

## IMPORTÂNCIA DE PARÂMETROS DE CONTROLE NA ELABORAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE Ca<sup>2+</sup> - ALGINATO

### IMPORTANCE OF CONTROL PARAMETERS IN THE PREPARATION OF MICROPARTICLES OF Ca<sup>2+</sup> - ALGINATE

CULPI, T.A.<sup>1</sup>; PASQUALIM, P.<sup>1</sup>; FIN, M.T.<sup>1</sup>; SASSO, D.G.B.<sup>1</sup>; KAMINSKI, G.A.T.<sup>1</sup>;  
FUJIWARA, G.M.<sup>2</sup>; NUNES, P.M.P.<sup>2</sup>; RODRIGUES, B.H.<sup>3</sup>; DIAS, J.F.G.<sup>4</sup>; ZANIN,  
S.M.W.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> - Acadêmicos do Curso de Farmácia, Iniciação Científica - Universidade Federal do Paraná.

<sup>2</sup> - Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR

<sup>3</sup> - FMC BioPolymer Química do Brasil Ltda

<sup>4</sup> - Professora de Farmacotécnica, Curso de Farmácia - Universidade Federal do Paraná.

Endereço para correspondência: sandrazanin@ufpr.br

REC:09/09 AC: 10/09

#### RESUMO

As microcápsulas de alginato de cálcio, como também as gotas ou pérolas ou os sistemas matriciais, representam um dos carreadores mais usados mundialmente na imobilização de enzimas e proteínas bem como de drogas de liberação controlada. Neste trabalho foi abordado o processo de obtenção de micropartículas de alginato por técnica de gotejamento utilizando cloreto de cálcio no processo chamado gelificação iônica. Foram analisadas diferenças na morfologia das micropartículas e distribuição do material núcleo, e de que forma estas são influenciadas por variações nas condições de elaboração da técnica como altura e ângulo da seringa, velocidade de agitação, além da concentração de alginato.

**Palavras-chaves:** micropartícula; alginato; gelificação iônica

#### ABSTRACT

Microparticles of sodium alginate, as well as drops or pearls or matrix systems, are among the most widely used carriers for the immobilization of enzymes and proteins as well as for the controlled release of drugs. This work discussed the process to obtain microparticles of alginate by dripping technique using calcium chloride in a process called ionic gelation. The microparticles morphology and distribution of core material are influenced by preparation conditions technique such as height and angle of the syringe, stirring speed, and the concentration of alginate.

**Keywords:** microparticles; alginate; ionic gelation

## 1. INTRODUÇÃO

As microcápsulas de alginato de cálcio, como também as gotas ou pérolas ou os sistemas matriciais, representam um dos carreadores mais usados mundialmente na imobilização de enzimas e proteínas bem como de drogas de liberação controlada (WAN; HENG; CHANG, 1992, SUGAWARA; IMAI; OTAGIRI, 1994; FUNDUEANU *et al.* 1999; GONÇALVES, *et al.*, 2005; YOO *et al.* 2006).

Dentre os diversos métodos de produção de microcápsulas está o processo por gelificação iônica que é simples e de baixo custo, ocorrendo quando uma solução polimérica de alginato de sódio contendo o material núcleo é gotejada sobre uma solução iônica em concentrações adequadas, podendo-se obter níveis de encapsulamento e

cápsulas de diferentes formas e tamanhos (MUKAI-CORREA *et al.*, 2005). Este método resulta na formação instantânea de micropartículas que encapsulam células ou drogas dentro de uma rede tridimensional (VOS *et al.*, 2009; DRAGET *et al.*, 1997).

