

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Micropartículas Contendo Pantoprazol Sódico: Preparação,  
Caracterização Físico-Química e Avaliação Anti-Ulcerativa *in vivo* e da  
Absorção Intestinal *ex vivo*

LETÍCIA MARQUES COLOMÉ

Porto Alegre, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Micropartículas Contendo Pantoprazol Sódico: Preparação,  
Caracterização Físico-Química e Avaliação Anti-Ulcerativa *in vivo* e da  
Absorção Intestinal *ex vivo*

Dissertação apresentada por **Leticia Marques Colomé**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17 de março de 2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Machado de Campos  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Helder Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Teresa C. T. Dalla Costa  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C718m Colomé, Letícia Marques

Micropartículas contendo pantoprazol sódico: preparação, caracterização físico-química e avaliação anti-ulcerativa in vivo e da absorção intestinal ex vivo / Letícia Marques Colomé - Porto Alegre: UFRGS, 2006. - xviii p., 118 p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Micropartículas. 2. Pantoprazol. 3. Atividade anti-ulcerativa. 4. Absorção ex vivo. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecárias responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Guterres, primeiramente pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada. Também por sua orientação dedicada, pelos conhecimentos compartilhados e pelo exemplo pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Pohlmann pelos valiosos auxílios e pela atenção dispensada ao longo deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 405: Gislane, Lali, Sandra, Maria, Fernanda, Scheila, Ruy, Marilúcia, Valéria, Helen, Graziela, Ana Elisa, Marta, Letícia Cruz, Letícia Sias, Bibiana, Vitória, Clarissa Bettoni, Clarissa Xavier, Érico, Rodrigo Freddo, Tassiana, Alessandra, Letícia Ghiggi, Deise, Cristiane, Vanessa, Luana, Evelise, Eliézer e Alessandro. Agradeço pelas colaborações, pela amizade e pelo carinho de todos.

À Renata pelo companheirismo e pela parceria científica.

À Daniela e ao Leandro pela amizade e pelo auxílio no trabalho com os animais de laboratório.

Em especial aos alunos de iniciação científica Cristiane Hoffmeister, Denise Jornada e Rodrigo Fortunato pelas participações em diversas fases deste trabalho.

Aos meus pais, Teodoro e Clara, pela formação que me propiciaram, pelo incentivo constante e por todas as oportunidades que me concederam.

Ao meu irmão Lucas pela amizade e carinho. À Isabel por sua especial participação nesta parte importante da minha trajetória.

Ao Eduardo por seu amor, pela compreensão nos momentos de dificuldade, pela motivação constante e pelo apoio incondicional.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos. À Rede Nanobiotec CNPq/MCT pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>07</b>
2.1 Objetivo geral .....	09
2.2 Objetivos específicos .....	09
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
3.1 Pantoprazol: características químicas, farmacologia e indicações terapêuticas .....	13
3.2 Sistemas microparticulados para a administração de fármacos: preparação e caracterização .....	19
3.3 Administração oral de carreadores poliméricos de fármacos .....	27
3.4 Avaliação da atividade anti-ulcerativa <i>in vivo</i> .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1 Materiais .....	35
4.1.1 Matérias-primas .....	35
4.1.2 Aparelhos e equipamentos .....	35
4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais .....	36
4.1.4 Animais de laboratório .....	37
4.2 Métodos .....	37
4.2.1 Preparação das micropartículas .....	37
4.2.2 Caracterização das micropartículas .....	38
4.2.2.1 Rendimento .....	38
4.2.2.2 Taxa de recuperação do pantoprazol a partir das micropartículas .....	38
4.2.2.3 Quantificação do pantoprazol .....	39
4.2.2.3.1 Validação de metodologia analítica para a quantificação do pantoprazol .....	39
4.2.2.4 Avaliação morfológica .....	41

4.2.2.4.1 Microscopia óptica .....	41
4.2.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura .....	41
4.2.2.5 Análise granulométrica .....	41
4.2.2.6 Análise por calorimetria diferencial exploratória .....	42
4.2.2.7 Espectroscopia na região do infravermelho .....	42
4.2.2.8 Determinação da área superficial .....	43
4.2.2.9 Determinação da distribuição de tamanho de poros .....	43
4.2.2.10 Determinação do teor de água .....	43
4.2.2.11 Perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	44
4.2.2.11.1 Célula de Fluxo .....	44
4.2.2.11.2 Dissolutor .....	45
4.2.2.11.3 Avaliação dos perfis de liberação .....	46
4.2.2.11.4 Validação da metodologia para quantificação do pantoprazol nas alíquotas provenientes da liberação .....	48
4.2.2.12 Avaliação da ação antiulcerativa das micropartículas .....	49
4.2.2.13 Avaliação da permeação de pantoprazol carregado por micropartículas no epitélio intestinal de ratos .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1 Preparação das micropartículas .....	55
5.2 Caracterização das micropartículas .....	55
5.2.1 Rendimento .....	55
5.2.2 Taxa de recuperação do pantoprazol a partir das micropartículas .....	55
5.2.3 Avaliação morfológica .....	56
5.2.3.1 Microscopia óptica .....	56
5.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura .....	58
5.2.4 Análise granulométrica das micropartículas .....	61
5.2.5 Análise por calorimetria diferencial exploratória .....	62
5.2.6 Espectroscopia na região do infravermelho .....	65
5.2.7 Determinação da área superficial e distribuição de tamanho de poros .....	72
5.2.8 Determinação do teor de água .....	72
5.2.9 Perfis de liberação <i>in vitro</i> .....	73
5.2.9.1 Célula de fluxo .....	73
5.2.9.1.1 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 .....	73

5.2.9.1.2 Modelagem matemática dos perfis de liberação em tampão fosfato pH 7,4 .....	76
5.2.9.1.3 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido .....	81
5.2.9.2 Dissolutor .....	83
5.2.9.2.1 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 .....	83
5.2.9.2.2 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido .....	85
5.2.10 Avaliação da ação anti-ulcerativa das micropartículas .....	87
4.2.2.13 Avaliação da permeação de pantoprazol carregado por micropartículas no epitélio intestinal de ratos .....	90
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>109</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fórmula estrutural do pantoprazol sódico .....	13
<b>Figura 2</b>	Reações de ativação do pantoprazol em meio ácido e ligação à bomba de prótons .....	17
<b>Figura 3</b>	Fotografias sob luz normal do pantoprazol e das micropartículas dispersos em óleo .....	57
<b>Figura 4</b>	Fotografias sob luz polarizada do pantoprazol ao ar e do pantoprazol nebulizado em óleo mineral .....	58
<b>Figura 5</b>	Fotomicrografias das micropartículas M1 em aumentos de 1000, 5000, 15000 e 25000 vezes .....	60
<b>Figura 6</b>	Fotomicrografias das micropartículas M2 em aumentos de 1000, 5000, 15000 e 25000 vezes .....	60
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografias das micropartículas M3 em aumentos de 1000, 5000, 15000 e 20000 vezes .....	61
<b>Figura 8</b>	Termogramas obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol e Eudragit <sup>®</sup> S100, para a mistura física binária e para a formulação de micropartículas M1 .....	64
<b>Figura 9</b>	Termogramas obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol, Eudragit <sup>®</sup> S100 e Eudragit <sup>®</sup> RS30D, para as misturas físicas pantoprazol:Eudragit <sup>®</sup> S100 e pantoprazol:Eudragit <sup>®</sup> RS30D e para a formulação de micropartículas M2 .....	66
<b>Figura 10</b>	Termogramas obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol e Eudragit <sup>®</sup> RS30D, para a mistura física binária e para a formulação de micropartículas M3. ....	68
<b>Figura 11</b>	Espectros de absorção na região do infravermelho do pantoprazol, dos polímeros Eudragit <sup>®</sup> S100 e Eudragit <sup>®</sup> RS30D, das misturas físicas binárias e das formulações de micropartículas .....	70
<b>Figura 12</b>	Perfis obtidos pela dissolução do pantoprazol e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo .....	74
<b>Figura 13</b>	Modelagem da equação monoexponencial para a dissolução de pantoprazol puro e associado às micropartículas. ....	77
<b>Figura 14</b>	Ajuste dos dados experimentais da liberação de pantoprazol associado às micropartículas ao modelo de Lei das Potências .....	80

<b>Figura 15</b>	Perfis obtidos pela dissolução do fármaco e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido utilizando célula de fluxo.....	81
<b>Figura 16</b>	Perfis obtidos pela dissolução do pantoprazol e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 utilizando dissolutor. ....	84
<b>Figura 17</b>	Perfis obtidos pela dissolução do fármaco e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido utilizando dissolutor. ....	85
<b>Figura 18</b>	Índices lesionais obtidos para os grupos tratados com bicarbonato, PAN ou micropartículas .....	88
<b>Figura 19</b>	Imagens da mucosa estomacal de ratos tratados com bicarbonato de sódio, pantoprazol ou micropartículas .....	90
<b>Figura 20</b>	Perfis de absorção obtidos para pantoprazol puro e carregado pelas micropartículas. ....	91
<b>Figura 21</b>	Modelagem da equação monoexponencial para a absorção de pantoprazol puro e associado às micropartículas .....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Composição quali/quantitativa das micropartículas de pantoprazol preparadas pelo método de aspersão .....	38
<b>Tabela 2</b> Condições operacionais utilizadas para a nebulização .....	388
<b>Tabela 3</b> Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do pantoprazol por CLAE .....	39
<b>Tabela 4</b> Mecanismos de liberação de substâncias a partir de sistemas micrométricos .....	48
<b>Tabela 5</b> Teores e taxas de recuperação de pantoprazol sódico nas micropartículas .....	56
<b>Tabela 6</b> Distribuição granulométrica por difração de laser das micropartículas. ....	61
<b>Tabela 7</b> Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol e Eudragit® S100, para a mistura física pantoprazol: Eudragit® S100 e para a formulação de micropartículas M1.....	64
<b>Tabela 8</b> Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol, Eudragit® S100 e Eudragit® RS30D, para as misturas físicas pantoprazol: Eudragit® S100 e pantoprazol: Eudragit® RS30D e para a formulação de micropartículas M2. ....	66
<b>Tabela 9</b> Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas pantoprazol e Eudragit® RS30D, para a mistura física pantoprazol: Eudragit® RS30D e para a formulação de micropartículas M3. ....	68
<b>Tabela 10</b> Teores de água das micropartículas. ....	72
<b>Tabela 11</b> Fatores de diferença e fatores de similaridade para a dissolução do pantoprazol puro e a partir das formulações de micropartículas M1, M2 e M3 em meio tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo.....	75
<b>Tabela 12</b> ANOVA da eficiência de dissolução do pantoprazol puro e a partir das formulações de micropartículas em meio tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo.....	75
<b>Tabela 13</b> Parâmetros da modelagem matemática da dissolução em tampão fosfato pH 7,4 de pantoprazol puro e associado a micropartículas utilizando a equação monoexponencial.....	77
<b>Tabela 14</b> ANOVA da velocidade de dissolução de pantoprazol puro e das formulações de micropartículas .....	78

<b>Tabela 15</b> Parâmetros da modelagem matemática da dissolução em tampão fosfato pH 7,4 das micropartículas utilizando o modelo de Lei das Potências ....	79
<b>Tabela 16</b> ANOVA da proteção do fármaco em meio ácido para pantoprazol puro e para as formulações de micropartículas utilizando célula de fluxo. ....	83
<b>Tabela 17</b> ANOVA da proteção do fármaco em meio ácido para pantoprazol puro e para as formulações de micropartículas utilizando dissolutor. ....	86
<b>Tabela 18</b> Porcentagem de pantoprazol que permaneceu estável após passagem pelo estágio ácido em célula de fluxo e dissolutor.....	87
<b>Tabela 19</b> Valores de área total, área ulcerada e índices lesionais obtidos para os diferentes grupos.....	88
<b>Tabela 20</b> Comparação não-paramétrica pelo método Student-Newman-Keuls dos índices lesionais obtidos para bicarbonato de sódio, pantoprazol e formulações de micropartículas .....	89
<b>Tabela 21</b> Parâmetros da modelagem matemática da absorção intestinal <i>ex vivo</i> de pantoprazol puro e associado às micropartículas utilizando a equação monoexponencial. ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PAN</b>	Pantoprazol sódico sesquidratado
<b>EUD S100</b>	Eudragit S100 <sup>®</sup> [poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)]
<b>EUD RS30D</b>	Eudragit RS 30D <sup>®</sup> [cloreto de poli(metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)]
<b>M1</b>	Formulação de micropartículas contendo pantoprazol formada por Eudragit S100 <sup>®</sup>
<b>M2</b>	Formulação de micropartículas contendo pantoprazol formada por Eudragit S100 <sup>®</sup> e Eudragit RS 30D <sup>®</sup>
<b>M3</b>	Formulação de micropartículas contendo pantoprazol formada por Eudragit RS 30D <sup>®</sup>
<b>MF1</b>	Mistura física binária composta por pantoprazol e Eudragit S100 <sup>®</sup>
<b>MF2</b>	Mistura física binária composta por pantoprazol e Eudragit RS 30D <sup>®</sup>



## RESUMO

O pantoprazol (PAN) é um inibidor da bomba de prótons clinicamente empregado para o tratamento de úlcera gástrica e refluxo gastro-esofágico. Estudos relacionados à estabilidade físico-química mostraram que a degradação do PAN está diretamente relacionada com a acidez do meio, determinando a necessidade de administrá-lo em uma forma gastrorresistente. Desse modo, este trabalho propôs-se a desenvolver micropartículas à base de polímero gastrorresistente (Eudragit S100<sup>®</sup>), polímero de baixa permeabilidade (Eudragit RS30D<sup>®</sup>) ou de blenda polimérica (Eudragit S100<sup>®</sup>/ Eudragit RS30D<sup>®</sup>), contendo PAN pela técnica de *spray-drying*. O estudo de dissolução *in vitro* utilizando célula de fluxo demonstrou que o PAN foi liberado das micropartículas em 120 minutos, seguindo cinética de primeira ordem, de acordo com o modelo monoexponencial. A avaliação da gastrorresistência *in vitro* em célula de fluxo e em dissolutor evidenciou que as formulações de micropartículas à base de Eudragit S100<sup>®</sup> e da blenda (Eudragit S100<sup>®</sup>/ Eudragit RS30D<sup>®</sup>), garantiram adequada proteção ao fármaco em ambiente ácido. Estudos *in vivo* confirmaram esses resultados, pois possibilitaram a constatação da proteção do fármaco pelas micropartículas durante a passagem pelo estômago, o que possibilitou absorção entérica do PAN em quantidade adequada para exercer atividade farmacológica. Por fim, a investigação *ex vivo* da permeação do PAN carregado por micropartículas no epitélio intestinal mostrou que estes sistemas foram capazes de garantir a absorção da totalidade do fármaco carregado, constatando-se ainda que este processo ocorreu segundo o modelo monoexponencial.

Palavras-chave: micropartículas, pantoprazol, Eudragit S100<sup>®</sup>, Eudragit RS30D<sup>®</sup>, *spray-drying*, atividade anti-ulcerativa, absorção *ex vivo*



## ABSTRACT

### **Microparticles containing sodium pantoprazole: preparation, characterization, *in vivo* antiulcer activity study and *ex vivo* intestinal absorption**

Pantoprazole (PAN) is a prodrug used in the treatment of digestive ulcers and gastro-esophageal reflux disease. This prodrug is activated inside gastric parietal cells binding irreversibly to the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Studies concerning the physico-chemical stability of this drug have shown its instability in acid media. In this way, PAN should be administered as an enteric dosage form. The aim of the present work was to develop microparticles of a gastro-resistant polymer (Eudragit S100<sup>®</sup>), a low permeability polymer (Eudragit RS30D<sup>®</sup>) or a blend (Eudragit S100<sup>®</sup>/ Eudragit RS30D<sup>®</sup>) containing PAN, by spray-drying technique. *In vitro* dissolution study in a flow-through cell apparatus showed that the PAN was released from microparticles in 120 min, according to the monoexponential model. Gastro-resistance evaluation in a flow-through cell demonstrated that the formulations prepared with Eudragit S100<sup>®</sup> and the blend (Eudragit S100<sup>®</sup>/ Eudragit RS30D<sup>®</sup>) assured the protection of the drug against acid degradation. *In vivo* antiulcer activity study showed that both microparticle formulations presented pharmacological activity. This result indicated that the PAN passed intact through the stomach and that it was enterically absorbed. Finally, the *ex vivo* permeation experiment demonstrated that the PAN from the microparticle formulations was absorbed through the intestinal epithelium, according to the monoexponential model.

Key-words: microparticles, pantoprazole, Eudragit S100<sup>®</sup>, Eudragit RS30D<sup>®</sup>, spray-drying, antiulcer activity, *ex vivo* absorption



## INTRODUÇÃO

---



No âmbito de uma classificação farmacológica, o pantoprazol (PAN) situa-se entre os inibidores da bomba de prótons, atualmente considerados os fármacos mais importantes para o tratamento de uma variedade de desordens relacionadas ao trato gastrointestinal superior (JUNGNICKEL, 2000). Assim, o PAN tem sido clinicamente empregado em casos de úlcera gástrica e refluxo gastro-esofágico, devido à sua capacidade de inibir irreversivelmente a bomba de prótons, diminuindo a secreção gástrica proveniente das células parietais do estômago (POOLE, 2001).

