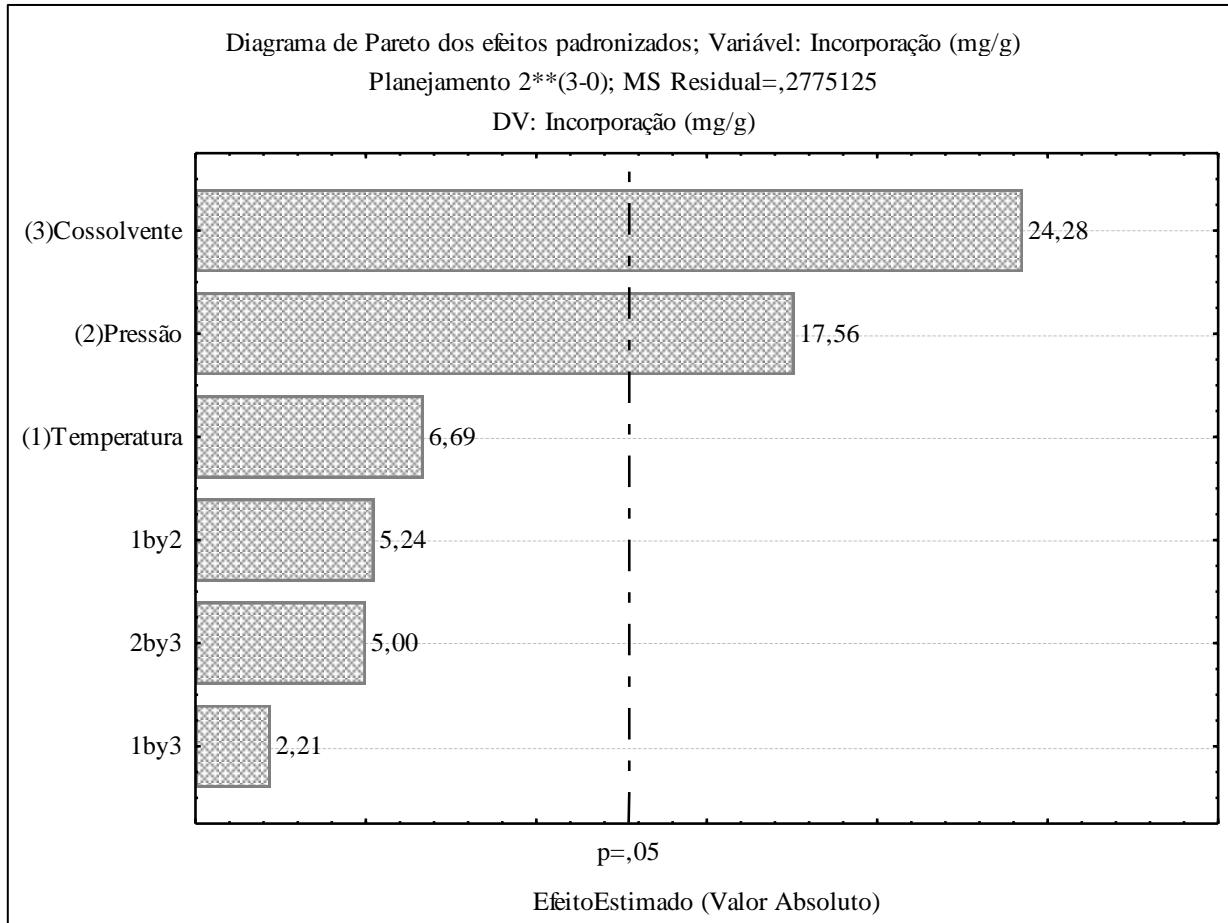


Figura 2 - Diagrama de Pareto dos efeitos da incorporação de cetoprofeno em filmes de quitosana e xantana por impregnação supercrítica.

A baixa eficiência de incorporação observada nas matrizes, inferior a 6 % (Tabela 2), pode ser atribuída ao limitado intumescimento dos polissacarídeos complexados no sistema testado. Cortesi *et al.* (2000) observaram eficiência de incorporação de cetoprofeno em matrizes de PMMA um pouco maiores, em torno de 8%, provavelmente devido à maior capacidade de intumescimento desta matriz frente ao dióxido de carbono supercrítico em comparação aos filmes deste trabalho.