Alginato, um dos polissacarídeos aniônicos lineares, consiste de  $\beta$  - 1,4 - D- ácido manurônico (bloco - M) e  $\alpha$  - 1,4 - L - ácido gulurônico (bloco - G), derivados de algas marrons como a *Laminaria digitata* e *L. hyperborica* (YOO *et al.* 2006). Suas propriedades gelificantes são provenientes de ligação cooperativa dos cátions divalentes localizados entre os blocos homopoliméricos de resíduos de guluronato ou blocos - G. Os íons cálcio estão localizados dentro de cavidades eletronegativas, tipo ovos em uma caixa de ovos e desta semelhança surgiu o termo modelo “caixa de ovo”. As interações iônicas entre os blocos guluronato e os íons Ca conduzem à formação de um gel termoestável forte cujas propriedades dependem largamente das características do polímero e do método de preparação (FUNDUEANU *et al.* 1999, VOS *et al.*, 2009).

Em estudos desenvolvidos por FUNDUEANU *et al.* (1999) observou-se que o grau de substituição é quase total se as micropartículas forem deixadas na presença de íons Ca por 1 hora. Sobre o efeito do pH do meio de inchamento sobre as características das micropartículas isoladas observou-se que em solução ácida a pH 3 resultou em substituição parcial de íons cálcio com prótons. Neste pH o conteúdo de cálcio diminuiu para DS (“Swelling Degree” ou grau de inchamento) de 20%. A presença residual de íons Ca na micropartícula foi atribuída ao Ca alocado dentro da estrutura “caixa de ovo” e, de fato, 20% representa a frequência de blocos de ácido gulurônico. Em outras palavras, após o tratamento em pH baixo, os íons Ca permaneceram somente nas cavidades eletronegativas dos blocos G, por fornecerem um complexo mais estável. O tratamento das micropartículas com uma solução a pH mais baixo (pH 2 e 1), ocasiona o deslocamento total do cálcio da rede polimérica; após este tratamento, mesmo que os íons cálcio não contribuam mais na estabilização das micropartículas elas mantêm sua estrutura macroscópica com propriedades mecânicas semelhantes àquelas cruzadas ionicamente. Esta propriedade foi explicada considerando a formação de pontes de hidrogênio que fornecem uma estrutura estável ao sistema. Aumentando novamente o pH para 3,25 e 3,75 e tratando as micropartículas com quantidades progressivas de solução de NaOH 0,1N conduz a um aumento progressivo na sua porosidade e, se um excesso de NaOH é acrescentado ocorre completa dissociação e solubilização. Aos mesmos resultados chegaram ACARTURK e TAKKA (1999) citados em YOO *et al.* (2006) sobre a influência do pH na estabilidade das micropartículas, onde “estruturas em gel de alginato são relativamente estáveis em pH ácido, mas incham facilmente e desintegram sob condições alcalinas suaves”.

Partículas obtidas pelo método de gotejamento são secas por processos de congelamento, exposição ao ar e tratamento com misturas água/etanol que influenciam nas características morfológicas superficiais da micropartícula (FUNDUEANU *et al.*, 1999).

Quanto ao processo de obtenção, as micropartículas de alginato podem ser preparadas, entre outros, por método de emulsificação, ligação cruzada com epicloridrina e por técnica de gotejamento utilizando cloreto de cálcio no processo chamado gelificação iônica. As micropartículas preparadas pelo método de emulsificação e gelificação iônica são caracterizadas por poros menores que as preparadas por outros métodos devido à alta concentração de polímero na solução como também ao processo de secagem que

conduz a estruturas compactas. Além disso, estas partículas apresentam uma superfície uniforme devido às condições suaves de preparo, como uma estrutura em crochê. Após secas as micropartículas preparadas por técnica de gotejamento não reidratam e, conseqüentemente, não incham significativamente e mantêm a estrutura compacta. Todos estes fatores são importantes pois englobam propriedades de permeabilidade, resistência mecânica, propriedades de superfície e condições de estocagem (VOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2003; HILDEBRAND; TACK, 2000; FUNDUEANU *et al.*, 1999).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

Alginato de sódio FMC U.S. BioPolymer, Cloreto de cálcio (Pharmaspecial / grau farmacêutico), Água deionizada e destilada, Óleo de oliva (Purifarma / grau farmacêutico), Corante "fat red" (Sigma Chemical), Agitador magnético, Agitador em hélice, Balança analítica, Banho-maria elétrico, Microscópio óptico, Seringa de vidro com agulha (BD), Estufa elétrica.