O efeito anti-secretório é bem explicado pelo seu mecanismo de ação: após absorção intestinal, o PAN na corrente circulatória apresenta seletividade tecidual pelas células parietais gástricas e, no ambiente ácido do lúmen canalicular destas células, ocorre a ativação do pró-fármaco. A ativação leva à formação de uma sulfonamida catiônica cíclica, a qual liga-se a uma ou mais subunidades catalíticas da bomba de prótons, alterando sua configuração, o que provoca uma inibição irreversível do transporte ácido (CHEER *et al.*, 2003).

Estudos relacionados à estabilidade físico-química mostraram que a degradação do PAN está diretamente relacionada com a acidez do meio, determinando a necessidade de administrá-lo em uma forma gastrorresistente, capaz de permitir absorção exclusivamente entérica (EKPE e JACOBSEN, 1999).

Nesta perspectiva, novas estratégias de veiculação do PAN são requeridas, a exemplo de formulações preparadas com polímeros gastrorresistentes, capazes de conferir proteção ao fármaco no meio ácido-estomacal.

Considerando esta assertiva, RAFFIN e colaboradores (2006) prepararam micropartículas gastrorresistentes através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente para a veiculação oral de PAN. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o sistema foi capaz de proteger o fármaco da degradação ácida, disponibilizando-o para absorção entérica e permitindo efetiva atividade farmacológica.

Micropartículas, como as recentemente referidas, são sistemas de liberação de fármacos, geralmente poliméricos, que encerram numerosas vantagens quando comparadas a formas convencionais, como aumento da eficácia terapêutica da

substância carregada, redução da toxicidade e conveniência, o que facilita a adesão do paciente ao tratamento (RAVI KUMAR, 2000).

Estes sistemas podem ser preparados por uma variedade de métodos como coacervação complexa, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação do solvente, aspersão, entre outros (THIES, 1996). Dentre estes métodos, destaca-se a aspersão (ou *spray-drying*) por ser um processo rápido, de baixo custo, que não utiliza solvente orgânico, sendo ainda passível de transposição de escala (ONEDA e RÉ, 2003).

A técnica de *spray-drying* baseia-se na aspersão através de uma câmara de secagem de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa. Devido à circulação de ar aquecido no equipamento, o solvente é rapidamente evaporado, transformando as pequenas gotículas em partículas sólidas (ESPOSITO *et al.*, 2002). Este processo, amplamente usado no âmbito farmacêutico/tecnológico, tem sido empregado na preparação de micropartículas para sistemas de liberação (BILLON *et al.*, 2002; PALMIERI *et al.*, 2001), para formação de pequenas partículas passíveis de absorção pulmonar (LO *et al.*, 2004) e para garantir propriedades de fluxo a certos agentes e/ou excipientes (ONEDA e RÉ, 2003), dentre outras aplicações.

Em se tratando de vias de administração de sistemas poliméricos, a via oral foi a primeira rota utilizada para esses carreadores, em meados dos anos 80, visando o transporte de antiinflamatórios não-esteróides e insulina (LEGRAND *et al.*, 1999). Desde então, estes sistemas têm demonstrado serem estratégias interessantes para a administração de fármacos pela via oral, uma vez que podem aumentar sua absorção, melhorar sua biodisponibilidade, proteger a mucosa gástrica contra agentes irritantes, além de serem úteis no transporte de antígenos para imunização oral (DESAI *et al.*, 1996).

Diante do exposto, entende-se como relevante e inédito o desenvolvimento de uma estratégia tecnológica capaz de proteger o PAN no ambiente ácido do estômago, permitindo sua absorção exclusivamente no intestino, para que, após esta fase, o fármaco possa atuar de forma eficaz em seu local de ação. Para tanto, este trabalho propõe-se a desenvolver micropartículas de PAN utilizando polímero

gastroresistente (Eudragit S100<sup>®</sup>), polímero de baixa permeabilidade (Eudragit RS30D<sup>®</sup>) ou blenda polimérica (Eudragit S100<sup>®</sup>/ Eudragit RS30D<sup>®</sup>), preparadas através da técnica de *spray-drying*. A proposta compreende também a avaliação *in vivo* da ação antiulcerativa das micropartículas de PAN, bem como o estudo da permeação *ex vivo* do fármaco no epitélio intestinal, investigando a influência da utilização de micropartículas neste processo.



**2 OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo geral

Preparar micropartículas poliméricas, visando a obtenção de sistemas multiparticulados gastrorresistentes capazes de proteger o PAN em meio ácido.

## 2.2 Objetivos específicos

- Preparar micropartículas contendo PAN sódico pela técnica de aspersão utilizando Eudragit S100<sup>®</sup> e/ou Eudragit RS30D<sup>®</sup> como polímeros, visando a obtenção de partículas gastrorresistentes e/ou de baixa permeabilidade a meios aquosos;
- Caracterizar as micropartículas preparadas quanto às taxas de recuperação do fármaco, morfologia, compatibilidade entre os componentes da formulação, e teor de água, visando avaliar sua adequabilidade para serem utilizadas como sistemas carreadores;
- Realizar ensaios de dissolução *in vitro*, com objetivo de avaliar os perfis de liberação do PAN a partir das micropartículas, bem como a capacidade das mesmas em proteger o fármaco no ambiente ácido-estomacal;
- Desenvolver estudos de ulceração gástrica *in vivo*, a fim de avaliar a ação anti-ulcerosa das micropartículas;
- Desenvolver estudos de permeação do fármaco no epitélio intestinal, a fim de investigar a capacidade de promoção do transporte com a utilização das micropartículas de PAN.







### 3.1 Pantoprazol: características químicas, farmacologia e indicações terapêuticas

Os inibidores da bomba de prótons atualmente são considerados como a mais importante classe de fármacos para o tratamento de uma variedade de desordens relacionadas ao trato gastrointestinal superior, como úlcera gástrica e refluxo gastro-esofágico (JUNGNICKEL, 2000). Dentre estes fármacos, destaca-se o pantoprazol (PAN), um derivado benzimidazólico que inibe irreversivelmente a bomba de prótons ( $H^+/K^+$  ATPase), diminuindo assim a secreção gástrica proveniente das células parietais do estômago (CHEER *et al.*, 2003).

Segundo a nomenclatura química este fármaco é o 5-(difluorometoxi)-2-[[3,4-dimetoxi-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol. É uma base fraca, apresentando valor de pKa 3,92, comumente sendo encontrado na forma de sal sódico (Figura 1) (MERCK INDEX, 2001).

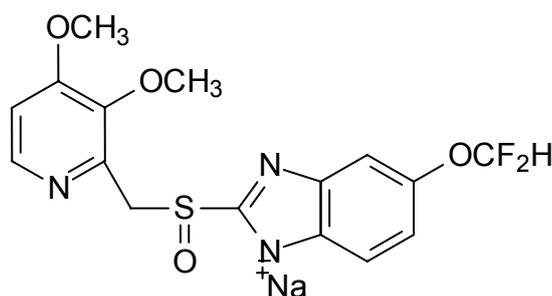


Figura 1. Fórmula estrutural do PAN sódico.

Estudos com formas polimórficas e pseudopolimórficas do PAN sódico tem demonstrado que a forma sesquidratada é fisicamente mais estável em comparação a outros hidratos, sendo desse modo, a forma mais apropriada para a produção farmacêutica. A forma anidra do PAN sódico é instável, convertendo-se em hidratos sob determinadas condições de umidade ou presença de pequenas quantidades de água nos solventes, uma vez que moléculas de água são fundamentais para a estabilização das camadas cristalinas dessa substância (ZUPANCIC *et al.*, 2005).

Assim, o PAN sob a forma sódica sesquidratada, vem sendo comercializado como comprimidos de revestimento entérico, para evitar sua degradação durante a

passagem pelo estômago. Comprimidos revestidos contendo pantoprazol (Protonix<sup>®</sup>) são comercializados na Europa desde 1994, contudo sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) só ocorreu em 2000. Atualmente, apresenta-se também como pó liofilizado para injeção, permitindo a utilização por pacientes que não podem fazer uso da via de administração oral (AVNER, 2000).

A indicação terapêutica aprovada pelo FDA para o PAN é o tratamento de curto período (máximo de seis semanas) de esofagite erosiva associada com refluxo gastro-esofágico. Contudo, outros possíveis usos incluem tratamento de úlceras gástrica ou duodenal, condições hipersecretórias patológicas e tratamento adjunto a antibióticos para erradicação de *Helicobacter pylori* (POOLE, 2001).

O refluxo gastro-esofágico é uma condição de exposição anormal do esôfago ao conteúdo gástrico, levando à ocorrência de sintomas como pirose e regurgitação. O quadro clínico caracteriza-se também pela presença de lesões na mucosa esofágica, que vão desde inflamações e eritema até variados graus de erosão (RICHTER *et al.*, 2000). A manutenção da terapia por longo período de tempo é requerida, já que o alívio dos sintomas e o nível de cura das esofagites estão diretamente relacionados com a capacidade anti-secretória do fármaco utilizado no tratamento desta desordem (STANGHELLINI, 2003).

Nesse sentido, BOCHENEK e colaboradores (2000) realizaram um estudo com pacientes acometidos por refluxo gastro-esofágico, para os quais o PAN foi administrado nas doses de 20 e 40 mg por dia, mostrando-se mais efetivo que a ranitidina na cura das esofagites e alívio dos sintomas relacionados com a doença.

Em um estudo semelhante, RICHTER e colaboradores (2000), observaram que na dose de 40 mg, administrada uma vez ao dia, o PAN foi eficaz na cura de esofagites severas após quatro ou oito semanas de tratamento, sendo esta dose mais efetiva que as doses de 10 e 20 mg também utilizadas no estudo. Interessante ressaltar que o fármaco proporcionou alívio dos sintomas como regurgitação já no primeiro dia de tratamento.

Para o tratamento de úlcera duodenal, MENEGHELLI e colaboradores (2000) propuseram-se a avaliar a efetividade do PAN utilizado na dose de 40 mg/dia. Os resultados mostraram maior efetividade do PAN quando comparado à ranitidina na

cura das úlceras (97,1 % contra 74,51 %, respectivamente) em no máximo quatro semanas, além do alívio de sintomas correlacionados.

Participante da patogênese da úlcera péptica, o *Helicobacter pylori* é um microrganismo presente em 90 % dos casos de úlcera duodenal e 70 % dos casos de úlcera gástrica, de onde se pode inferir que sua erradicação contribui para rápida cura das lesões, além de evitar recidivas.

Além de propiciar a cura dessas lesões devido à atividade anti-secretória, o PAN também contribui terapêuticamente com sua atividade antibacteriana seletiva contra *Helicobacter pylori*. Isto se deve, possivelmente, à inibição da urease bacteriana e à interação com a ATPase da bactéria, mecanismo que regula o influxo de íons transmembrana (JUNGNICKEL, 2000). Desse modo, a terapia medicamentosa para o tratamento de úlceras gastro-duodenais utiliza o PAN em terapia tríplice com dois antimicrobianos (claritromicina e amoxicilina ou metronidazol), possibilitando a inibição da secreção ácida para alívio dos sintomas e favorecimento da atividade dos antibacterianos utilizados na erradicação deste microrganismo (CHEER *et al.*, 2003; JUNGNICKEL, 2000).

A síndrome de Zollinger- Ellison, por sua vez, é uma condição resultante de excessiva secreção ácida devido a produção tumoral de gastrina. Assim, o controle da secreção ácida é o fator mais importante no tratamento desta disfunção, especialmente nos casos de impossibilidade de ressecção do tumor. A terapia anti-secretória utilizando antagonistas-H2 vem sendo substituída pelos inibidores da bomba de prótons, devido à baixa eficácia dos primeiros e o não desenvolvimento de tolerância e menores doses requeridas para o tratamento no caso destes últimos (METZ *et al.*, 2001).

Nesse contexto, METZ e colaboradores (2003) investigaram a eficácia, medida pelo controle da secreção ácida em mEq/h, e a segurança da utilização do PAN via oral por longos períodos em pacientes com hipersecreção gástrica. Os autores observaram que o PAN na dose de 80-240 mg/dia foi efetivo e bem tolerado por pacientes com Zollinger-Ellison ou hipersecreção idiopática durante um período superior a 27 meses.

Muitos estudos têm se preocupado também em estudar a farmacocinética deste novo antiulceroso (JUNGNICKEL, 2000; KATZ, 2000; CHEER *et al.*, 2003). Neste contexto, sabe-se que após administração oral de uma dose de 40 mg, o PAN é rapidamente absorvido, sofrendo um pequeno metabolismo de primeira passagem e tendo assim uma biodisponibilidade absoluta de 77 %. A concentração plasmática máxima é atingida em 2 a 3 horas, alcançando níveis de aproximadamente 2,5 mg/L (AVNER, 2000).

A ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 98 % e os volumes de distribuição relatados na faixa de 0,15-0,17 L/kg sugerem que a maior fração do pró-fármaco está localizada no líquido extracelular (JUNGNICKEL, 2000).

PAN é completamente metabolizado no fígado pelo citocromo P450, através de demetilação e subsequente sulfatação, formando metabólitos inativos. Apresenta meia-vida de eliminação de aproximadamente 1,1 hora, *clearance* de 0,7-1,3 L/kg/h, sendo a principal rota de eliminação, a excreção renal dos metabólitos.

Este fármaco não sofre acumulação e seu perfil farmacocinético é mantido independentemente do número de doses, não sendo necessário o ajuste de dosagem para pacientes com falência renal ou moderada falência hepática (POOLE, 2001).

De uma forma geral, os inibidores da bomba de prótons apresentam potencial para interagir com outros fármacos, seja devido ao aumento do pH intragástrico, o que altera a absorção, seja por alteração no metabolismo causado por indução/inibição de isoenzimas do CYP450. Contudo, o PAN não apresentou interações com diversas substâncias investigadas, entre estas antiácidos, contraceptivos orais, digoxina, ciclosporina, diazepam, diclofenaco, metoprolol, warfarina, teofilina e fenitoína, demonstrando ser o fármaco de escolha para pacientes em tratamento com grande número de associações medicamentosas (STANGHELLINI, 2003).

Tão relevante quanto o conhecimento dos parâmetros farmacocinéticos é o entendimento da farmacodinâmica do PAN, uma vez que a duração da atividade não está somente relacionada com o tempo que o fármaco permanece no organismo (POOLE, 2001).

O mecanismo de ação baseia-se na ativação do pró-fármaco em ambiente ácido, o que é facilitado pela seletividade tecidual do PAN pelas células parietais gástricas. Assim, no ambiente altamente ácido do lúmen canalicular destas células ocorre primeiramente ionização devido ao caráter básico dessa substância. Subseqüentemente, há uma rápida ativação, levando à formação de uma sulfonamida catiônica cíclica, a qual liga-se a uma ou mais subunidades catalíticas da bomba de prótons (Figura 2). Disso decorre a alteração na configuração da bomba, o que provoca uma inibição irreversível do transporte ácido. Devido à ligação covalente irreversível, o efeito anti-secretório persiste por um tempo maior do que o previsto pelo perfil farmacocinético (SHIN *et al.*, 1993; CHEER *et al.*, 2003).

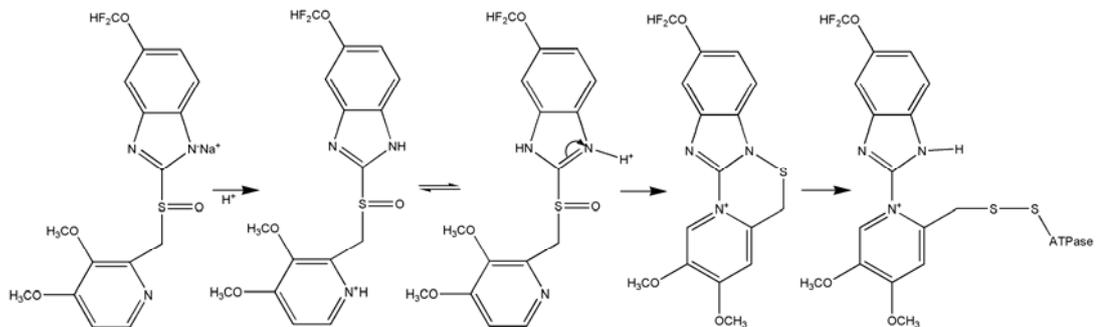


Figura 2. Reações de ativação do PAN em meio ácido e ligação à bomba de prótons.

Além disso, dentre os inibidores da bomba de prótons, o PAN é o único que se liga à cisteína 822, a qual está inacessível a substâncias como glutatona e ditioneitol provenientes da própria célula parietal. Estas substâncias são capazes de reduzir a ligação dissulfeto, revertendo desse modo a inibição. Assim, a mais longa duração de ação observada com o uso deste fármaco deve-se principalmente ao fato de que uma nova síntese da bomba é requerida para realizar o transporte ácido. Ao contrário, o omeprazol e outros do grupo ligam-se à cisteína 813 e o lansoprazol, além desta, liga-se à cisteína 321, ambas localizadas em domínios expostos às substâncias redutoras anteriormente mencionadas, o que explica os menores tempos de ação observados quando comparados ao PAN (SACHS *et al.*, 2003; KATZ, 2000).