O aspecto típico da superfície e da secção transversal dos dispositivos processados é ilustrado na Figura 3, com foco no ensaio que resultou em maior incorporação do cetoprofeno (ensaio 8) e no ensaio 4, que difere do 8 apenas pela não utilização do etanol como cossolvente. Observa-se na Figura 3A um fragmento cristalizado de cetoprofeno precipitado na superfície do filme, enquanto que estruturas similares não são visíveis na Figura 3B. Nota-se também a formação de ondulações globulares (com diâmetro entre 1 e 10 µm) na superfície das amostras que foram processadas na presença do cossolvente etanol (Fig. 3D). Tal formação pode estar relacionada com a maior incorporação de fármaco neste caso (20 mg/g) em comparação com o experimento sem cossolvente (8 mg/g). Os polímeros tendem a intumescer na presença de dióxido de carbono supercrítico e retornar a sua forma original após a lenta despressurização. Porém, com a presença de uma quantidade maior de cetoprofeno no interior da matriz, o retorno dos polímeros a sua forma inicial pode ter sido comprometido.

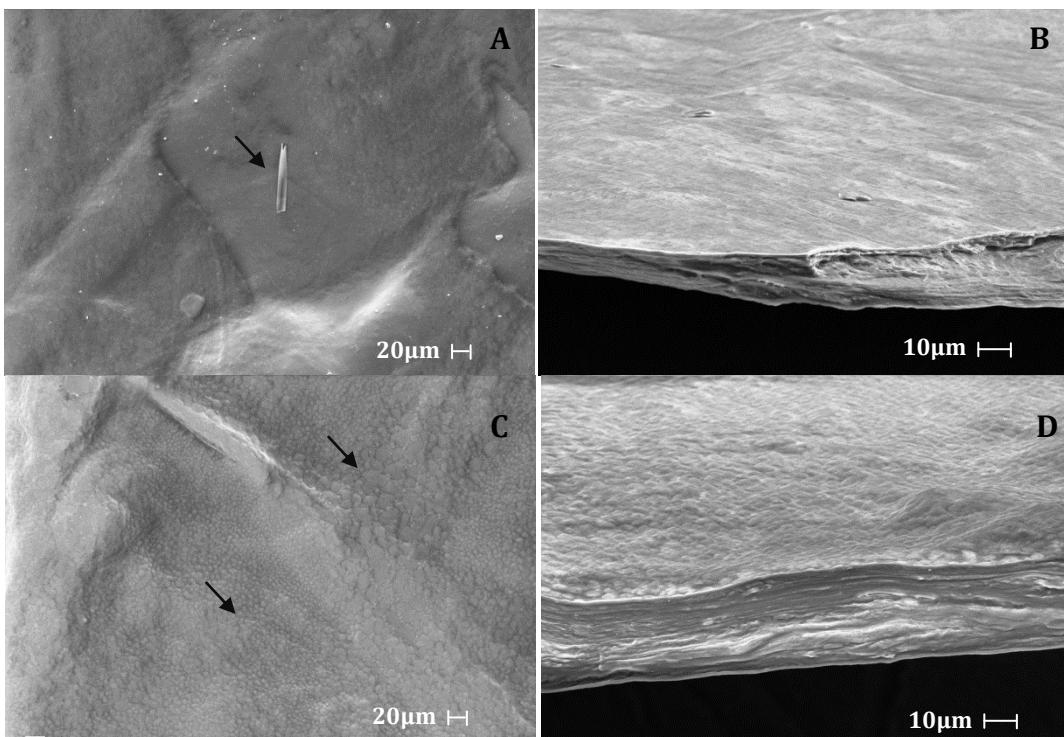


Figura 3 - Superfície e secção transversal dos filmes quitosana-xantana expostos à impregnação de cetoprofeno com CO_2 supercrítico: (A,B) experimento 4 e (C,D) experimento 8.

O comportamento de liberação do fármaco ao longo do tempo dos filmes processados nas condições dos ensaios 4 e 8 é mostrado na Figura 4. Nota-se que a liberação ocorreu quase que em sua totalidade na primeira hora de contato. Bazzo *et al.* (2009) também observaram este tipo de comportamento em micropartículas de quitosana e poli(3-hidroxibutirato) e relacionaram com a rápida difusão do fármaco pela matriz polimérica e com a distribuição preferencial deste na superfície dos dispositivos. Wang *et al.* (2011), em estudo similar, associaram a rápida liberação inicial de cetoprofeno incorporado em filmes microfibrosos de quitosana à alta capacidade de intumescimento do filme no meio de liberação e à pouca interação entre o fármaco hidrofóbico e o polímero hidrofílico.