### **2.2 MÉTODOS**

As micropartículas de alginato de sódio foram produzidas usando técnica de gotejamento de solução de alginato e material núcleo sobre solução de cloreto de cálcio, sendo esta a base para a formação das partículas. Foram preparadas soluções de alginato de sódio em concentrações de 0,3% (solução A) e 0,5% (solução B) e então foi adicionado 3% de óleo de oliva (material núcleo) em relação à solução, previamente corado com corante lipofílico "fat red", sob condições controladas como vigorosa agitação magnética e temperatura de 60°C. A solução A foi gotejada sobre soluções de cloreto de cálcio a 0,25%, 1,0% e 2,0%, as quais foram mantidas sob agitação em agitador em hélice à 250rpm. O mesmo processo foi realizado para a solução B. Em seguida as partículas foram lavadas abundantemente com água destilada sobre tamis 60 mesh e então secas em estufa entre 35 - 40°C por 1 hora sobre placa de Petri. Uma segunda técnica, sugerida por FUNDUEANU (1999) consistiu em gotejar as soluções A e B em cloreto de cálcio com auxílio de seringa de vidro em ângulo de 90°, respeitando-se a distância de 6,0 a 7,0cm entre a ponta da agulha e a solução de cloreto. Ao final do gotejamento as micropartículas permaneceram em repouso por uma hora na solução de cloreto de cálcio e em seguida foram lavadas abundantemente com água destilada sobre tamis 60 mesh e então secas em estufa entre 35 - 40°C por 1 hora sobre placa de Petri.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos mostram que variações nas condições de elaboração da técnica levam a diferenças na morfologia das micropartículas e na distribuição do óleo quando considerados altura e ângulo da seringa de gotejamento, velocidade de agitação e diferentes concentrações de polímero.

Nos primeiros experimentos onde estes parâmetros não foram considerados,

observou-se que, quanto à altura de gotejamento, distâncias menores conduziram a formação de micropartículas caracterizadas por caudas curtas, forma oval, agregadas e com incorporação de óleo bastante variada, enquanto a distâncias maiores uma deformação mais acentuada das partículas obtidas foi observada. Em testes realizados dentro dos parâmetros pré-estabelecidos, evidenciou-se uma melhora quanto às características morfológicas, ou seja, as partículas se mostraram aproximadamente esféricas e sem agregação entre as mesmas. Quanto à distribuição do material núcleo, este apresentou multinucleações de forma regular, em algumas partículas mais centradas (Figura 1A) e em outras mais deslocadas (Figura 1B e 1C) além de apresentar melhor distribuição quando comparado ao primeiro experimento (Figura 2 A e B).