PAN parece ser bem tolerado, apresentando efeitos adversos semelhantes aos outros fármacos do grupo, sendo que os mais comuns são cefaléia, náusea, diarreia, flatulência e dor abdominal (MINER, 2003).

O planejamento de formas farmacêuticas contendo PAN contempla, como etapa inicial, o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica capaz de quantificar o fármaco contido nas formulações, bem como eventuais produtos de degradação formados.

A primeira metodologia descrita para a análise do PAN (HUBER e MÜLLER, 1990) visou a determinação do fármaco em soro. A cromatografia líquida de alta eficiência empregava coluna extrativa e coluna analítica RP-18, com fase móvel constituída por metanol e tampão fosfato de amônio 10 mmol (pH 6,5) em sistema de gradiente. O método demonstrou linearidade satisfatória ( $r = 0,9999$ ), na faixa entre 0,05 a 5  $\mu\text{g/mL}$ , recuperação ao redor de 100 %, coeficientes de variação menores que 5 % e limite de quantificação de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ .

DETINGER e colaboradores (2002), por sua vez, desenvolveram uma metodologia analítica visando a determinação da estabilidade do PAN em suspensão oral extemporânea. Os autores utilizaram fase móvel em sistema isocrático, constituída de acetonitrila e fosfato de potássio dibásico 50 mM. Os resultados mostraram a linearidade do método, bem como coeficientes de variação inter e intra-dia adequados ( $r = 0,9998$ , 1,0 % e 0,9 %, respectivamente).

EKPE e JACOBSEN (1999) também preocuparam-se com a estabilidade do PAN. Por isso, estudaram o efeito do pH e da presença de sais sobre a sua estabilidade, evidenciando que sua degradação está diretamente relacionada com a acidez e a concentração de sais no meio de dissolução, o que reafirma a necessidade de administração em uma forma farmacêutica gastrorresistente. Ainda assim, o PAN demonstrou maior estabilidade que omeprazol e lansoprazol em todos os meios testados. Outros estudos demonstram resultados semelhantes, sempre enfatizando a influência de baixos valores de pH na degradação do fármaco (DETINGER *et al.*, 2002; JOHNSON, 2005).

### 3.2 Sistemas microparticulados para a administração de fármacos: preparação e caracterização

Os sistemas de liberação controlada ou retardada, tais como os recomendados para a veiculação de PAN, podem ser formas farmacêuticas unitárias ou multiparticuladas. Estas últimas, quando administradas pela via oral, apresentam numerosas vantagens em relação a sistemas unitários, quais sejam rápida distribuição em uma grande área de superfície, o que minimiza o risco de efeitos deletérios locais, absorção menos variável e menos dependente do tempo de trânsito gastrointestinal, níveis plasmáticos mais constantes após absorção, eficácia na liberação controlada e alta reprodutibilidade dose a dose (LIN e KAO, 1991).

Formas multiparticuladas são bem exemplificadas pelas micropartículas, as quais se constituem em sistemas de liberação de fármacos, geralmente poliméricos, podendo ser microcápsulas ou microesferas. Microcápsulas caracterizam-se pela presença de um núcleo onde se concentra a substância ativa. As microesferas, por sua vez, constituem-se por uma matriz polimérica onde a substância carregada está uniformemente distribuída (RAVI KUMAR, 2000).

Quanto aos métodos de preparação das micropartículas, estes são amplamente variados, podendo-se citar coacervação complexa, separação de fases poliméricas, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação do solvente, aspensão, entre outros (THIES, 1996). Dentre estes métodos, destaca-se a aspensão (ou *spray-drying*) por ser um processo rápido, de baixo custo, que não utiliza solvente orgânico, sendo ainda passível de transposição de escala (ONEDA e RÉ, 2003).

A técnica de *spray-drying* baseia-se na aspensão através de uma câmara de secagem de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa. Devido à circulação de ar aquecido no equipamento, o solvente é rapidamente evaporado, transformando as pequenas gotículas em partículas sólidas. Quanto à direção do fluxo de ar aquecido, o processo pode ser classificado em co-corrente, contra-corrente ou fluxo misto (WALTON, 2000; ESPOSITO *et al.*, 2002).

O processo de *spray-drying* tem sido empregado na preparação de micropartículas para sistemas de liberação (BILLON *et al.*, 2002; PALMIERI *et al.*,

2001), para formação de pequenas partículas passíveis de absorção pulmonar (LO *et al.*, 2004) e para garantir propriedades de fluxo a certos agentes e/ou excipientes (ONEDA e RÉ, 2003), dentre outras aplicações.

As condições operacionais e o *design* do equipamento podem ser escolhidos de acordo com características desejadas para a secagem e quanto às especificações requeridas para o produto. A seleção cuidadosa das variáveis do processo, como metodologia e condições de atomização, temperatura do ar de secagem e concentração da solução/suspensão de alimentação, determina a obtenção de partículas com tamanho, distribuição granulométrica e conteúdo de umidade adequados. Estas variáveis também são determinantes da morfologia das partículas formadas, uma vez que para dadas condições de secagem, as partículas podem inflar, colabar, sofrer fraturas ou apresentar poros (WALTON, 2000).

Alto conteúdo de umidade e baixo rendimento freqüentemente são encontrados com o uso de equipamentos de escala laboratorial. Dentro desta perspectiva, BILLON e colaboradores (2000) avaliaram o efeito de parâmetros do processo no rendimento da preparação e no conteúdo de umidade de produtos nebulizados. Utilizando carboximetilcelulose sódica como polímero, os autores constataram que o rendimento dependeu principalmente de variáveis como fluxo de alimentação e temperatura de entrada para secagem, bem como da interação entre estas duas variáveis. O rendimento foi consideravelmente aumentado pela redução do fluxo de alimentação, independente da temperatura. O aumento da temperatura melhorou o rendimento apenas com altos fluxos de alimentação, já que esta condição requer mais energia térmica para permitir a completa evaporação do solvente.

Quanto à morfologia das partículas formadas por *spray*, WALTON (2000) em seu estudo, classificou-as em três categorias distintas, denominadas aglomeradas, formadoras de filme e cristalinas. Aglomeradas são partículas compostas por outras pequenas partículas individuais submicrométricas; formadoras de filmes são partículas compostas de uma fase contínua não-líquida de natureza polimérica ou sub-microcristalina; e, finalmente, as cristalinas são partículas compostas por cristas individuais grandes, ligados por uma fase microcristalina contínua.

ONEDA e RÉ (2003) também realizaram um estudo morfológico utilizando os polímeros hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica e Eudragit NE 30D<sup>®</sup>, observando a influência do tipo de polímero utilizado. Os diferentes tipos originaram micropartículas diferentes quanto à forma e superfície topográfica, o que pôde ser evidenciado por imagens de fotomicrografias eletrônicas. Os autores também demonstraram a influência da proporção polímero/ substância ativa (neste caso, citrato de cálcio) no tamanho das partículas formadas. Utilizando hidroxipropilmetilcelulose, os autores observaram que um aumento na concentração do polímero levou à formação de partículas maiores.

Tamanho e forma também podem afetar propriedades de empacotamento e fluxo, as quais são avaliadas pelo fator de Hausner, que mede a fricção entre as partículas, e pelo índice de Carr, o qual revela a tendência dos pós em formar pontes interparticulares. Micropartículas formadas por *spray* tendem a apresentar altos valores para estas duas grandezas, indicando grande coesão interparticular e fluxo pobre. A alta coesividade pode determinar aglomeração das partículas, reduzindo a área de superfície, o que pode influenciar na liberação do fármaco quando a partícula está em um meio de dissolução (BILLON *et al.*, 2000).

Apesar das propriedades de fluxo desfavoráveis, as micropartículas preparadas por *spray* podem ser consideradas passíveis de formulação de comprimidos. Isto foi bem demonstrado por PALMIERI e colaboradores (2001) quando preparam micropartículas de paracetamol por *spray-drying* utilizando Eudragit<sup>®</sup> RS ou RL e etilcelulose NF 50. Os autores relataram a capacidade de compressão dos produtos formados, o que não ocorreu para a mistura física dos componentes, destacando-se ainda que as propriedades de compactação aumentaram proporcionalmente com o aumento da concentração de polímero presente na formulação.

Uma grande diversidade de polímeros pode ser utilizada para a formação de micropartículas, de acordo com a finalidade da formulação preparada. Contudo, cabe ressaltar uma classe interessante de polímeros, com variadas aplicações. Os polimetacrilatos são agentes formadores de filmes, apresentando-se como diferentes tipos com variadas características de solubilidade. Dentre os principais destacam-se os Eudragits<sup>®</sup> dos tipos E, L, S, RL, RS e NE30D (KIBBE, 2000).

O tipo E é solúvel em fluido gástrico (pH inferior a 5). Os tipos L e S formam filmes resistentes ao ácido estomacal, atuando como agentes de cobertura entérica, sendo que o L100 é solúvel em pH superior a 6, enquanto o S100 (EUD S100) é solúvel em pH superior a 7, condições em que formam sais com álcalis. Estes dois tipos são produtos da polimerização aniônica do ácido metacrílico e metacrilato de metila, sendo que a proporção do grupo carboxila livre em relação ao éster é aproximadamente 1:1 em Eudragit<sup>®</sup> L e 1:2 em Eudragit<sup>®</sup> S (ESPOSITO *et al.*, 2002; THE UNITED, 2005).

Os Eudragits<sup>®</sup> RL, RS e NE30D formam filmes insolúveis em água, sendo desse modo recomendados para liberação sustentada. Os tipos RL e RS são copolímeros do metacrilato de amônio, diferenciando-se entre si pela proporção do grupo funcional amônio quaternário (10 % em RL e 5 % em RS). Os grupos amônio, presentes como sais, dão a característica de permeabilidade a estes polímeros, ou seja, são insolúveis porém permeáveis à água, garantindo que a liberação da substância ativa seja pH independente. Filmes de RL são mais permeáveis que RS, podendo-se obter variados graus de permeabilidade com a mistura dos dois tipos. Alternativamente, ainda existem os Eudragits<sup>®</sup> RL30D e RS30D (EUD RS30D), os quais são dispersões aquosas contendo 30% de polímero (KIBBE, 2000).

ESPOSITO e colaboradores (2002) prepararam micropartículas pelo método de *spray-drying* utilizando polimetacrilatos, visando a liberação colônica de ácido ascórbico, após administração via oral. Os Eudragits<sup>®</sup> L, RL e as misturas RS/L e RL/L foram utilizados. As microesferas preparadas foram caracterizadas quanto à forma e tamanho e cinética de liberação *in vitro* pelo método de diálise. Os resultados mostraram que as micropartículas foram ineficientes para controlar a liberação, mas demonstraram potencialidade para liberação colônica da substância ativa carregada. Além disso, outra constatação foi a influência da substância carregada, que quando presente provocou aumento do tamanho médio e alteração das características de superfície das partículas pelo aparecimento de placas escuras.

HEGAZY e colaboradores (2002) também utilizaram Eudragit<sup>®</sup> RS para preparar micropartículas de brometo de piridostigmina pelo método de *spray-drying*, visando obtenção de liberação modificada do fármaco capaz de contornar

características como curta meia-vida de eliminação e efeitos colaterais. Os autores utilizaram duas metodologias para a preparação, solubilização ou dispersão da substância ativa, e diferentes proporções fármaco/polímero. Os resultados evidenciaram a liberação modificada a partir das micropartículas em relação ao fármaco puro. A liberação mostrou ainda ser dependente da forma das micropartículas, apresentando em todos os casos altos teores em tempos iniciais (*burst*), ao que os autores atribuíram a presença da substância ativa nas proximidades da superfície das partículas ou à incompleta encapsulação da mesma.

Este mesmo trabalho relatou ainda valores de tamanho médio das micropartículas obtidas, o qual variou de acordo com a metodologia empregada: 3,7 a 6,9  $\mu\text{m}$  para dispersão e 5,9 a 10,3  $\mu\text{m}$  para solubilização da substância ativa. Os rendimentos obtidos no processo de *spray* acompanharam estas variações: 53,8 % para dispersão e 66 % para solubilização. Perdas durante o processo de preparação podem ser atribuídas ao *design* do equipamento, originando partículas úmidas que levam à formação de filmes na câmara de secagem e reduzem o rendimento da preparação (HEGAZY *et al.*, 2002).

A possibilidade de conferir propriedades mucoadesivas ao Eudragit<sup>®</sup> L100 e S100 foi investigada por CILURZO e colaboradores (2003), quando prepararam sais sódico e potássico desses copolímeros com o intuito de desenvolver um novo material mucoadesivo pouco permeável destinado à preparação de formas farmacêuticas bucais. Os sais foram obtidos por nebulização em *spray-dryer* de uma solução aquosa do polímero neutralizada com NaOH ou KOH e, posteriormente, foram utilizados para a formulação de comprimidos e sistemas transdérmicos.

Em um trabalho subsequente (CILURZO *et al.*, 2005), os sais sódicos de Eudragit<sup>®</sup> L e S foram utilizados em proporções variadas para a preparação por *spray-drying* de micropartículas de dissolução rápida para via sublingual contendo piroxicam. Como em outros estudos anteriormente citados, a morfologia das partículas sofreu interferência da presença do fármaco e os tamanhos médios, também variados, apresentaram valores entre 2 a 15  $\mu\text{m}$ . As formulações preparadas garantiram a dissolução e aumentaram a solubilidade aparente do piroxicam. As propriedades mucoadesivas foram afetadas pela composição das preparações, sendo que a formulação de micropartículas compostas por piroxicam e

Eudragit® L sódico na proporção 70:30 (m/m) foi eleita como a mais promissora pois contém a menor quantidade de polímero capaz de conferir as características desejadas de dissolução e mucoadesividade.

Como pôde ser observado, tão importante quanto a preparação é a caracterização das micropartículas poliméricas, de maneira que seja possível garantir a efetividade dessas partículas como sistemas carreadores de fármacos, bem como prever o seu comportamento *in vivo*. Desse modo, forma e superfície das partículas são predominantemente caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (WALTON, 2000; PALMIERI *et al.*, 2001; ESPOSITO *et al.*, 2002) ou por microscopia óptica (ALAMILLA-BELTRÁN *et al.*, 2005), sendo que esta última técnica é freqüentemente utilizada como auxiliar em relação à primeira. A MEV também pode ser utilizada para determinação de tamanho médio e distribuição granulométrica (ESPOSITO *et al.*, 2002), porém métodos baseados em difratometria de laser garantem resultados mais precisos e confiáveis (HEGAZY *et al.*, 2002; ONEDA e RÉ, 2003).

Espectroscopia na região do infravermelho, análises por difratometria de raios-X e métodos termo-analíticos, como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), podem ser úteis para determinar interações e/ou incompatibilidades entre os constituintes de uma formulação (CILURZO *et al.*, 2005; ARMIJO, 2003).

Dentre os métodos mais esclarecedores para a caracterização das micropartículas, estão os ensaios de dissolução. Os testes de dissolução, apesar de ausentes em códigos oficiais para a avaliação de sistemas microparticulados, são importantes para orientar o desenvolvimento das formulações, além de permitirem a demonstração *in vitro* de características que podem estar correlacionadas com a sua performance *in vivo*. Além disso, os perfis de liberação obtidos com estes ensaios encerram informações fundamentais capazes de descrever a estrutura e o comportamento da formulação em uma escala microscópica, bem como sugerir mecanismos de interação fármaco-carreador durante a liberação (AULTON, 2005).

Dentro deste contexto, WASHINGTON (1990) descreveu os diversos processos que governam a liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados, dentre os quais destaca os mais importantes. São eles: a) a

difusão do fármaco a partir da matriz sólida, situação em que o carreador mantém sua estrutura íntegra; b) a penetração do solvente na micropartícula, com conseqüente solubilização do fármaco, que se difunde no meio de dissolução. Quando a entrada do solvente ocorre por percolação através dos poros da partícula pode haver geleificação, resultando em uma viscosa camada por onde ocorre a difusão, o que torna o mecanismo bastante complexo devido ao grande número de variáveis envolvidas; c) o carreador pode ainda degradar ou dissolver quando a substância não tem capacidade para se difundir, o que ocorre muito mais rapidamente que a difusão que caracteriza o processo de liberação controlada.

Mesmo diante dos avanços alcançados nos estudos de liberação de fármacos a partir de micropartículas, metodologias oficiais para a determinação do perfil de liberação *in vitro* desses sistemas ainda estão ausentes. Assim, métodos conhecidos têm sido utilizados, tais como técnicas que empregam membranas de difusão ou diálise, dispersão em volume fixo de meio, célula de fluxo ou mesmo dissolutor utilizando pás ou cestas, com variações capazes de adaptar essas metodologias à avaliação de sistemas microparticulados (OBACH, 2002).

Dentre os métodos adaptadamente utilizados para estudos de liberação de micropartículas, a célula de fluxo destaca-se pela manutenção de perfeitas condições *sink* ao experimento, reproduzindo com maior fidedignidade as condições do trato gastrointestinal. Além disso, a condição *sink* é fundamental para a realização de análises matemáticas da liberação, uma vez que as equações de difusão tornam-se de difícil resolução em condições de acumulação da substância no meio de dissolução (WASHINGTON, 1990).