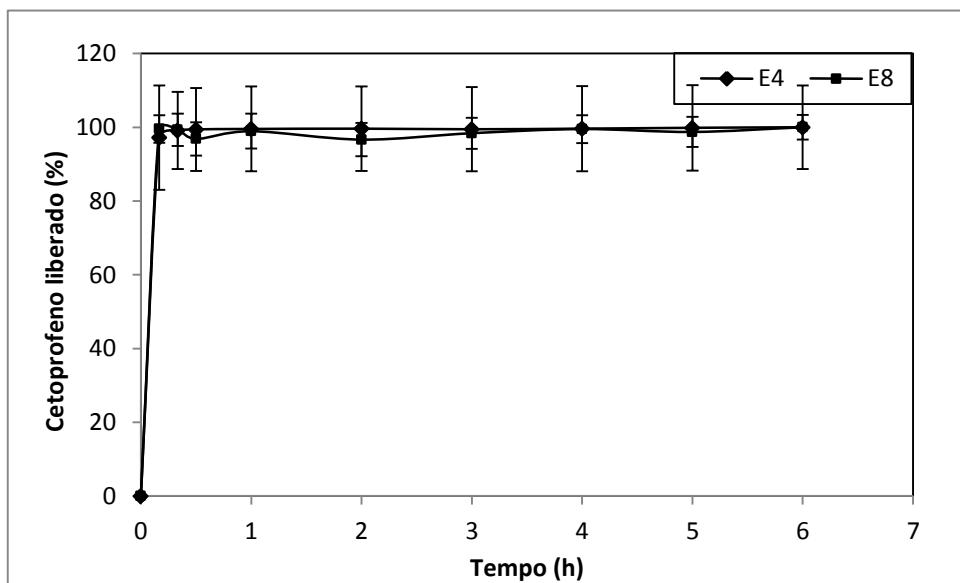


Figura 4 - Porcentagem de liberação em PBS a 37 °C de cetoprofeno incorporado em membranas de quitosana-xantana em diferentes condições supercríticas: (◆) 50 °C, 300 bar, sem cossolvente e (■) 50 °C, 300 bar, com cossolvente.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de impregnação de cetoprofeno em filmes de quitosana-xantana utilizando o método de impregnação supercrítica. O uso de um cossolvente como o etanol melhora a eficiência do processo, visto que aumenta a polaridade do fluido supercrítico e facilita a penetração do fármaco na matriz polimérica. Outro parâmetro importante neste processo é a pressão (e consequentemente a densidade do fluido), uma vez que esta é a principal responsável pelo aumento da solubilidade do cetoprofeno no dióxido de carbono. Nas condições testadas, o cetoprofeno apresentou liberação na primeira hora de contato, demonstrando que os filmes produzidos não apresentam capacidade de controle da liberação do agente ativo.

5. REFERÊNCIAS

- BAZZO G. C.; LEMOS-SENNA E.; PIRES A. T. N. Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan /ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydr. Polym.*, v. 77, p. 839–844, 2009.
- BRAGA, M. E. M.; PATO, M. T. V.; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I.; GIL, M. H.; DUARTE, C. M. M.; SOUSA, H.C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *J. Supercrit. Fluids*, 44, p. 245-257, 2008.
- BRAGA, M. E. M.; COSTA, V. P.; PEREIRA, M. J. T.; FIADEIRO, P. T.; GOMES, A. P. A R.; DUARTE, C. M. M.; SOUSA, H.C. Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses. *Inter. J. Pharm.*, V.420, p. 231-243, 2011.
- COIMBRA, P.; FERNANDES, D.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. J. Solubility of diflunisal in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Data*, v. 53, p. 1990-1995, 2008.
- CORTESI, A.; ALESSI, P.; KIKIC, I.; KIRCHMAYER, S.; VECCHIONE, F. Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization. *J. Supercrit. Fluids*, v. 19, p. 61-68, 2000.
- DAVIES, O. R.; LEWIS, A. L.; WHITAKER, M. J.; TAI, H.; SHAKESHEFF, K. M.; HOW, S. M. Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, p. 373-387, 2008.
- DUARTE, A. R. C.; COSTA, M. S.; AGUIAR-RICARDO, A.; SIMPLÍCIO, A. L.; CARDOSO, M. M.; DUARTE, C. M. M. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs. *Inter. J. Pharm.*, v. 308, p. 168-174, 2006.
- KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, v. 7, p. 399-405, 2003.
- NATU, M.V.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/ poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications. *J. Supercrit. Fluids*, v. 47, p. 93-102, 2008.
- SABEGH, M.A.; RAJAEI, H.; ESMAEILZADEH, F.; LASHKARBOOOKI M. Solubility of ketoprofen in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, v. 72, p. 191– 197, 2012.
- VEIGA, I. G.; MORAES, Â. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan–xanthan membranes. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 124, p. E154- E160, 2012.
- WANG, Z.; WU, H.; LIAO, C.; ZHOU, N.; CHENG, W.; WAN, Y. Sustained release of ketoprofen from fibrous chitosan-poly(ϵ -caprolactone) membranes. *Carbohydr. Polym.*, v. 84, p. 624–630, 2011.
- AGRADECIMENTOS:** à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.