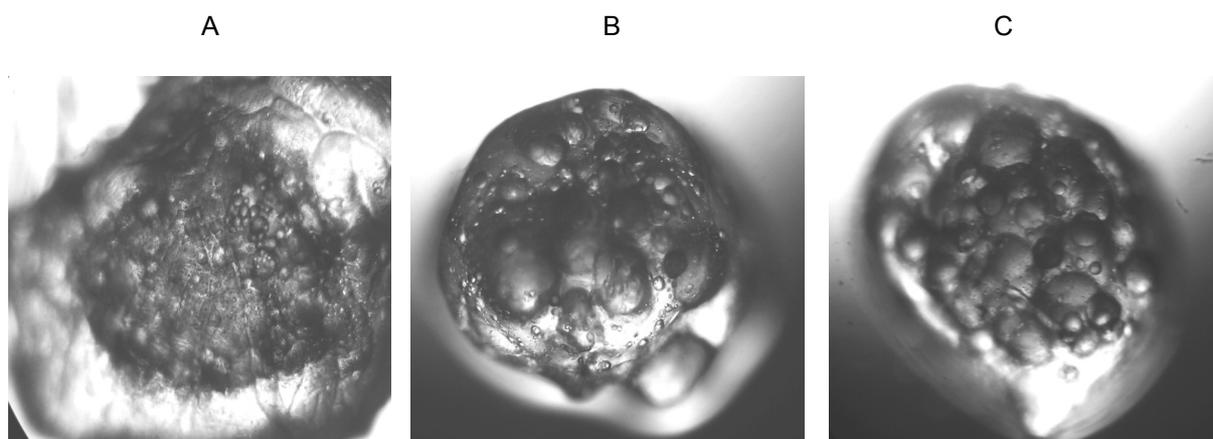


FIGURA 1 - MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO 0,3% E CLORETO DE CÁLCIO 1,0%, VISÃO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO em aumento de 10x. A – Multinucleação centrada; B e C – Multinucleações deslocadas nas partículas.

FONTE: o autor (2010)

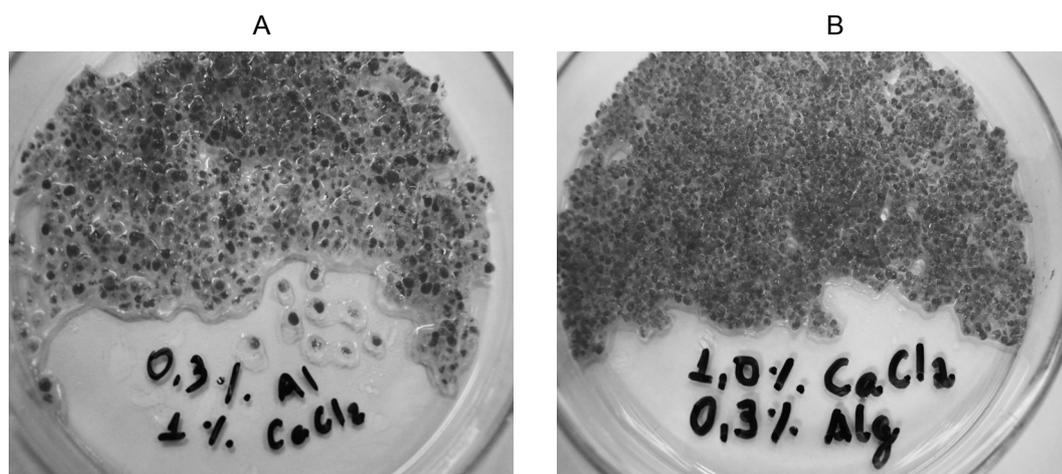


FIGURA 2 - MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO 0,3% E CLORETO DE CÁLCIO 1,0%; tamanho natural. A – partículas de alginato 0,3% e cloreto de cálcio 1,0% sem considerar os parâmetros experimentais definidos. B - partículas de alginato 0,3% e cloreto de cálcio 1,0% seguindo os parâmetros experimentais definidos.

FONTE: o autor (2010)

Dados não mostrados revelam que a alta rotação não permite uma adequada formação das micropartículas, as quais apresentam caudas longas e alta agregação. Portanto, determinou-se a rotação de 250 rpm, para fins de estudo. Contudo, velocidades altas sob agitação em Ultra-Turrax da ordem de 15.000 rpm é aconselhável para homogeneizar bem o óleo na solução de alginato, o que resulta em distribuição mais uniforme, mas não elimina a nucleação.

Os resultados obtidos estão de acordo com FUNDUEANU *et al.* (1999) que selecionou como distância ótima entre o orifício da agulha e a superfície da solução de cloreto de cálcio o valor de 6 cm.