Na avaliação dos perfis de liberação *in vitro*, uma diversidade de metodologias pode ser empregada, as quais podem ser classificadas em três grandes categorias: métodos de análise exploratória dos dados, tanto na forma gráfica quanto numérica, adequadamente utilizados como uma análise preliminar dos perfis; métodos de comparação matemática entre perfis, como os fatores de similaridade ( $f_2$ ) e de diferença ( $f_1$ ) e eficiência de dissolução; e finalmente, métodos de modelagem matemática (O'HARA, *et al.*, 1998).

A metodologia  $f_1/f_2$  caracteriza-se pela simplicidade de aplicação e confiabilidade dos resultados, sendo amplamente preconizada pelo FDA. Inicialmente, este método foi utilizado para a comparação de perfis de formulações “teste e referência”, ou para a comparação de diferentes lotes após pequenas modificações nos constituintes da formulação ou na preparação. Entretanto, pode ser aplicado sempre que houver necessidade de comparação entre perfis, desde que as medidas sejam realizadas sob as mesmas condições experimentais e nos mesmos intervalos de tempo de dissolução. Quando há similaridade entre os perfis comparados, os valores de  $f_2$  situam-se entre 50 e 100, enquanto os de  $f_1$  ficam na faixa de 0 a 15. Deve-se atentar para o fato de que os valores de  $f_2$  são sensíveis ao número de pontos amostrais após ser atingido um platô de dissolução, sendo recomendável que os perfis sejam comparados até 85 % da dissolução (SHAH *et al.*, 1998).

A eficiência de dissolução, por sua vez, descrita por KHAN (1975), consiste na comparação quantitativa de perfis através do cálculo da relação entre a área sob a curva do gráfico percentual dissolvido em função do tempo e a área do retângulo formado por estes eixos. É um parâmetro comparativo, podendo ser calculado em conjunto com valores de 50 % e 90 % de dissolução.

Finalmente, métodos baseados na modelagem matemática são amplamente descritos na literatura e avaliam a aproximação de pontos experimentais a um modelo descrito pela comparação estatística de parâmetros calculados. A avaliação através da modelagem matemática permite inferir dados sobre os mecanismos de liberação observados, contudo pode haver dificuldade na escolha do modelo, na interpretação dos parâmetros e na determinação dos limites para a similaridade (O’HARA *et al.*, 1998).

Dentro desta perspectiva, CRUZ (2005) utilizou a modelagem matemática para caracterizar os perfis cinéticos obtidos pela hidrólise alcalina de éster etílico de indometacina após sua liberação a partir de nanocarreadores. Os modelos monoexponencial e biexponencial permitiram calcular o tempo de meia-vida do consumo do éster para cada formulação, sendo possível constatar a relação deste parâmetro com a quantidade de polímero utilizada na preparação das

nanopartículas. O estudo também utilizou com sucesso o modelo de Lei das Potências, elucidando o mecanismo de liberação a partir dos sistemas investigados.

### 3.3 Administração oral de carreadores poliméricos de fármacos

A via oral foi a primeira rota utilizada para a administração de sistemas micro e nanoparticulados em meados dos anos 80 (LEGRAND *et al.*, 1999). Desde então, estes carreadores têm demonstrado serem estratégias interessantes para a administração de fármacos pela via oral, uma vez que são capazes de aumentar sua absorção, melhorar sua biodisponibilidade, proteger a mucosa gástrica contra agentes irritantes, além de serem úteis no transporte de antígenos para imunização oral (DESAI *et al.*, 1996).

Mesmo diante das inúmeras evidências do transporte transmucosal de partículas no trato gastrointestinal, este fenômeno foi considerado por um longo período de tempo como de ocorrência excepcional, sendo possível exclusivamente através das células M nas Placas de Peyer, constituintes do tecido linfóide gastrointestinal (ALONSO, 2004). É sabido que as células M são estruturas altamente especializadas no processo de endocitose, contudo, além desse mecanismo, outras duas rotas de entrada de partículas no epitélio intestinal são descritas: através das células epiteliais normais (enterócitos) e pela via paracelular (FLORENCE, 1997).

Apesar das inúmeras divergências entre os resultados encontrados por diferentes pesquisadores dedicados ao tema, é consenso que o tamanho de partícula e as propriedades de superfície desempenham papéis fundamentais na capacidade de internalização das partículas pelo trato gastrointestinal (DESAI *et al.*, 1996; FLORENCE, 1997; ALONSO, 2004).

Assim, DESAI e colaboradores (1996), objetivando investigar a influência do tamanho na absorção das partículas, prepararam estruturas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) com 100 nm, 500 nm, 1 µm e 10 µm contendo albumina sérica como modelo de antígeno. Realizando aplicação *in situ* em alça intestinal de ratos, os autores observaram maior internalização de partículas na região do íleo (em comparação com o duodeno), nas placas de Peyer (em comparação com os demais tecidos) e para partículas com 100 nm (quando comparadas aos outros tamanhos estudados). Além disso, a avaliação histológica dos tecidos evidenciou que

partículas nanométricas difundiram-se através das camadas submucosal e serosal das placas de Peyer, enquanto partículas micrométricas localizaram-se principalmente nas microvilosidades dos enterócitos, sendo promissoras para garantir um efeito de liberação sustentada do agente terapêutico encapsulado, devido à retenção dessas estruturas nas microvilosidades.

Para caracterizar o transporte de fármacos veiculados por sistemas carreadores através do epitélio intestinal muitos métodos têm sido descritos (UNGELL, 1997). Dentre estes, destaca-se a técnica que utiliza sacos intestinais invertidos (sacos de diálise reversa), a qual evita o inconveniente da substância liberada permanecer dentro do saco de diálise reduzindo o gradiente de concentração (LEGRAND *et al.*, 1999). Corroborando com esta assertiva, WASHINGTON (1990) destaca que na diálise normal (não reversa) as amostras testadas não são diluídas em condição *sink*, uma vez que estão acumuladas dentro da membrana de diálise. Esta ocorrência termina por influenciar a partição do fármaco nesta fase interna, influenciando desse modo o gradiente de concentração que controla a difusão da substância.

A diálise reversa em sacos intestinais baseia-se na preparação de pequenos tubos intestinais (2 a 10 cm), geralmente de ratos, que são invertidos e amarrados em suas extremidades. Deste modo, a camada serosal localiza-se no lado interno e a mucosal no lado externo. O tubo intestinal é imerso em um meio como tampão, solução fisiológica ou meio de cultura celular, que é constantemente oxigenado e no qual é dissolvido o fármaco ou o sistema particulado de interesse (SCHILLING e MITRA, 1991; BROWN *et al.*, 2002).

A coleta de amostras pode ser realizada retirando o tubo intestinal do sistema em que se encontra imerso, sendo que este deve ser pesado antes e depois do experimento para compensar a movimentação do fluido. Outra alternativa é canular uma das extremidades para realizar coletas periódicas do lado serosal do intestino.

Dentre as vantagens do método pode-se destacar que é um processo rápido, através do qual pode-se testar mais de um fármaco simultaneamente, especialmente aqueles de baixa permeabilidade. A principal desvantagem é a perda de viabilidade tecidual, demonstrada por estudos histológicos que evidenciam modificações

estruturais após 5 minutos e ruptura do epitélio após 1 hora de incubação (UNGELL, 1997). Contudo, para contornar este inconveniente, estudos mais recentes vêm utilizando meio de cultura como TC 199, garantindo desse modo a viabilidade do tecido (BROWN *et al.*, 2002; CORNAIRE *et al.*, 2004).

BROWN e colaboradores (2002) investigaram a influência de monocaprina, na permeabilidade de um agonista  $\beta$ -adrenérgico (BTA-243), utilizando as metodologias de permeação em células Caco-2 e sacos intestinais invertidos de ratos. Os autores utilizaram meio de cultura TC 199 (pH 7,4) para a incubação dos sacos intestinais, contendo o fármaco em estudo isolado ou juntamente com o promotor de absorção. Os resultados obtidos indicaram que o transporte de BTA-243 foi possível exclusivamente na presença de monocaprina nas células Caco-2. Quanto à diálise reversa, foi constatado aumento significativo (software SPSS) na taxa de transferência do fármaco no epitélio intestinal na presença do promotor de absorção.

ARELLANO e colaboradores (2004) também utilizaram a metodologia de diálise em sacos intestinais invertidos de ratos para permitir a absorção de testosterona, androstenediona e 6- $\beta$ -hidroxitestosterona, visando o desenvolvimento de um método de quantificação destes fármacos em meio de cultura tecidual (TC199). Utilizando cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa, os autores conseguiram validar o método analítico, o qual obteve limites de quantificação na faixa de poucos picogramas para os três fármacos. Adicionalmente, o método conseguiu quantificar diversos metabólitos da testosterona formados durante a absorção intestinal *ex vivo*.

### **3.4 Avaliação da atividade antiulcerativa *in vivo***

A avaliação da atividade de substâncias com potencial antiulcerogênico vem sendo amplamente descrita na literatura, abrangendo ensaios que utilizam ácido acético, antiinflamatórios não-esteróides, analgésicos, ou pentagastrina como agentes causadores de úlcera em ratos e camundongos (KONTUREK *et al.*, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2003; PETROVIC *et al.*, 2003).

GAO e colaboradores (2002), por exemplo, induziram úlceras gástricas em ratos Wistar machos utilizando indometacina na dose de 50 mg/kg pela via subcutânea. Concomitantemente, um polissacarídeo isolado da espécie vegetal *Ganoderma lucidum* foi administrado via oral com o intuito de avaliar sua atividade antiulcerativa, bem como o mecanismo de inibição da secreção gástrica. Os ratos controle, aos quais foi administrada somente indometacina apresentaram índice lesional de  $8,6 \pm 0,9$  no sexto dia após administração, enquanto animais tratados com polissacarídeo apresentaram índice de  $6,5 \pm 0,6$  (dose 250 mg/kg) e  $4,3 \pm 0,7$  (dose 500 mg/kg). Adicionalmente, a análise de culturas celulares gástricas demonstrou que a diminuição da ulceração deve-se a fatores como supressão da produção de citocinas tóxicas e estimulação das células proliferativas no epitélio gástrico.

A indometacina também tem sido utilizada pela via oral para indução de ulceração. PETROVIC e colaboradores (2003) utilizaram este antiinflamatório na dose de 8 mg/Kg, para induzir lesões agudas na mucosa gástrica de ratos, com o intuito de avaliar as propriedades antiulcerativas de uma lactona extraída de *Tanacetum larvatum*. O extrato vegetal foi administrado imediatamente após o agente ulcerativo e as lesões gástricas observadas nos grupos controle e tratados foram classificadas segundo um escore lesional. As lesões induzidas pela indometacina ( $5,5 \pm 4,8 \text{ mm}^2$  de área ulcerada) foram significativamente reduzidas pela administração do extrato ( $0,2 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,05$ ).

SHAH e colaboradores (2003) estudaram diversos modelos de indução de úlcera gástrica com o objetivo de avaliar a atividade antiulcerativa de *Mimusops elengi*. A primeira metodologia consistia na administração de etanol absoluto a ratos mantidos em jejum por 24h, o que provocou bandas hemorrágicas e lesões circulares na mucosa estomacal. A administração do extrato vegetal na dose de 50 a 500 mg/Kg via oral garantiu proteção que variou de 49,4 a 77,9 %, reduzindo significativamente o índice de úlcera ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle.

Também foi descrita por SHAH e colaboradores (2003) a interrupção do fluxo pilórico, provocando acumulação da secreção gástrica, o que levou a indução de lesões lineares e circulares e ao aparecimento de petéquias na mucosa gástrica. A terceira metodologia empregava imobilização dos ratos e imersão em água até a

altura do processo xifóide, com o intuito de produzir estresse e reação ulcerogênica. As lesões hemorrágicas observadas na mucosa estomacal e as evidências de sangramento intraluminal, induzidas pelas duas metodologias citadas, foram significativamente reduzidas ( $p < 0,05$ ) pela administração do extrato de *Mimusops elengi* nas doses de 50 e 100 mg/kg quando comparadas ao grupo controle.

Finalmente, TAKEUCHI e colaboradores (1999) induziram ulcerações gástricas e duodenais em ratos por dois métodos diferentes. O primeiro método consistia-se na administração subcutânea de mepirizol (200 mg/kg), o qual provocou aumento da secreção ácida estomacal, causando lesões hemorrágicas na porção proximal do duodeno. O segundo, consistiu na indução de úlcera duodenal crônica utilizando ácido acético administrado na camada serosal do duodeno, acessada por meio de processo cirúrgico, o que induziu úlceras perfuradas de 6 mm de diâmetro. A indução de ulceração objetivou a avaliação da atividade anti-secretória e anti-ulcerativa de PAN, comparativamente a atividade demonstrada por lansoprazol e omeprazol.

Nesse estudo, o PAN demonstrou uma redução efetiva da secreção ácida basal, sendo que esta redução foi dose-dependente (35 % para dose de 3 mg/kg). PAN também foi eficaz na redução da secreção gástrica induzida por mepirizol, demonstrando uma diminuição de 99,2 % para a mesma dose anteriormente mencionada, sendo 1,5 vezes mais potente que os outros inibidores testados. Quanto à proteção contra ulcerações induzidas por ácido acético, os três fármacos estudados diminuíram o índice lesional, sendo que pantoprazol mostrou-se o mais efetivo, apresentando uma diminuição de 87 %, contra 54 % para omeprazol e 80 % para lansoprazol.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---



## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Matérias-primas

- Substância ativa: pantoprazol sódico sesquihidratado (Henrifarma, São Paulo, Brasil).
- Polímeros:
  - Eudragit S100<sup>®</sup> [poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)] (Almapal, São Paulo, Brasil);
  - Eudragit RS 30D<sup>®</sup> [cloreto de poli(metacrilato de trimetilamônioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)] (Almapal, São Paulo, Brasil).

### 4.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Torre para secagem por aspersão MSD 1.0 Lab Maq (Ribeirão Preto, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência:
  - Bomba Série 200 – Perkin Elmer (Boston, EUA);
  - Detector UV-VIS Série 200 – Perkin Elmer (Boston, EUA);
  - Injetor Série 200 – Perkin Elmer (Boston, EUA);
  - Software: Total Chrom Workstation<sup>®</sup>;
- Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN (Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol Scanning Microscope JSM-5800 (Tóquio, Japão);
- Microscópio de luz Olympus BX-41 (Japão);
- Câmera fotográfica Olympus PM-20 (Japão);
- Equipamento para dissolução *in vitro*:

- Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 (Villiers Le Bel, França);
- Células de vidro Desaga (Alemanha);
- Pêndulo automático Desaga (Alemanha);
- Banho termostatizado Ika – EH4 (Rio de Janeiro, Brasil);
- Equipamento para dissolução *in vitro*:
  - Dissolutor VK7010 – VanKel (Cary, EUA);
  - Coletor VK8000 – VanKel (Cary, EUA);
  - Banho termostatizado VK750D – VanKel (Cary, EUA);
- Espectrofotômetro UV/Vis Unicam 8625 (Cambridge, Grã-Bretanha);
- Difrátômetro de laser Malvern Mastersizer/ E (Worcestershire, Grã-Bretanha);
- Espectrômetro de infravermelho, FTIR 8300, Shimadzu (Kyoto, Japão);
- DSC 60, Schimadzu (Kyoto, Japão);

#### **4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais**

- Acetonitrila grau CLAE - Omnisolv (Charlotte, EUA);
- Álcool etílico - Synth (Diadema, Brasil);
- Ácido clorídrico p.a. - Nuclear (São Paulo, Brasil) ;
- Hidróxido de sódio - Merk (Frankfurt, Alemanha);
- Fosfato de potássio monobásico - Nuclear (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de potássio dibásico - Synth (Diadema, Brasil);
- Meio de cultura tecidual TC 199 – Cultilab (Campinas, Brasil);

- Bicarbonato de sódio - Cultilab (Campinas, Brasil);
- Membranas de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$ , 47 mm - Millipore (São Paulo, Brasil);
- Membranas de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm - Millipore (São Paulo, Brasil);
- Pré-filtros AP 25 em microfibra de vidro, 20 mm - Millipore (São Paulo, Brasil);
- Coluna Lichrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) - Merk (Alemanha).

#### 4.1.4 Animais de laboratório

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 300 g, providos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL)/UFRGS.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparação das micropartículas

As micropartículas foram preparadas pelo método de aspensão (*spray-drying*), utilizando-se Spray-Dryer Lab Maq MSD 1.0<sup>®</sup>. Foram preparadas três formulações diferentes (M1, M2 e M3), variando a composição e quantidade dos polímeros utilizados. Em todos os casos os polímeros foram dissolvidos e/ou dispersados em uma solução de NaOH 0,1M à qual foi adicionado, em seguida, o fármaco. A mistura foi mantida sob agitação magnética para solubilização do fármaco e em seguida nebulizada, originando desse modo as micropartículas. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição quali-quantitativa das micropartículas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição quali/quantitativa das micropartículas de PAN preparadas pelo método de aspersão.

