



FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE PHB E PHB-V UTILIZADOS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE

Flavia Martellini^{1*}, Maria T.C.P. Ribela², Paolo Bartolini², Mario Carezza³, Lucia H.I. Mei¹

^{1*} Depto. de Tecnologia de Polímeros, FEQ-UNICAMP, 13083-970 Campinas/SP - marteli@terra.com.br; ² Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CNEN/SP - pbartoli@ipen.br; ³ Instituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività ISOF/C.N.R - Legnaro (Padova), Itália - carezza@lnl.infn.it

Polymeric films based on PHB and PHB-V used as controlled delivery systems of recombinant human growth hormone

Due to its short half-life and necessity for daily subcutaneous injections, recombinant human growth hormone (rhGH) would best be administered in a controlled release formulation. One approach to this is the use of potentially biodegradable films implants based on both polyesters poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(hydroxybutyrate-co-valerate) (PHB-V). These polymers are being explored in the health area due to their hydrolytic degradation that occurs by surface erosion, which make them attractive materials for controlled release applications. PHB and PHB-V films were designed using the solvent casting technique. Two different amounts of PEG, 5% and 65% (w/w), were introduced in films formulations to investigate its leaching and plasticizing effect. Morphologic analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) showed the presence of porosity for films with 67% (w/w) PEG. In this work, some investigations on the *in vitro* release of rhGH entrapped in the films, are reported. The kinetics of rhGH release from matrices were examined and the results indicate that the release practically occurs in the first 2 hours.

Introdução

Atualmente, o Hormônio de Crescimento Humano recombinante rhGH é administrado diariamente em crianças com deficiência de hormônio de crescimento (GHD), insuficiência renal crônica ou síndrome de Turner, e pacientes severamente debilitados (AIDS, estados pós-cirúrgicos, remoção da pituitária, etc.). Evidentemente que uma redução na frequência da administração beneficiaria os pacientes em termos de qualidade de vida, conveniência, bem como aumentaria potencialmente a eficiência do tratamento juntamente com a diminuição das doses totais de rhGH.¹

Nos últimos anos, encontram-se trabalhos científicos dedicados a sugerir uma nova forma de administração do rhGH, por meio de sistemas poliméricos biodegradáveis de liberação. A matriz polimérica biodegradável mais citada na literatura, para esta aplicação, é constituída pelo poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), pertencente a família dos poliésteres.²

Recentemente, o poli(3-hidroxibutirato) - PHB, e seu copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - PHB-V, emergiram como fortes candidatos alternativos, os quais oferecem um potencial como sistemas de aprisionamento de um fármaco e sua liberação por erosão superficial.^{2,3} Além disto, este polímero tem um custo muito inferior comparado ao PLGA para ser utilizado como matéria prima, uma vez que o Brasil se tornou produtor desde 1995. O PHB e o PHB-V, são polímeros pertencentes à classe dos poli(hidroxialcanoatos) ou PHAs. Estes por sua vez,

representam uma família de poliésteres naturais produzidos por fontes renováveis, a partir da fermentação de bactérias, tais como *Alcaligenis eutrophus*.⁴

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes potencialmente biodegradáveis à base de PHB e PHB-V, por evaporação do solvente utilizando-se o PEG como um plastificante hidrossolúvel com a função também de conferir porosidade aos mesmos. O rhGH foi imobilizado nos filmes com o intuito de viabilizar seu uso baseado em um sistema de liberação. Este hormônio foi escolhido para ser utilizado nos sistemas de liberação controlada, devido à sua grande importância clínica e comercial.

O Laboratório de Hormônios do Centro de Biologia Molecular do IPEN/CNEN-SP, que possui experiência em síntese, purificação e caracterização de rhGH^{5,6}, realizou a avaliação das matrizes contendo o rhGH.

Experimental

Preparação dos implantes biodegradáveis

Foram feitas duas formulações dos dispositivos bioabsorvíveis implantáveis, uma utilizando-se o PHB e a outra com PHB-V. Estes implantes foram obtidos por *solvent casting* utilizando-se 5% e 65% (em massa) de PEG como plastificante hidrossolúvel. A imobilização do rhGH produzido no IPEN/CNEN-SP, foi pela preparação dos filmes poliméricos sobre leito homogêneo do rhGH.

Estudo da estabilidade do rhGH nos solventes orgânicos

A estabilidade do rhGH foi estudada frente ao solvente clorofórmio, pois este foi utilizado na preparação dos implantes. Foram preparadas suspensões do solvente e do rhGH em concentração conhecida. A análise quantitativa e

qualitativa do hormônio foi realizada por HPLC de exclusão molecular (HPSEC) e fase reversa (RP-HPLC). Utilizou-se como padrão a Preparação de Referência Internacional de rhGH da Organização Mundial de Saúde (WHO).

Estudo da liberação *in vitro*

A cinética de liberação foi determinada em triplicata colocando-se amostras, já pesadas e com a quantidade estimada do rhGH imobilizado, em frascos individuais contendo solução tampão fosfato, pH 7,4 e mantidos na temperatura de 37°C. Foram retiradas alíquotas desta solução em períodos de 10, 30 e 60 min após 2 h de experimento. Volumes iguais de tampão foram recolocados e levados em consideração nos cálculos da liberação cumulativa do hormônio. A concentração deste foi determinada por HPLC e radioimunoensaio.