A partir das condições controladas de angulação, altura e rotação, as micropartículas que obtiveram um melhor aspecto foram as preparadas a partir de 0,3% de alginato e 1% de cloreto de cálcio. A fim de estabelecer qual concentração mostrava a melhor formação das partículas, foi aumentada a concentração do alginato de sódio de 0,3% para 0,5%. Conforme a Tabela 1, nota-se que as diferenças entre as concentrações seriam acerca do tamanho e da distribuição do óleo. Nas partículas com 0,5% de alginato houve um ligeiro aumento de tamanho da partícula, entretanto a distribuição do óleo foi melhor que a de menor concentração. Supostamente isto ocorre porque em concentrações maiores de alginato, o material núcleo consegue se manter de maneira mais homogênea na solução por esta estar mais espessa, o que levaria a pensar que a melhor concentração seria a de 0,5% de alginato. Apesar das partículas preparadas a 0,3% e 0,5% de alginato conseguirem facilmente liberar o seu conteúdo quando pressionadas na pele, no seu estado de inchamento, a formação de resíduo de alginato de cálcio mostrou-se levemente maior na concentração de 0,5%, o que é esperado.

TABELA 1: Comparação de micropartículas de alginato de sódio em diferentes concentrações em solução de cloreto de cálcio a 1,0%.

|                      | <b>Solução de Alginato 0,3%;<br/>CaCl<sub>2</sub> 1,0%</b> | <b>Solução de Alginato 0,5%;<br/>CaCl<sub>2</sub> 1,0%</b> |
|----------------------|--|--|
| Tamanho              | 1,5mm  | ~2,0mm   |
| Morfologia           | Aproximadamente esféricas,<br>regular                      | Aproximadamente esféricas,<br>regular                      |
| Agregação            | Nenhuma  | Nenhuma  |
| Distribuição do óleo | Multinucleadas, pouco<br>irregular                         | Multinucleadas, regular                                    |
| Incorporação do óleo | Alta   | Alta   |

FONTE: O autor (2010)

#### 4. CONCLUSÃO

O método de microencapsulamento por gotejamento é um método simples,

reprodutível e rápido. A otimização da técnica através de medidas simples de controle experimentais mostraram-se importantes na melhora e desenvolvimento das microcápsulas. Levando em consideração os parâmetros experimentais, a melhor formação de partículas foi obtida na concentração de 0,5% de alginato, apesar do resíduo levemente superior de alginato de cálcio que permaneceu sobre a pele.

Futuros estudos podem ser realizados em relação à textura, aplicabilidade, facilidade de liberação do óleo, capacidade de encapsulamento e presença ou não de resíduo sobre a pele.

## REFERÊNCIAS

WANG, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Drug encapsulation in alginate microspheres by emulsification. **Journal Microencapsulation**, v.9, p. 309-316, 1992.

SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. **Pharmaceutical Research**, v.11, p. 272-277, 1994.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials** **20**, p.1427-1435, 1999.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.; DRAGO, V. Liberação de ferro (III) de microesferas reticuladas de quitosana. **Visão Acadêmica**, v.6, n.1, Jan. / Jul., 2005.

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P.S; LEE, H. G. Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules** **38**, p. 25-30, 2006.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 73-80, Jan./Mar., 2005.

VOS, P. de; BUCKO, M.; GEMEINER, P.; NAVRÁTIL, M.; STIVEL, J.; FAAS, M.; STRAND, B. L.; SKJAK-BRAEK, G.; MORCH, Y. A.; VIKARTOVSKÁ, A.; LACIK, I.; KOLLÁRIKOVÁ, G.; ORIVE, g.; PONCELET, D.; PEDRAZ, J.L.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Multiscale requirements for biencapsulation in medicine and biotechnology, **Biomaterials** **30**, p.2559-2570, 2009.

DRAGET, K. I.; STEINSVAG, K.; ONSOYEN, E.; SMIDSRØD, O. Na- e K- alginate; effect on  $Ca^{2+}$ -gelation. **Carbohydrate Polymers** **35**, p. 1-6, 1998.

ACARTURK, F.; TAKKA, S. **Journal of Microencapsulation** **16**, p.291, 1999 IN: YOO *et al.* Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules** **38**, p. 25, 2006.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** (*Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*), v.39, n.1, Jan./Mar., 2003.

HILDEBRAND, G. E.; TACK, J. W. Microencapsulayion of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics** **196**, p. 173-176, 2000.