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
PAN	0,3 g	0,3 g	0,3 g
EUD S100	1,5 g	0,75 g	-
EUD RS30D	-	0,75g (2,5 mL)	1,5 g (5 mL)
Solução de NaOH 0,1M qsp	100 mL	100 mL	100 mL

As condições operacionais utilizadas para a nebulização foram adaptadas de MÜLLER (1999) e são descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições operacionais utilizadas para a nebulização.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Pressão de ar comprimido	400 KPa
Fluxo de ar	500 NL/h
Fluxo de alimentação	0,44 L/h (7,3mL/min)
Temperatura de entrada do ar de secagem	150°C
Diâmetro do atomizador	0,82 mm

## 4.2.2 Caracterização das micropartículas

### 4.2.2.1 Rendimento

O rendimento foi calculado somando-se todas as massas das matérias-primas de cada formulação, excluindo-se a água, e dividindo pela massa pesada após a preparação das micropartículas, conforme descrito na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa pesada}}{\text{massa das matérias - primas}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### 4.2.2.2 Taxa de recuperação do PAN a partir das micropartículas

Para avaliar a recuperação do PAN, uma massa exata de aproximadamente 20,0 mg de micropartículas (contendo cerca de 2,7 mg do fármaco), foi dissolvida com solução de NaOH 0,05 M em balão volumétrico de 50 mL e mantida sob agitação por aproximadamente três horas para que ocorresse completa extração do fármaco. O volume foi completado com o mesmo solvente e as amostras foram diluídas em fase móvel, a fim de se obter uma concentração teórica de 10 µg/mL. As

amostras foram filtradas em membranas de polivinilideno (0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm, Millipore), sendo em seguida analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito a seguir. A extração foi realizada em triplicata para cada uma das formulações.

#### 4.2.2.3 Quantificação do PAN

A quantificação de PAN foi realizada por CLAE. A metodologia analítica foi baseada nos métodos descritos por MANSOUR e SOROUR (2001) e por DETINGER e colaboradores (2002). A fase móvel constitui-se por tampão fosfato:acetonitrila na proporção 65:35 (v/v). O tampão fosfato pH 7,4 foi preparado com 839 mg de fosfato de potássio monobásico e 137 mg de fosfato de potássio dibásico para 1000 mL de solução. Após a preparação, a fase móvel foi filtrada em membranas de polivinilideno (0,45  $\mu\text{m}$ , 47 mm, Millipore). As condições cromatográficas utilizadas são descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do PAN por CLAE.

Característica	Descrição
Detecção	UV ( $\lambda = 290 \text{ nm}$ )
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	LiChrospher 100 RP <sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 $\mu\text{m}$ - Merk )
Fase móvel	Acetonitrila:tampão fosfato pH 7,4 (35:65 v/v)
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$

A curva padrão foi preparada pela diluição da massa exata de aproximadamente 25 mg de PAN a 25 mL em água e, posteriormente, diluição de alíquotas dessa solução-mãe em fase móvel, de modo a obter as concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15  $\mu\text{g/mL}$ . Estas últimas foram filtradas em membrana de polivinilideno (0,45  $\mu\text{m}$ , 13 mm, Millipore) antes da injeção no cromatógrafo.

##### 4.2.2.3.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do PAN

A validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pelo ICH (*International Conference on Harmonization of Thechnical*

*Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) de 1996 e resolução da ANVISA RE n° 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação, sendo os ensaios realizados em cromatógrafo Perkin Elmer Série 200 com detector UV/VIS. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram os mesmos anteriormente apresentados na Tabela 3.

Para o estudo da linearidade, foram desenvolvidas três curvas de calibração, com sete níveis de concentração em cada uma delas (1 a 15 µg/mL). A equação de reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,33DP}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10DP}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DP é o desvio padrão da reta de calibração e B é o coeficiente angular da reta de calibração.

Para avaliar a repetibilidade, três concentrações diferentes (6, 9 e 14 µg/mL) foram injetadas em triplicata, totalizando nove determinações, sendo o resultado da análise expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia.

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as injeções de uma mesma concentração (9 µg/mL) realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, realizado adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco (2 µg/mL) à solução amostra, resultando nas concentrações de 6, 9 e 14 µg/mL. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

As soluções amostra utilizadas para a avaliação da repetibilidade, precisão intermediária e exatidão foram preparadas a partir da formulação M1 de micropartículas.

#### **4.2.2.4 Avaliação morfológica**

##### **4.2.2.4.1 Microscopia óptica**

Para esta análise, as micropartículas e o PAN puro foram dispostos entre lâmina e lamínula ao ar ou após dispersão em óleo mineral. As amostras foram examinadas por microscópio óptico (Olympus BX-41), sob luz normal e polarizada, em aumentos de 120 vezes. As imagens foram fotografadas para análise morfológica com câmera (Olimpus PM-20) acoplada ao microscópio.

##### **4.2.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura**

As micropartículas foram analisadas quanto à forma e à superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. As amostras foram metalizadas em ouro (metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN) e analisadas em aumentos entre 250 a 45000 vezes utilizando microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Microscope JSM-5800.

##### **4.2.2.5 Análise granulométrica**

A análise granulométrica foi realizada com a colaboração do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/ SP).

Para a realização das medidas, as micropartículas foram dispersas em *iso*-octano, utilizado como meio não-solvente. O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula foram determinados por difratometria de laser em Malvern Mastersizer/ E. O diâmetro médio baseado no volume ( $d_{4,3}$ ) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho de partícula. Medidas do diâmetro de

partícula correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada ( $d_{0,1}$ ,  $d_{0,5}$  e  $d_{0,9}$ , respectivamente) também foram realizadas.

A análise permitiu ainda a determinação do SPAN, definido como uma medida da dispersão granulométrica, a qual relaciona os valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada para uma amostra, sendo calculado pela Equação 4 (CHEN e DAVIS, 2002):

$$\text{SPAN} = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (\text{Equação 4})$$

#### 4.2.2.6 Análise por calorimetria diferencial exploratória

As análises por calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas na Central Analítica da FEEVALE (Federação de Estabelecimentos de Ensino Superior em Novo Hamburgo) utilizando um DSC 60 Shimadzu. Foram exatamente pesados de 2 a 4 mg de cada amostra, sendo as mesmas adicionadas em porta-amostras selados de alumínio com volume nominal de 34  $\mu\text{L}$ . As condições de análise abrangeram faixa temperatura de 10 a 300  $^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min). A calibração da linha de base foi efetuada com o forno vazio em todos os dias de análise. Desse modo foram obtidos os termogramas das micropartículas, das misturas físicas binárias, bem como de cada componente da formulação individualmente.

#### 4.2.2.7 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química/UFRGS em espectrômetro de infravermelho (FTIR 8300, Shimadzu). Para a obtenção dos espectros, cerca de 1,5 mg de amostra juntamente com 150 mg de brometo de potássio foram triturados em gral de ágata. Em seguida, a mistura foi submetida à compressão em prensa hidráulica, utilizando pressão de  $6 \times 10^4 \text{ N}/\text{cm}^2$  para a preparação das pastilhas. Todos os espectros foram obtidos no modo

transmitância, com  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução e 32 acumulações, cobrindo a faixa de frequência de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.2.2.8 Determinação da área superficial**

A área superficial das micropartículas foi determinada nas amostras previamente degaseificadas, pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) em equipamento volumétrico, utilizando nitrogênio como gás de adsorção. O equipamento utilizado, desenvolvido pelo Instituto de Química/ UFRGS, possui um sistema de linha de vácuo (bomba de vácuo turbomolecular Edward). As medidas da pressão foram determinadas utilizando-se um barômetro capilar de mercúrio e os resultados foram comparados a um padrão de referência de alumina.

#### **4.2.2.9 Determinação da distribuição de tamanho de poros**

A distribuição do tamanho de poros das micropartículas foi avaliada pelas isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio, determinadas no ponto de ebulição do mesmo empregando barômetro capilar de mercúrio. A análise dos resultados foi realizada utilizando o método BJH (Barret, Joyner, Halenda).

#### **4.2.2.10 Determinação do teor de água**

A determinação do teor de água foi realizada pelo processo de Karl Fischer no equipamento Mettler Toledo 37 com detecção coulométrica.

Considerando que o PAN utilizado neste estudo está na forma sesquiidratada, julgou-se importante avaliar o teor de água das formulações sem a presença do fármaco, a fim de verificar sua influência na determinação da umidade das partículas.

O teste foi realizado em triplicata para cada uma das formulações testadas. A massa de amostra necessária para cada ensaio foi de aproximadamente 20 mg, de acordo com o estabelecido no manual do equipamento.

#### **4.2.2.11 Perfis de liberação *in vitro***

A liberação do PAN a partir das micropartículas foi avaliada em célula de fluxo e em dissolutor.

Os meios de dissolução utilizados em ambas metodologias de análise foram tampão fosfato pH 7,4 e solução de HCl 0,1 M pH 1,2 (durante 30 minutos) seguido de tampão fosfato pH 7,4. O primeiro meio de dissolução citado visa avaliar o perfil de liberação, enquanto o segundo mimetiza a passagem gástrica e avalia a gastrorresistência das micropartículas em estudo, importante pelo fato do PAN degradar rapidamente em meio ácido.

Para a preparação da solução tampão, primeiramente foram preparadas individualmente uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e outra de hidróxido de sódio 0,2 M. Após a mistura de 250 mL da primeira solução e 195 mL da segunda, o volume foi completado com água a 1000 mL em balão volumétrico. O pH resultante foi 7,4, sendo ajustado com soluções de NaOH 0,2M ou HCl 0,2M quando necessário. A solução de HCl 0,1M utilizada para mimetizar a passagem gástrica foi preparada com 8 mL de HCl concentrado, completando-se o volume a 1000 mL com água, ajustando-se o pH, quando necessário, para 1,2.

##### **4.2.2.11.1 Célula de Fluxo**

A técnica de dissolução em célula de fluxo caracteriza-se por um sistema aberto, pelo qual se faz passar um fluxo contínuo a uma velocidade constante, garantindo a manutenção de perfeitas condições *sink* ao experimento (WASHINGTON, 1990). A aparelhagem consiste de células de vidro conectadas a uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3) através de cânulas de silicone. O meio de dissolução e as células de vidro foram mantidos em banho termostatizado a  $37 \pm 0,5$

°C (THE UNITED, 2005). Membranas de fibra de vidro (AP25, Millipore) foram acopladas às células a fim de impedir a passagem de adjuvantes para a alíquota a ser coletada. O fluxo de meio de dissolução utilizado foi de 1 mL/min (OBACH, 2002).

A massa de micropartículas utilizada foi correspondente a 5 mg de PAN, no caso do meio de dissolução ser unicamente tampão, e 10 mg quando utilizado estágio ácido previamente ao tampão. A maior quantidade de massa de micropartículas utilizada para a realização do estágio ácido permitiu que as alíquotas provenientes da liberação fossem quantificáveis, mesmo com a ocorrência de degradação parcial do fármaco.

A coleta das alíquotas provenientes da liberação foi realizada em provetas para controle do fluxo, em intervalos de tempo pré-determinados, sendo que, no caso do segundo meio de dissolução, esta foi iniciada após a troca para tampão fosfato. Os tempos de coleta foram: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 e 180 minutos. As alíquotas foram analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta a 290 nm, utilizando espectrofotômetro UV/Vis (Unicam 8625) a fim de determinar a concentração de fármaco presente. Os perfis de dissolução em cada meio representam a média de três determinações utilizando três lotes diferentes.

#### **4.2.2.11.2 Dissolutor**

Os ensaios de dissolução foram realizados também em dissolutor (Vankel VK7010). As seguintes condições experimentais foram seguidas: métodos de cestos (USP I), agitação constante de 100 rpm, volume de 900 mL de meio de dissolução, temperatura mantida em  $37 \pm 0,5$  °C (THE UNITED, 2005).

Cada um dos ensaios foi efetuado em triplicata. Alíquotas de 5 mL foram retiradas automaticamente (Coletor VK8000) nos mesmos tempos de coleta utilizados no experimento de liberação em célula de fluxo, com reposição do meio de dissolução após cada coleta. As alíquotas foram analisadas em espectrofotômetro a 290 nm.

#### 4.2.2.11.3 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação foram construídos plotando-se a quantidade de PAN liberada (em % da quantidade total) em função do tempo. Posteriormente, estes perfis foram avaliados por três diferentes metodologias: fator de similaridade e fator de diferença, eficiência de dissolução e métodos modelo dependentes.

O fator de similaridade (f2) e o fator de diferença (f1) foram aplicados segundo SHAH e colaboradores (1998). O fator de diferença mede a percentagem de erro entre duas curvas em todos os tempos (Equação 5). O fator de similaridade, por sua vez, é a transformação logarítmica da soma dos quadrados da diferença dos erros entre as formulações teste e referência em todos os tempos (Equação 6). Valores de f2 superiores a 50, bem como valores de f1 inferiores a 15 indicam similaridade entre os perfis.

$$f1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

$$f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:  $n$  é o número de amostras;  $R_j$  e  $T_j$  são as percentagens dissolvidas dos produtos referência e teste em cada tempo  $j$ .

A eficiência de dissolução (ED), foi determinada segundo KHAN (1975) e comparada para as diferentes formulações através do método estatístico ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). ED é uma avaliação modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução expressa como a percentagem da área de um retângulo que descreve 100 % da dissolução em um determinado período de tempo (Equação 7).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:  $y$  é percentagem de fármaco dissolvido no tempo  $t$ .

Finalmente, métodos modelo-dependentes foram aplicados para a avaliação dos perfis de liberação. A descrição matemática das curvas foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 8) e biexponencial (Equação 9).

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 8})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad (\text{Equação 9})$$

Onde: %D é o percentual de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ;  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $k$  são as constantes cinéticas observadas; A e B são as concentrações iniciais de fármaco.

Após a escolha do modelo que melhor descreve os dados experimentais, a Equação 10 (SHARGEL, 2005) foi utilizada para o cálculo do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de liberação para cada amostra analisada.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:  $k$  é a constante cinética observada para o modelo selecionado.

O modelo de Lei das Potências (Equação 11) também foi utilizado, permitindo a obtenção dos parâmetros  $a$  e  $n$ , que caracterizam os sistemas quanto às suas características estruturais e geométricas e quanto ao mecanismo de liberação do fármaco, respectivamente.

$$ft = at^n \quad (\text{Equação 11})$$

Onde  $a$  é a constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica;  $n$  é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação;  $f_t$  representa a liberação fracional do fármaco.

A Lei das Potências apresenta duas interpretações físicas distintas. Quando  $n$  assume o valor de 0,5, isto indica que a liberação da substância é controlada por difusão. Quando  $n$  é igual a 1,0 indica que a liberação é controlada pelo inchamento do sistema (transporte caso II) (Tabela 4). Valores de  $n$  entre 0,5 e 1,0 são

relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado então transporte anômalo. Contudo, deve ser salientado que os valores extremos para o expoente  $n$  (0,5 e 1,0) são somente válidos para a geometria planar. Para esferas e cilindros, têm sido obtidos diferentes valores (SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

Tabela 4. Mecanismos de liberação de substâncias a partir de sistemas micrométricos.

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação da substância
Filme	Cilíndrico	Esférico	
0,5	0,45	0,43	Difusão fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II

Assim, considerando a geometria que se identifica ou mais se aproxima da forma das micropartículas preparadas neste estudo, os valores de  $n$  sugeridos para o formato esférico serão tomados como base para a interpretação dos valores obtidos para as micropartículas de PAN.

A adequabilidade dos modelos aos dados experimentais foi avaliada com auxílio do programa Micro Math Scientist<sup>®</sup>, comparando-se os modelos entre si com base em parâmetros como: o critério de seleção de modelo (MSC), o coeficiente de correlação, o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade de cada modelo.

#### 4.2.2.11.4 Validação da metodologia para quantificação do PAN nas alíquotas provenientes da liberação

A espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) foi validada seguindo os mesmos parâmetros anteriormente descritos para a cromatografia líquida de alta eficiência, propostos pelo ICH (1996) e ANVISA (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação, sendo os ensaios realizados em espectrofotômetro UV/Vis Unicam 8625.

Para o estudo da linearidade, foram desenvolvidas três curvas de calibração, com oito níveis de concentração em cada uma delas (4 a 30  $\mu\text{g/mL}$ ). A equação de reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram determinados. Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente através das Equações 2 e 3.

Para avaliar a repetibilidade, seis soluções amostra foram preparadas na concentração teórica de 10  $\mu\text{g/mL}$  de PAN, sendo realizadas três determinações para cada solução. O resultado da análise foi expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia. A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as análises realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, realizado adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco (5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ) à solução amostra, resultando nas concentrações de 15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

As amostras utilizadas para a avaliação da repetibilidade, precisão intermediária e exatidão, também neste caso, foram preparadas a partir da formulação M1 de micropartículas.

#### **4.2.2.12 Avaliação da ação antiulcerativa das micropartículas**

Para avaliação da atividade antiulcerativa das micropartículas, úlceras gástricas foram induzidas em ratos Wistar machos, utilizando etanol p.a. por via oral (gavagem) (SHAH *et. al.*, 2003). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFRGS (parecer nº 2005/403).

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7 - 19 h). Tiveram livre acesso à água e alimentação (ração certificada Nuvilab CR1<sup>®</sup>) e foram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais. Previamente ao início do experimento, os animais permaneceram em jejum por 24 horas, com acesso livre à água.