Ensaios com microscopia eletrônica (MEV)

Amostras, após serem imersas em tampão por períodos superiores a 4 dias, foram liofilizadas e mantidas em dessecador por 72h e analisadas por MEV.⁶

Resultados e Discussão

O resultado da ação do clorofórmio no rhGH mostrou que qualitativamente o rhGH permaneceu inalterado durante o experimento; porém houve uma redução de 40% em sua concentração, após 48 h em clorofórmio.

Apesar de não ter sido constatada diferença nas T_g dos filmes de PHB e PHB-V, na presença de 5% em massa de PEG, o aspecto é bastante diferenciado com aumento da maleabilidade do mesmo.

Resultados com o MEV (fig.1) mostraram porosidade em filmes feitos com 65% de PEG em massa, característica que deverá facilitar a liberação de um fármaco hidrossolúvel de uma matriz hidrofóbica.

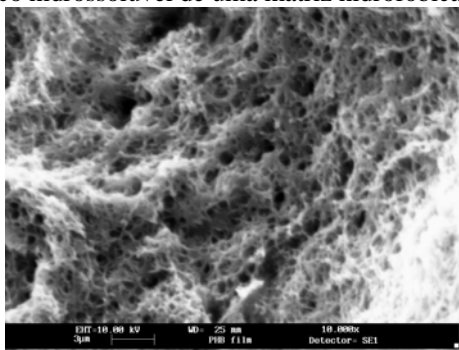


Figura 1. Micrografias obtidas por MEV dos filmes de PHB/PEG (35/65 % em massa), após os testes de liberação imersos em solução tampão fosfato pH 7,4 durante 16 dias. Aumento de 10.000 x.

Por outro lado, o PEG contido nos filmes obtidos com 67% em massa interferiu na qualidade do rhGH, inviabilizando sua utilização nestas concentrações. Entretanto, sua utilização não está descartada para uso em implantes para liberação de outros fármacos resistentes ao mesmo.

Os filmes com 5% de PEG apresentaram resultados satisfatórios quanto a homogeneidade e resistência ao manuseio, permitindo o recorte do filme nas dimensões desejadas para os experimentos de liberação *in vitro*.

As figuras 2 e 3 mostram a cinética de liberação cumulativa dos implantes à base de PHB e PHB-V,

respectivamente, sugerindo que a liberação do rhGH se dá nas primeiras horas de contato com a solução tampão.

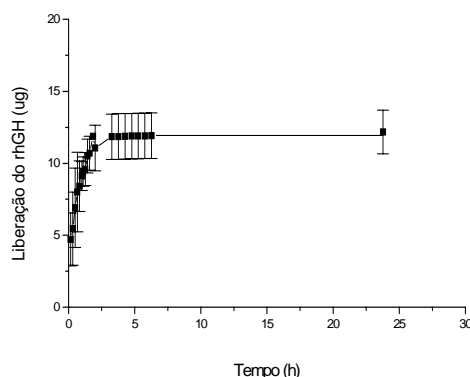


Figura 2. Curva cumulativa da liberação do rhGH em tampão fosfato, pH 7,4 à 37°C da matriz a base de PHB/PEG com 5% em massa.

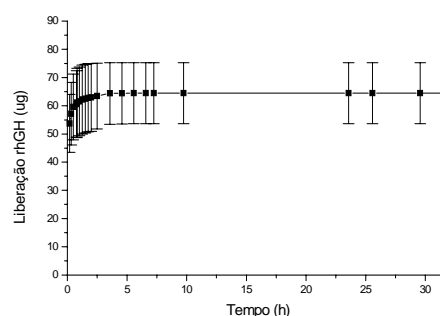


Figura 3. Curva cumulativa da liberação do rhGH em tampão fosfato, pH 7,4 à 37°C da matriz a base de PHB-V/PEG com 5% em massa.

Conclusões

O PEG proporcionou porosidade às matrizes de PHB e PHB-V após se solubilizar em meio aquoso, favorecendo a penetração de água e a liberação de compostos solúveis.

Filmes de PHB e PHB-V/PEG, com 5% em massa, apresentaram potencial como dispositivos bioreabsorvíveis implantáveis para a liberação de rhGH.

Agradecimentos

Trabalho financiado pelo CNPq.

Referências Bibliográficas

1. J.L., Cleland; L. Johnson; S. Putney; A.J.S. Jones *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997, 28, 71.
2. C.W. Pouton; S. Akhtar *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996, 18, 133.
3. J. Pachance; J. Kohn J. In: *Biodegradable Polymers*, R.P. Lanza; R. Langer; J. Vacanti Eds.; Academic Press London, 2001, 263-277.
4. L.H.I. Mei WEDPLA'98. Campinas, Brasil, 1998.
5. M.T.C.P. Ribela; P.W. Gout; P. Bartolini *J. Chromatogr. B.* 2003, 790(1-2), 285.
6. J.E de Oliveira; C.R.J. Soares; C.N. Peroni; E. Gimbo; I.M.C. Camargo; L. Morganti; M.H. Bellini; R. Affonso; R.R. Arkaten; P. Bartolini; M.T.C.P. Ribela *J. Chromatogr.A*; 1999, 852, 441.
7. F. Martellini; L.H.I. Mei; S. Lora; M. Carenza *Radiat. Phys. Chem.* 2004, 71, 255.