Para a experimentação, os animais utilizados, pesando entre 250-300 g, foram divididos em quatro grupos, com 5 animais por grupo. Os diferentes tratamentos foram administrados por via oral através de sonda uretral de silicone nº 4.

- Grupo 1 (controle): tratado com 1 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 4,2 %, v.o.
- Grupo 2 (controle): tratado com solução aquosa de PAN na concentração de 2 mg/mL e dose de 20 mg/kg, v.o.
- Grupo 3 (teste): tratado com dispersão aquosa de micropartículas M1, na concentração de 2 mg/mL e dose de 20 mg/kg de pantoprazol, v.o.
- Grupo 4 (teste): tratado com dispersão aquosa de micropartículas M2, na concentração de 2 mg/mL e dose de 20 mg/kg de pantoprazol, v.o.

A formulação M3 não foi avaliada *in vivo* por ter apresentado resultados insatisfatórios quanto à gastrorresistência *in vitro*.

Após 1 hora, etanol foi administrado via oral na dose de 5 mL/kg. Duas horas após administração do etanol, os animais foram sacrificados em guilhotina e submetidos à laparotomia para a retirada dos estômagos. Os órgãos foram abertos pela grande curvatura para a medida da área total e da área ulcerada. Os índices lesionais foram calculados pela Equação 12:

$$IL = \frac{10}{X} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde: 
$$X = \frac{\text{área total do estômago}}{\text{área ulcerada}} \quad (\text{Equação 13})$$

Os índices lesionais foram comparados pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Walis. Comparações dois a dois foram avaliadas pelo método de Student-Newman-Keuls (RAFFIN *et al.*, 2003).

#### 4.2.2.13 Avaliação da permeação de PAN carregado por micropartículas no epitélio intestinal de ratos

Para este estudo, foram utilizados intestinos de ratos Wistar machos pesando entre 250-300 g. Os animais, previamente ao experimento, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, observando-se os mesmos cuidados descritos anteriormente.

Seguindo metodologia descrita por BARTHE e colaboradores (1998), os animais foram sacrificados em guilhotina e submetidos à laparotomia. Uma peça intestinal com 30 cm foi retirada a uma distância de 10 cm distante do esfíncter piloro, lavada com solução salina (NaCl 0,9 %) para remoção do conteúdo luminal e invertida de modo que a camada mucosal permanecesse do lado externo. Em seguida o tubo intestinal formado foi preenchido com meio de cultura (TC 199 pH 7,4) e dividido em pequenas peças de 2,5 cm utilizando fio de sutura.

As peças foram incubadas em erlenmeyer com 20 mL de meio de cultura contendo PAN na concentração de 0,5 mg/mL ou o sistema particulado em estudo em quantidade equivalente de fármaco. O meio foi mantido aquecido em banho de água a 37 °C e sob agitação constante por meio de barras magnéticas.

Em intervalos de tempos pré-determinados, cada um dos pequenos tubos intestinais foi retirado do meio e, por intermédio de um pequeno corte, o líquido serosal foi drenado, diluído com fase móvel, filtrado e analisado por CLAE quanto à concentração de PAN presente (CARRENO-GÓMEZ *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 2002; CORNAIRE *et al.*, 2004).

O experimento foi realizado em triplicata para o fármaco livre e para aquele contido nas formulações de micropartículas M1 e M2, já que a formulação M3 não apresentou resultados satisfatórios quanto a gastrorresistência *in vitro*.

O meio de incubação contendo o fármaco foi doseado por CLAE antes do início do experimento para a quantificação do PAN. Já no caso das micropartículas, pela impossibilidade de determinar o teor de fármaco no meio de incubação, o valor utilizado foi teórico, considerando o doseamento prévio das formulações.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



## 5.1 Preparação das micropartículas

As formulações M1 e M2 foram preparadas com sucesso seguindo a metodologia descrita. Contudo, não foi possível preparar a formulação M3 devido a obstrução no atomizador do *spray-dryer* durante o processo de nebulização. Sendo assim, as quantidades de fármaco e polímero (na forma de dispersão aquosa) da formulação M3 foram reduzidas em 33,3 % (p/v), o que possibilitou a obtenção das micropartículas.

Os produtos obtidos pelo método de aspersão apresentaram características pulverulentas, com coloração variável entre branco e levemente róseo, esta última tonalidade semelhante à do fármaco puro.

Foram também preparadas formulações sem fármaco como controle para os ensaios de determinação do teor de água.

## 5.2 Caracterização das micropartículas

### 5.2.1 Rendimento

Na preparação das micropartículas de PAN, os rendimentos dos pós obtidos apresentaram-se satisfatórios para a técnica e equipamento empregados, sendo similares para as formulações M1 ( $56 \pm 2$  %) e M2 ( $58 \pm 6$  %). Estes valores situam-se em faixa compatível ao descrito na literatura para micropartículas de Eudragit<sup>®</sup> preparadas por *spray-drying* contendo piridostigmina ou ácido ascórbico (HEGAZY, *et al.*, 2002; ESPOSITO *et al.*, 2002). Por sua vez, a formulação M3 apresentou rendimento ligeiramente menor ( $43 \pm 6$  %) em comparação com as duas primeiras. Os valores representam a média de três preparações mais ou menos o desvio padrão.

### 5.2.2 Taxa de recuperação do PAN a partir das micropartículas

O teor de PAN teórico nas formulações e o resultado experimental das taxas de recuperação nas micropartículas são apresentados na Tabela 5. O teor de PAN é

ligeiramente variável entre as formulações, pois a quantidade de solução de NaOH 0,1M utilizada na preparação também varia, uma vez que é utilizada em qsp 100 mL e o polímero EUD RS30D apresenta-se como dispersão aquosa. As taxas de recuperação do PAN nas formulações M1 e M2 foram adequadas situando-se próximas a 100 %. Por outro lado, a formulação M3 apresentou valor de recuperação inferior, próximo a 93 %.

Tabela 5. Teores e taxas de recuperação de PAN sódico nas micropartículas.

Amostra	Teor de pantoprazol (mg/ g pó)	Taxa de recuperação (%)
M1	136,0	100,7 ± 1,7
M2	137,0	99,5 ± 2,1
M3	137,6	93,0 ± 2,4

A validação de metodologia analítica para quantificação do pantoprazol encontra-se descrita no Anexo 1.

### 5.2.3 Avaliação morfológica

#### 5.2.3.1 Microscopia óptica

As micropartículas foram analisadas através das imagens das amostras observadas ao ar ou após a dispersão em meio oleoso. O óleo mineral mostrou-se adequado para a ressuspensão das micropartículas, dada a hidrofiliabilidade do fármaco. As amostras foram observadas em aumento de 120 vezes, sob incidência de luz normal e luz polarizada.

A Figura 3 apresenta as imagens do PAN puro e das micropartículas M1, M2 e M3 visualizadas sob luz normal. Observando-se as imagens das formulações, pode-se constatar o tamanho reduzido das micropartículas formadas e uma tendência à aglomeração das mesmas. Quanto ao formato, percebe-se, nesta magnitude, que são predominantemente esféricas nos três casos.

Quando a observação foi realizada sob luz polarizada, o PAN demonstrou evidente característica cristalina, tanto na sua forma normal quanto no produto nebulizado (Figura 4). ZUPANCIC e colaboradores (2005) obtiveram PAN na forma amorfa pelo método de *spray-drying*. Entretanto, no presente trabalho o processo de

spray não provocou alterações na estrutura cristalina do fármaco, fato confirmado pelo brilho dos cristais devido à luz polarizada no produto nebulizado.

A constatação mais interessante, no entanto, foi a observação das micropartículas sob luz polarizada, sem evidências de cristais. A ausência dos cristais é uma indicação da microencapsulação do PAN nas micropartículas M1, M2 e M3, pois os cristais deste fármaco são evidentes sob luz polarizada (Figura 4).

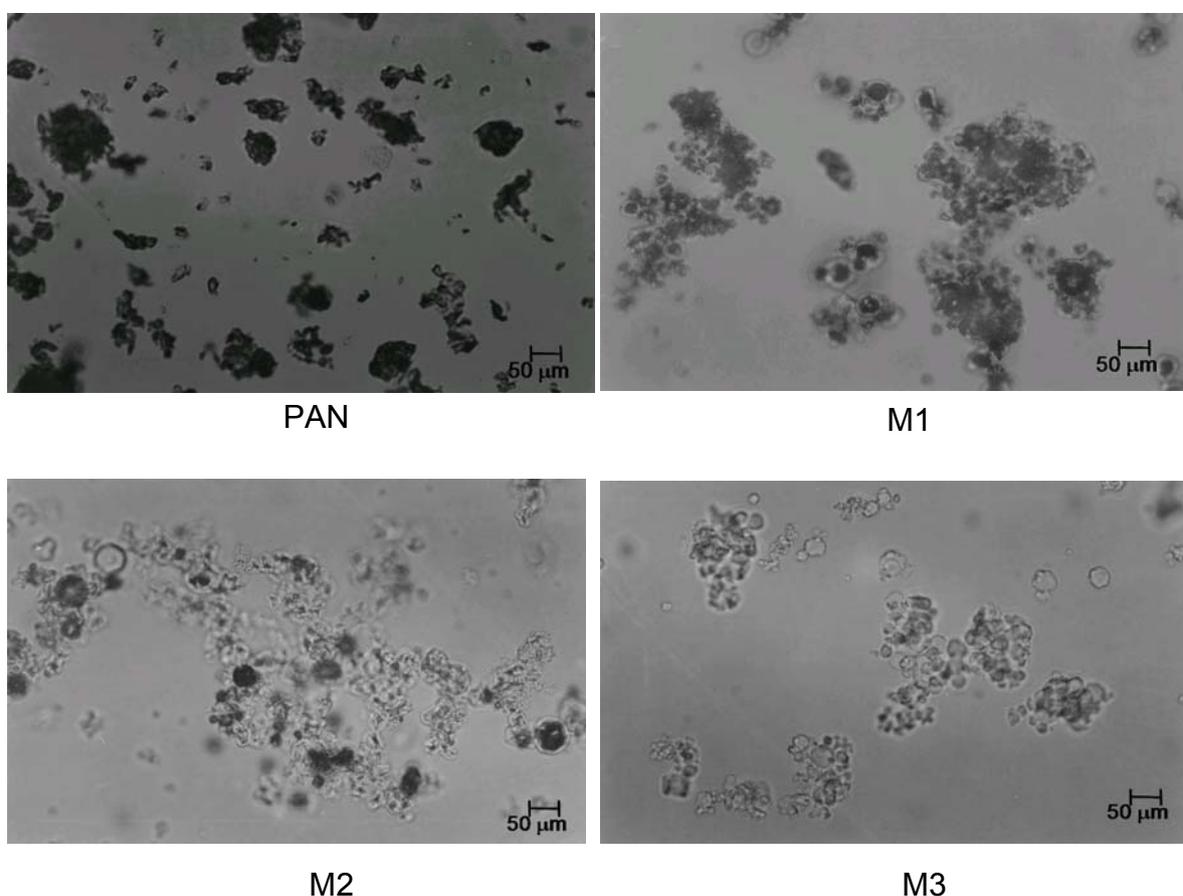


Figura 3. Fotografias sob luz normal do PAN e das micropartículas M1, M2 e M3 dispersos em óleo (120x).

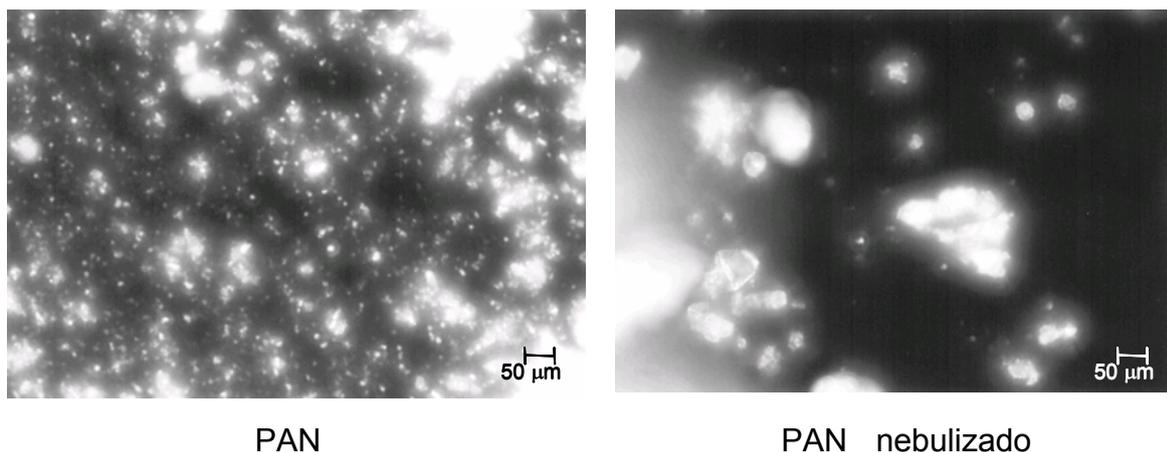


Figura 4. Fotografias sob luz polarizada do PAN ao ar e PAN nebulizado em óleo mineral (120x).

### 5.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica das partículas realizada através de MEV com aumento de 1000 vezes revelou a existência de um sistema microparticulado pouco polidisperso para as formulações M1 e M2, enquanto a formulação M3 mostrou-se visualmente mais polidispersa (Figuras 5, 6 e 7). Em aumentos de 5000 vezes, pôde-se evidenciar diferenças na forma das partículas. No caso da formulação constituída pelo polímero EUD S100 e PAN (M1) as partículas apresentaram-se com forma semelhante a hemácias, com várias concavidades em uma mesma partícula. A formulação constituída pelo polímero EUD RS30D e PAN (M3) apresentou forma semelhante, porém com concavidades mais profundas, dando a idéia de partículas mais “delgadas”. Outra constatação relevante neste último caso é a presença de partículas pequenas internalizadas em outras maiores, além de aglomerados de partículas na forma de “cachos”.

Fenômenos como estes são relatados por WALTON (2000) que remete às considerações de CROSBY e MARSHALL (1958)<sup>1</sup> para explicar as concavidades citadas: a ação de capilaridade da superfície seca das partículas no momento da

<sup>1</sup> CROSBY, E. J.; MARSHALL, W. R. **Chemical Engineering Progress**, v. 54, n. 7, p. 56, 1958 *apud* WALTON, D. E. The Morfology of Spray-Dried Particles: a Qualitative View, **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p.1943-1986, 2000.

extração do líquido para o exterior acontece uniformemente ao redor da gotícula, criando uma pressão interna sub-atmosférica, resultando em partículas colabadas. Este fenômeno também pode ser devido ao impacto das partículas úmidas na parede da câmara de secagem, que acabam por deformar ou colabar.

A aglomeração das partículas na forma de “cachos” foi observada também por PALMIERI e colaboradores (2001), quando prepararam micropartículas de Eudragit RS<sup>®</sup>. Já a ocorrência de partículas pequenas dentro de outras de maior tamanho pode ser devido à entrada daquelas através de espaços ou crateras formados nestas últimas. Também deve ser considerada a possibilidade das partículas menores terem sido formadas dentro das maiores (WALTON, 2000).

Interessantemente a formulação M2 (Figura 6), constituída pelos dois polímeros (EUD S100 e EUD RS30D), mostrou que a mistura polimérica originou partículas de formato esférico, completamente diferente das partículas formadas pelo uso dos polímeros de modo individual.

Em aumentos superiores (15000, 20000 e 25000 vezes) foi possível observar a superfície das micropartículas. A formulação M1 mostrou superfície lisa e sem poros, visualmente detectáveis nestas magnitudes. Por sua vez, as formulações M2 e M3 mostraram superfície rugosa, podendo-se inferir que esta característica seja devida à utilização do polímero EUD RS30D.

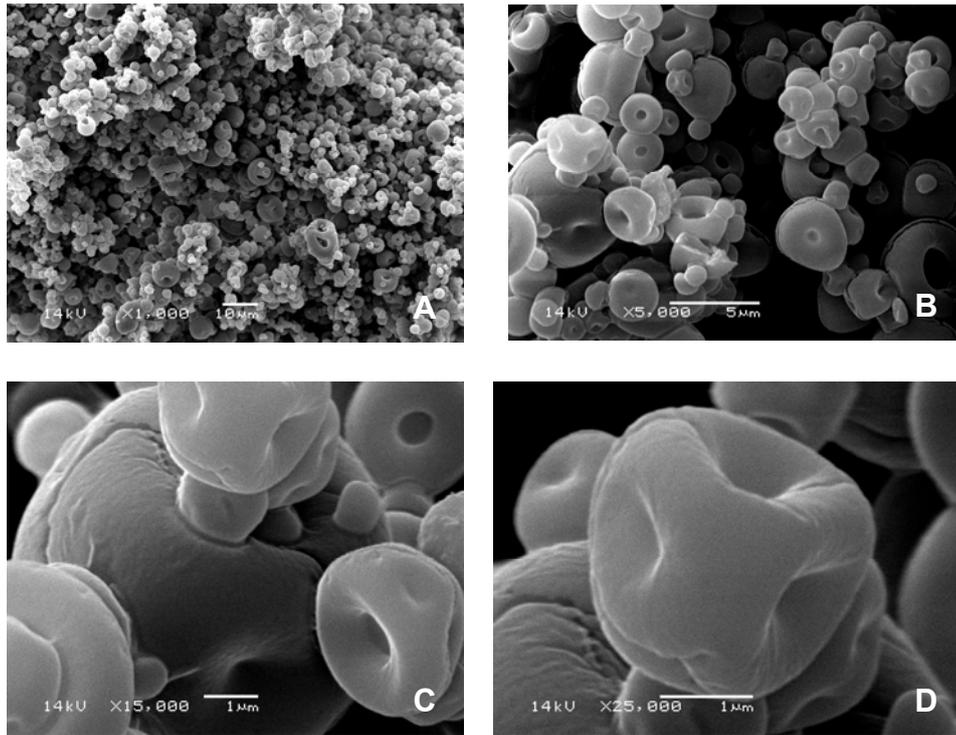


Figura 5. Fotomicrografias das micropartículas M1 (A) 1000x, (B) 5000x, (C) 15000x, (D) 25000x.

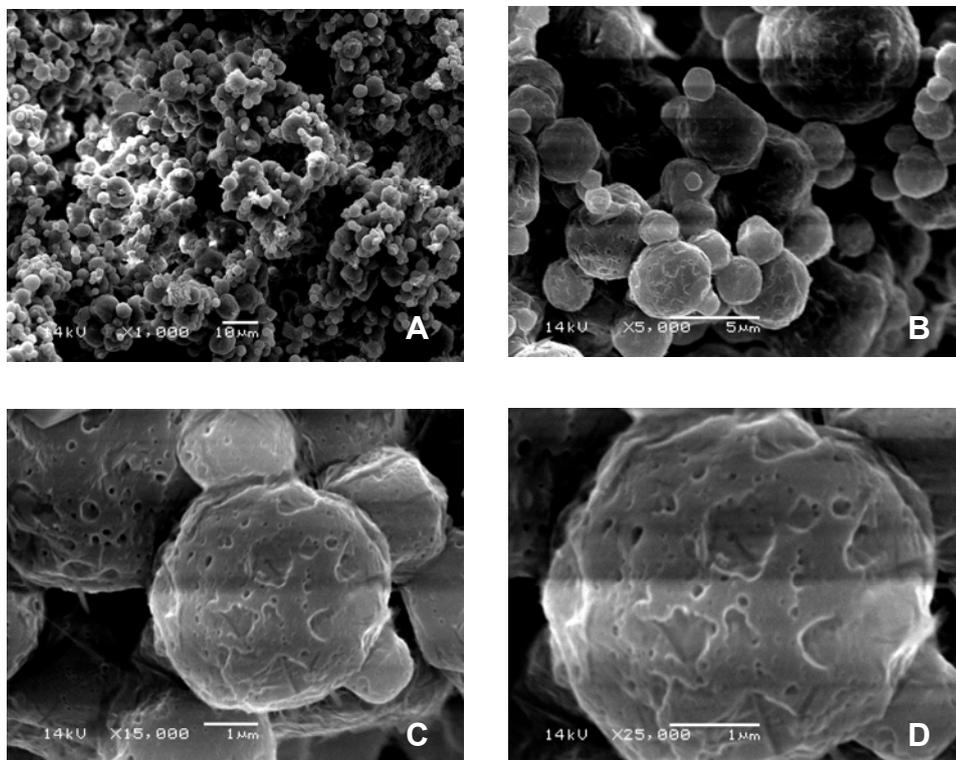


Figura 6. Fotomicrografias das micropartículas M2 (A) 1000x, (B) 5000x, (C) 15000x, (D) 25000x.

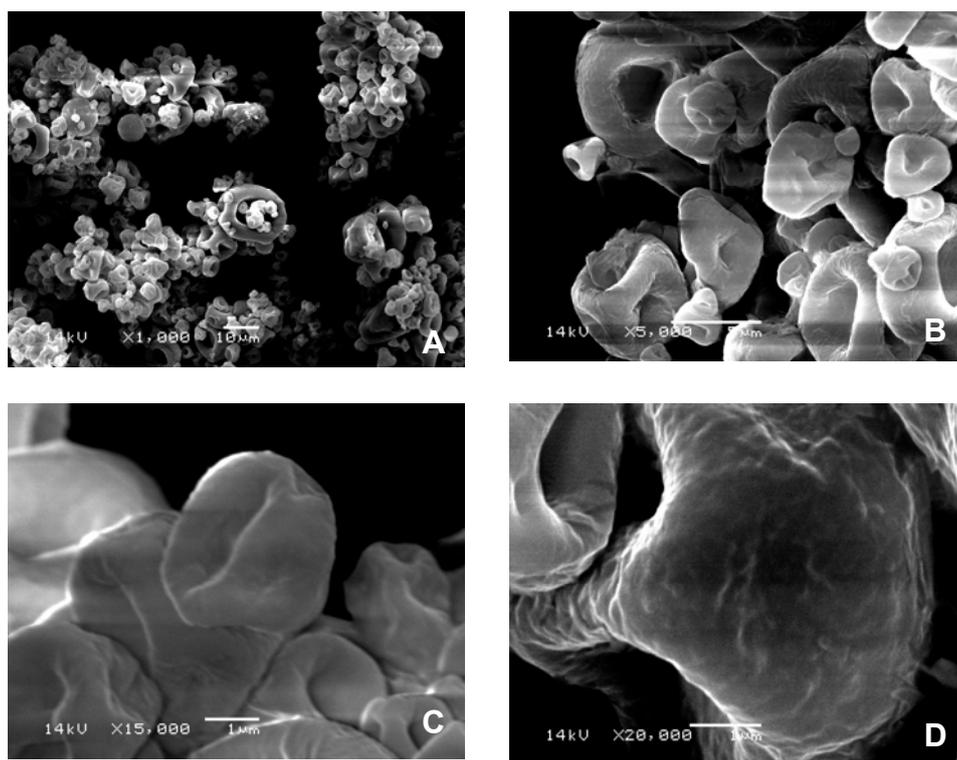


Figura 7. Fotomicrografias das micropartículas M3 (A) 1000x, (B) 5000x, (C) 15000x, (D) 20000x.

#### 5.2.4 Análise granulométrica das micropartículas

A análise granulométrica das micropartículas foi realizada através de difratometria de laser utilizando *iso*-octano como meio não solvente. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição granulométrica por difração de laser das micropartículas.

<b>Amostra</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
d(0,1) (µm)	2,97	3,35	6,73
d(0,5) (µm)	8,42	9,41	33,47
d(0,9) (µm)	16,02	19,28	127,29
SPAN	1,55	1,69	3,60
d (4,3) (µm)	9,11	10,95	53,50

O diâmetro baseado na determinação do volume das partículas ( $d_{4,3}$ ) apresentou valores próximos para as formulações M1 e M2, com valores de SPAN

baixos (inferiores a 2) para ambas as formulações, indicando proximidade dos resultados em torno da média, ou seja, baixa polidispersão. ONEDA e RÉ (2003) preparam micropartículas por *spray* utilizando carboximetilcelulose sódica, hidroxipropilcelulose e Eudragit® NE 30D para a encapsulação de citrato de cálcio ou lactato de cálcio e também observaram baixos valores de SPAN (1,5 a 2,7). Os autores constataram ainda, que a técnica de *spray* foi capaz de reduzir a polidispersão das substâncias puras (5,1 para citrato de cálcio e 2,9 para lactato de cálcio).

A formulação M3, por sua vez, apresentou diâmetro (4,3) bastante superior quando comparada com as demais e valor de SPAN indicando maior polidispersão. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato destas partículas apresentam-se aglomeradas na forma de “cachos”, conforme evidenciado por MEV (Figura 7), sendo que através desta análise não se observou partículas muito maiores para M3 quando comparadas com M1 e M2.

As micropartículas M1 e M2 apresentaram diâmetros médios ao redor de 10  $\mu\text{m}$ , caracterizando-se por serem de potencial aplicação para administração por via oral, visto seus tamanhos reduzidos. DESAI e colaboradores (1996) observaram em seu estudo que partículas submicrométricas são internalizadas no trato gastrointestinal, sendo que partículas maiores, com tamanho de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , são retidas nas microvilosidades dos enterócitos, prolongando seu tempo de trânsito no intestino e facilitando a absorção do fármaco carregado.

### 5.2.5 Análise por calorimetria diferencial exploratória

As interações entre o PAN e os polímeros constituintes das micropartículas foram avaliadas por DSC a partir da análise de cada componente individual, das misturas físicas binárias (nas mesmas proporções utilizadas na preparação das micropartículas) e das formulações finais. Os termogramas obtidos podem ser observados nas Figuras 8 a 10 e seus parâmetros térmicos estão relacionados nas Tabelas 7 a 9.

Observando-se os termogramas relativos ao grupo M1 (Figura 8), nota-se redução da entalpia de fusão do fármaco na mistura física binária (MF1). Pode-se perceber também uma redução de aproximadamente 21°C (Tabela 7) na temperatura em que ocorre esta fusão, evidências estas que podem levar a hipótese de interações entre o PAN e o EUD S100. Por outro lado, observando-se o termograma referente à amostra M1 constata-se a ausência do pico de fusão do fármaco, indicando provavelmente a sua solubilização pelo polímero. FORD e TIMMINS (1989) destacam que a ausência de um pico endotérmico correspondente à fusão do fármaco é uma indicação de que o mesmo está disperso, seja na forma de uma dispersão molecular, seja como uma “solução sólida”, neste último caso ocorrendo também uma diminuição na temperatura de transição vítrea do polímero. Corroborando com esta assertiva, observa-se também redução na entalpia do evento exotérmico referente à degradação do PAN. Modificações também foram observadas nos eventos térmicos relacionados ao EUD S100 como deslocamento do pico, tanto em MF1 quanto em M1, sendo que, quanto a este último, há a suspeita de ser um novo pico, devido ao formato diferente.

A temperatura de fusão do PAN corresponde àquela encontrada por ZUPANCIC e colaboradores (2005). Analisando diferentes formas hidratadas do fármaco, os autores concluíram que fusão e desidratação são processos paralelos no caso das formas mono e sesquidratadas, esta última correspondente à forma empregada para a preparação das micropartículas.

Tabela 7. Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas PAN e EUDS100, para a mistura física PAN:EUD S100 (MF1) e para a formulação de micropartículas M1.

Amostras	Eventos							
	Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Exotérmico	
	T <sub>máx</sub> (°C)	ΔH (J/g)						
PAN			134,8	293,9			187,6	406,2
EUD S100	66,4	182,0			210,2	44,9		
MF1	56,5	28,7	113,7	10,7			189,2	29,7
M1	67,2	285,2	ausente		ausente		217,7	38,3

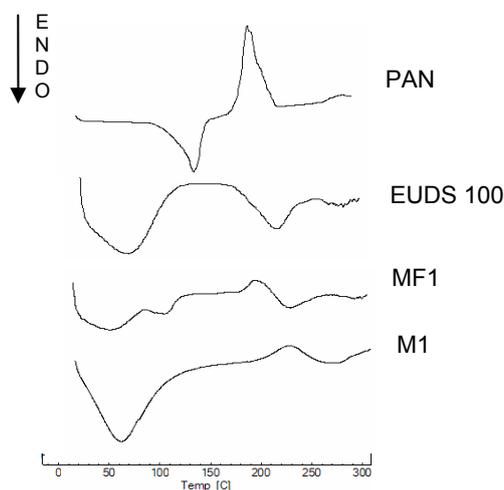


Figura 8. Termogramas obtidos para as substâncias isoladas PAN e EUD S100, para a mistura física binária (MF1) e a formulação de micropartículas M1.

Nos termogramas relativos ao grupo M2 (Figura 9), observa-se redução da entalpia de fusão do fármaco, no caso das misturas físicas (MF1 e MF2), e ausência deste evento na formulação M2 (Tabela 8). Nota-se também redução da entalpia do evento exotérmico tanto em MF1 quanto em M2, ou mesmo sua ausência, como no caso de MF2, o que indica redução ou ausência de degradação do PAN. Também neste caso, os resultados sugerem que o fármaco apresenta-se molecularmente disperso pelo polímero. Comparando-se o termograma do EUD S100 com MF1, observa-se deslocamento do pico e redução da entalpia para os dois eventos térmicos detectados. Na comparação com M2, há deslocamento do pico com aumento de entalpia, ou o surgimento de um novo pico, no caso do primeiro evento, e desaparecimento, no caso do segundo. Já o termograma de EUD RS30D comparado com o de MF2 e M2 mostra desaparecimento do segundo evento em ambos os casos.

Tabela 8. Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas PAN, EUD S100 e EUD RS30D, para as misturas físicas PAN:EUD S100 (MF1) e PAN:EUD RS30D (MF2) e para a formulação de micropartículas M2.

Amostras	Eventos											
	Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Exotérmico	
	T <sub>máx</sub> (°C)	ΔH (J/g)										
PAN					134,8	293,9					187,6	406,2
EUD S100	66,4	182,0							210,2	44,9		
EUD RS30D			134,2	287,1			139,7	63,2				
MF1	56,5	28,7			113,7	10,7			nd		189,2	29,7
MF2				nd	90,3	158,9	110,6	154,6				ausente
M2	80,8	308,0		ausente		ausente		ausente		ausente	194,4	51,4

nd: não determinado

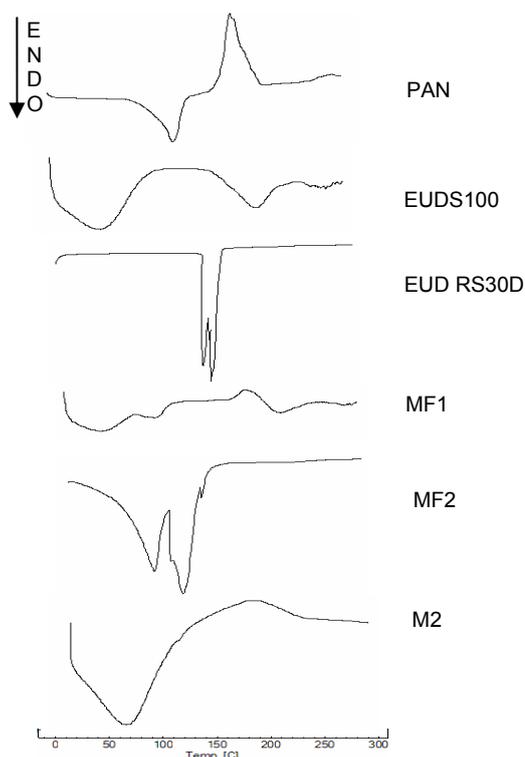


Figura 9. Termogramas obtidos para as substâncias isoladas PAN, EUD S100 e EUD RS30D, para as misturas físicas PAN:EUD S100 (MF1) e PAN: EUD RS30D (MF2) e para a formulação de micropartículas M2.

Paradoxalmente, a formulação M3 apresentou dois termogramas característicos (Figura 10), confirmados pela exaustiva repetição de análises para esta amostra. Tal fato, provavelmente possa ser explicado pela polidispersão das partículas que, além disso, apresentaram-se em aglomerados característicos (os já mencionados “cachos”) também polidispersos, conforme evidenciado pelos resultados das análises morfológica e granulométrica. Comparando-se os termogramas deste grupo, observa-se ainda redução na entalpia e na temperatura de fusão do fármaco em MF2 e em M3b, bem como ausência do referido evento em M3a (Tabela 9), o que leva a inferir, mais uma vez, dispersão molecular do fármaco pelo polímero.

O que desperta mais atenção, contudo, é o aparecimento de um novo evento térmico na faixa de 55°C, que poderia ser confundido com um dos eventos térmicos observados para o EUD S100, o qual, contudo, não está presente em nenhuma amostra deste grupo. A presença deste novo pico em M3 reitera a hipótese do aparecimento de um novo evento em M1 e/ou M2, devido à semelhança no formato do pico e na faixa de temperatura em que ele aparece.

Tabela 9. Parâmetros térmicos obtidos para as substâncias isoladas PAN e EUD RS30D, para a mistura física PAN: EUD RS30D (MF2) e para a formulação de micropartículas M3.

Amostras	Eventos									
	Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Endotérmico		Exotérmico	
	T <sub>máx</sub> (°C)	ΔH (J/g)								
PAN					134,8	293,9			187,6	406,2
EUD RS30D			134,2	239,3			139,7	63,2		
MF2			nd		90,3	158,9	110,6	154,6		ausente
M3a	54,9	119,6	ausente		ausente		ausente		197,2	11,7
M3b	61,8	145,0	ausente		93,2	26,2	128,5	15,0	201,1	20,6

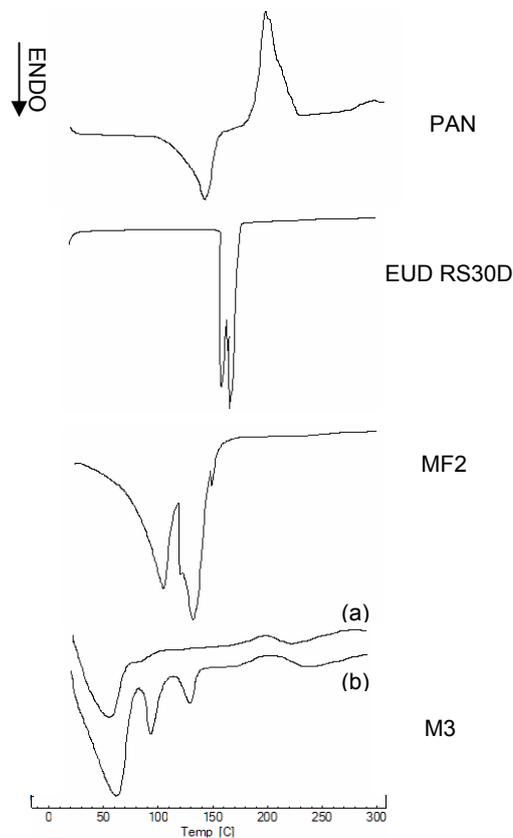


Figura 10. Termogramas obtidos para as substâncias isoladas PAN e EUD RS30D, para a mistura física PAN: EUD RS30D (MF2) e para a formulação de micropartículas M3.

Desse modo, a hipótese de interações levantada pelo deslocamento e mudança na entalpia dos picos é reforçada pelo surgimento de novos eventos térmicos. Assim, tornou-se necessária a realização de análises por espectroscopia na região do infravermelho, na tentativa de elucidar a natureza das interações e esclarecer o aparecimento destes novos eventos.

### 5.2.6 Espectroscopia na região do infravermelho

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho, neste caso, não foi realizada como um teste de identificação de substâncias, mas sim com finalidade comparativa. No entanto, foi possível identificar nos espectros bandas correspondentes aos principais grupos funcionais presentes nas estruturas dos compostos analisados (Figura 11).

Nos espectros de PAN, por exemplo, é possível identificar bandas de absorção O-H e C-H de 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , bandas C=C e C=N de 1800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de  $\text{CF}_2$  em 1375  $\text{cm}^{-1}$  e ainda uma banda referente ao grupo S=O em 1125  $\text{cm}^{-1}$ . Esses achados vão ao encontro de outros descritos na literatura (ZUPANCIC *et al.*, 2005).

Por sua vez, nos espectros de EUD S100 e EUD RS30D é possível observar bandas características de vibração C=O de ácido carboxílico esterificado em 1730  $\text{cm}^{-1}$ , bem como vibrações referentes ao éster em 1150, 1190 e 1275  $\text{cm}^{-1}$ . Em 2900 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  observam-se vibrações características de grupos  $\text{CH}_x$ , o que é confirmado pela presença das bandas 1385, 1450 e 1485  $\text{cm}^{-1}$ . Uma banda larga detectada próximo a 3500  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a presença de grupos OH e água.

Analisando os espectros das misturas físicas MF1 e MF2, é possível identificar as mesmas bandas referentes aos polímeros constituintes das misturas. No entanto, as bandas referentes ao PAN, anteriormente destacadas, não aparecem nestes espectros, devido à diluição do fármaco pelo polímero.

Semelhantemente às misturas físicas, as bandas características do PAN não foram visualizadas nas formulações M1, M2 e M3. Porém, o fato mais relevante é o aparecimento de bandas novas em 1560 e 1450  $\text{cm}^{-1}$ , as quais podem ser

visualizadas na Figura 11. Estas bandas não apareceram nos espectros dos polímeros constituintes das formulações, nem tampouco no espectro do fármaco puro.

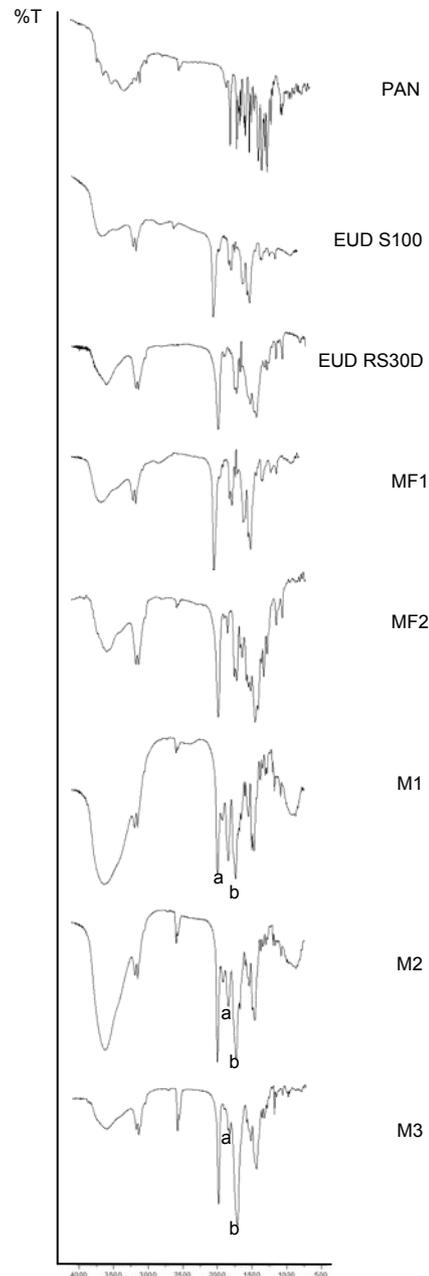


Figura 11. Espectros de absorção na região do infravermelho do PAN, dos polímeros EUD S100 e EUD RS30D, das misturas físicas binárias MF1 e MF2 e das formulações de micropartículas M1, M2, e M3, evidenciando as bandas novas em  $1560\text{ cm}^{-1}$  (a) e  $1450\text{ cm}^{-1}$  (b).

CILURZO e colaboradores (2003) prepararam sais sódico e potássico dos copolímeros Eudragit<sup>®</sup> L100 e S100 e observaram que quando houve ionização a banda de absorção do grupo ácido carboxílico ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) foi substituída por duas novas bandas, uma em  $1560$  e outra ao redor de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a vibração simétrica e antissimétrica da estrutura  $\text{-COO}^-$ . Para a preparação dos sais, uma solução aquosa de NaOH ou KOH 10% (m/m) foi adicionada a uma suspensão aquosa polimérica a 5% (m/m) e a mistura foi nebulizada em *spray-drier* para que ocorresse completa salificação. Percebe-se que a proporção utilizada pelos autores foi 1:2 (polímero:base). No presente trabalho, para preparação das micropartículas de PAN a proporção é 1:2,7 (p/p), bastante similar, o que permite considerar a hipótese da ocorrência de salificação polimérica.

Dentre as bandas novas identificadas nos espectros obtidos para as formulações de micropartículas, a banda em  $1560\text{ cm}^{-1}$  apresentou intensidade variada entre as diferentes formulações, sendo uma banda intensa e facilmente identificável em M1, de menor intensidade em M2 e de baixíssima intensidade em M3. A partir disso é possível constatar que a referida banda aparece principalmente nas formulações constituídas por EUD S100, o qual possui grupamentos OH livres para a formação de sal. As bandas novas não apareceram nas misturas físicas binárias, confirmando o descrito na literatura que a salificação só ocorre mediante o processo de *spray-drying*.

Cabe ressaltar que a salificação polimérica pode garantir características vantajosas na utilização destes polímeros. Nos estudos realizados por CILURZO e colaboradores (2003) testes de bioadesão *in vitro* foram realizados com os sais poliméricos de Eudragit<sup>®</sup>, constatando-se que as propriedades mucoadesivas foram maiores que aquelas obtidas com HPMC (ANOVA fator único,  $p < 0,05$ ), o qual é conhecido por suas características bioadesivas.

O aparecimento de novas bandas corrobora com o surgimento de novos picos observados nos termogramas de DSC, indicando a formação de novos compostos através do processo de *spray-drying*.

Pode-se ainda observar no espectro das micropartículas, especialmente nas formulações M1 e M2, notável aumento de intensidade na banda referente ao grupo O-H, o que pode ser atribuído à presença de água, uma vez que tais formulações apresentam NaOH, componente altamente higroscópico.

### 5.2.7 Determinação da área superficial e distribuição de tamanho de poros

A área superficial e a distribuição de tamanho de poros não puderam ser determinadas para a formulação M1. Isto se deve, provavelmente, à superfície extremamente lisa destas micropartículas, o que impossibilitou a adsorção do gás utilizado nesta determinação. Assim, a investigação não prosseguiu para as demais formulações, pois não seria possível estabelecer resultados comparativos.

### 5.2.8 Determinação do teor de água

A quantidade de água residual nos pós obtidos por *spray-drying* tem grande influência sob a sua estabilidade física, ao mesmo tempo que controla a magnitude das forças capilares responsáveis pela agregação das partículas (BOSQUILLON *et al.*, 2004).

Levando em consideração a relevância do conhecimento da umidade residual nos pós, os teores de água das micropartículas foram medidos através da técnica coulométrica de Karl Fisher para todas as formulações preparadas (incluindo as formulações sem fármaco). Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Teores de água das micropartículas.

Amostra	Teor de água (%)
M1	15,49
M2	17,49
M3	10,91
M1 branca	11,69
M2 branca	9,02
M3 branca	7,14

Teores de água em pós obtidos por *spray* são descritos na literatura. ALAMILLA-BELTRÁN e colaboradores (2005) procederam a secagem de uma solução de maltodextrina a 40 %, obtendo 4 % de umidade residual quando a temperatura do ar de secagem era de 170 °C e 3 % quando a temperatura utilizada foi de 200 °C. Valores ligeiramente mais elevados (4,6 a 5 %) foram obtidos por BOSQUILLON e colaboradores (2004) na preparação de partículas de albumina e dipalmitoilfosfatidilcolina, utilizando polióis como estabilizadores de proteínas. BILLON e colaboradores (2000), por sua vez, preparam micropartículas contendo

acetaminofeno, utilizando carboximetilcelulose sódica, associada a ácido tartárico ou oxálico, e celulose microcristalina, associada a polivinilpirrolidona. Os autores obtiveram valores de umidade residual de 6,1, 7,3 e 5,5 % para as três formulações, respectivamente.

Analisando os resultados obtidos para as micropartículas de PAN, observa-se que as formulações contendo o fármaco apresentaram valores de teores de água mais elevados em comparação com aquelas em que o mesmo estava ausente (brancas). Isto leva a crer que o método utilizado esteja determinando, além da umidade das micropartículas, a água associada ao fármaco, o qual se apresenta na forma sesquiidratada (ZUPANCIC *et al.*, 2005).

Ainda assim, todas as formulações, com ausência ou presença de fármaco, apresentaram teores de umidade relativamente mais elevados quando comparados aos descritos na literatura para o mesmo método de preparação, o que pode ser justificado pela alta higroscopicidade do hidróxido de sódio presente nas formulações, acrescido do fato de que não foi utilizado nenhum tipo de adjuvante de secagem.

## **5.2.9 Perfis de liberação *in vitro***

### **5.2.9.1 Célula de fluxo**

#### **5.2.9.1.1 Liberação em tampão fosfato pH 7,4**

A liberação do fármaco a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 foi investigada pela metodologia de dissolução *in vitro* utilizando célula de fluxo durante 180 minutos. As alíquotas provenientes da liberação foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, sendo analisadas por espectrofotometria na região do UV a 290 nm. A validação da metodologia analítica para a determinação de PAN nas alíquotas é apresentada no Anexo 2. Os perfis de dissolução em função do tempo são apresentados na Figura 12.

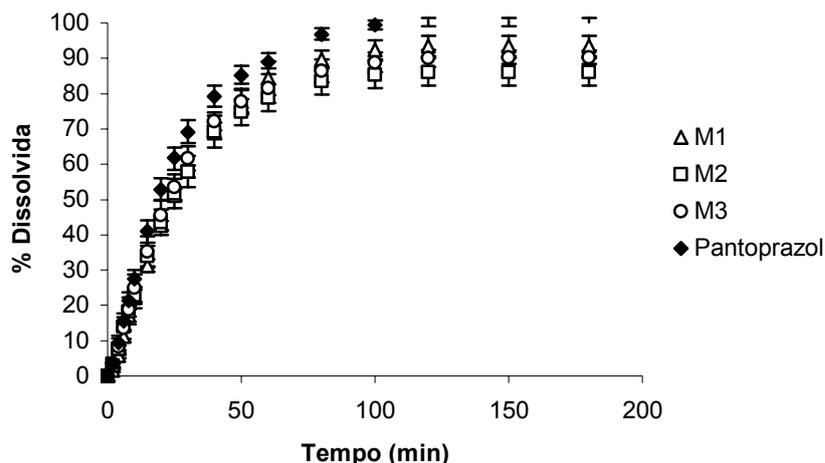


Figura 12. Perfis obtidos pela dissolução do PAN e micropartículas M1, M2 e M3 em tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo.

Observando o gráfico, pode-se constatar que a dissolução do PAN puro atingiu valor próximo de 100 % (100,26 %) em duas horas, enquanto a liberação a partir das micropartículas apresentou valores próximos a 90 % (93,48 %, 86,13 % e 90,32 % para M1, M2 e M3, respectivamente) neste mesmo tempo.

Valores altos são esperados para a liberação a partir da formulação M1, uma vez que no pH utilizado para os testes de dissolução o polímero EUD S100 dissolve-se completamente liberando o fármaco (KIBBE, 2000).

A formulação M3, constituída por EUD RS30D, polímero com características de pouca permeabilidade a meios aquosos (KIBBE, 2000), diferentemente do esperado, não demonstrou capacidade em sustentar a liberação. Já a formulação M2, constituída pela mistura polimérica dos dois polímeros citados, apresentou uma liberação ligeiramente menor, o que pode estar relacionado ao formato diferenciado dessas partículas (esférico) em relação às outras duas.

A comparação entre os perfis de dissolução em tampão fosfato do fármaco puro e associado às micropartículas através dos fatores de similaridade ( $f_2$ ) e de diferença ( $f_1$ ) encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Fatores de diferença (f1) e fatores de similaridade (f2) para a dissolução do PAN puro e a partir das formulações de micropartículas M1, M2 e M3 em meio tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo.

<b>Formulações comparadas</b>	<b>Fator de diferença (f1)</b>	<b>Fator de similaridade (f2)</b>	<b>Conclusão</b>
PAN e M1	14,90	55,92	Similares
PAN e M2	14,39	55,56	Similares
PAN e M3	10,65	61,90	Similares
M1 e M2	4,63	75,82	Similares
M1 e M3	5,83	76,33	Similares
M2 e M3	4,16	80,49	Similares

Em todas as comparações realizadas, os valores de f2 mostraram-se superiores a 50, enquanto os valores de f1 apresentaram-se inferiores a 15, podendo-se concluir que todos os perfis obtidos pela dissolução do fármaco puro e associado às micropartículas assemelham-se entre si, de acordo com esta metodologia de análise (SHAH *et al.*, 1998).

A avaliação pela metodologia de eficiência de dissolução também foi realizada revelando valores de  $73,84 \pm 2,17$  % para M1,  $70,00 \pm 3,10$  % para M2 e  $72,82 \pm 2,17$  % para M3, enquanto que o PAN puro apresentou valor ligeiramente superior ( $82,57 \pm 2,15$  %). Estes valores, contrariamente àqueles obtidos com a metodologia f1/f2, apontam para diferenças significativas entre os perfis analisados em conjunto (ANOVA,  $\alpha=0,05$ ), conforme apresentado na Tabela 12. Quando comparados dois a dois, os perfis das micropartículas mostraram-se diferentes do fármaco puro, porém semelhantes entre si.

Tabela 12. ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) da eficiência de dissolução do PAN puro e a partir das formulações de micropartículas M1, M2 e M3 em meio tampão fosfato pH 7,4 utilizando célula de fluxo.

<b>Formulações comparadas</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>	<b>Conclusão</b>
PAN, M1, M2 e M3	10,44	4,07	Diferentes
PAN e M1	24,46		Diferentes
PAN e M2	33,20		Diferentes
PAN e M3	14,64		Diferentes
M1 e M2	3,08	7,71	Similares
M1 e M3	0,16		Similares
M2 e M3	0,98		Similares

### 5.2.9.1.2 Modelagem matemática dos perfis de liberação em tampão fosfato pH 7,4

A partir dos perfis de liberação obtidos pela dissolução do fármaco e das micropartículas em pH 7,4 utilizando célula de fluxo, foi realizado um estudo comparativo baseado na modelagem matemática destes perfis. A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 4) e biexponencial (Equação 5).

Em todos os casos, a modelagem foi realizada para os pontos experimentais até 120 minutos. Os pontos obtidos além dos tempos mencionados apresentaram concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico (Anexo 2).

Considerando o critério de seleção de modelo (MSC), o coeficiente de correlação, o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade, a equação monoexponencial mostrou-se a mais adequada para descrever os dados experimentais. No caso da formulação M1, isto está de acordo com a condição experimental de solubilidade do polímero no pH do meio, podendo-se considerar a dissolução como uma reação de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação ocorre proporcionalmente à quantidade de fármaco presente no sistema (SHARGEL, 2005). As formulações M2 e M3, constituídas por quantidades variadas de EUD RS30D, não demonstraram capacidade em sustentar a liberação, como já discutido, apresentando também uma dissolução de primeira ordem.

A modelagem matemática pelo programa Micromath Scientist<sup>®</sup> forneceu as constantes cinéticas observadas  $k$  e o coeficiente de correlação  $r$  (Tabela 13). O ajuste dos pontos experimentais ao modelo especificado é apresentado na Figura 13.

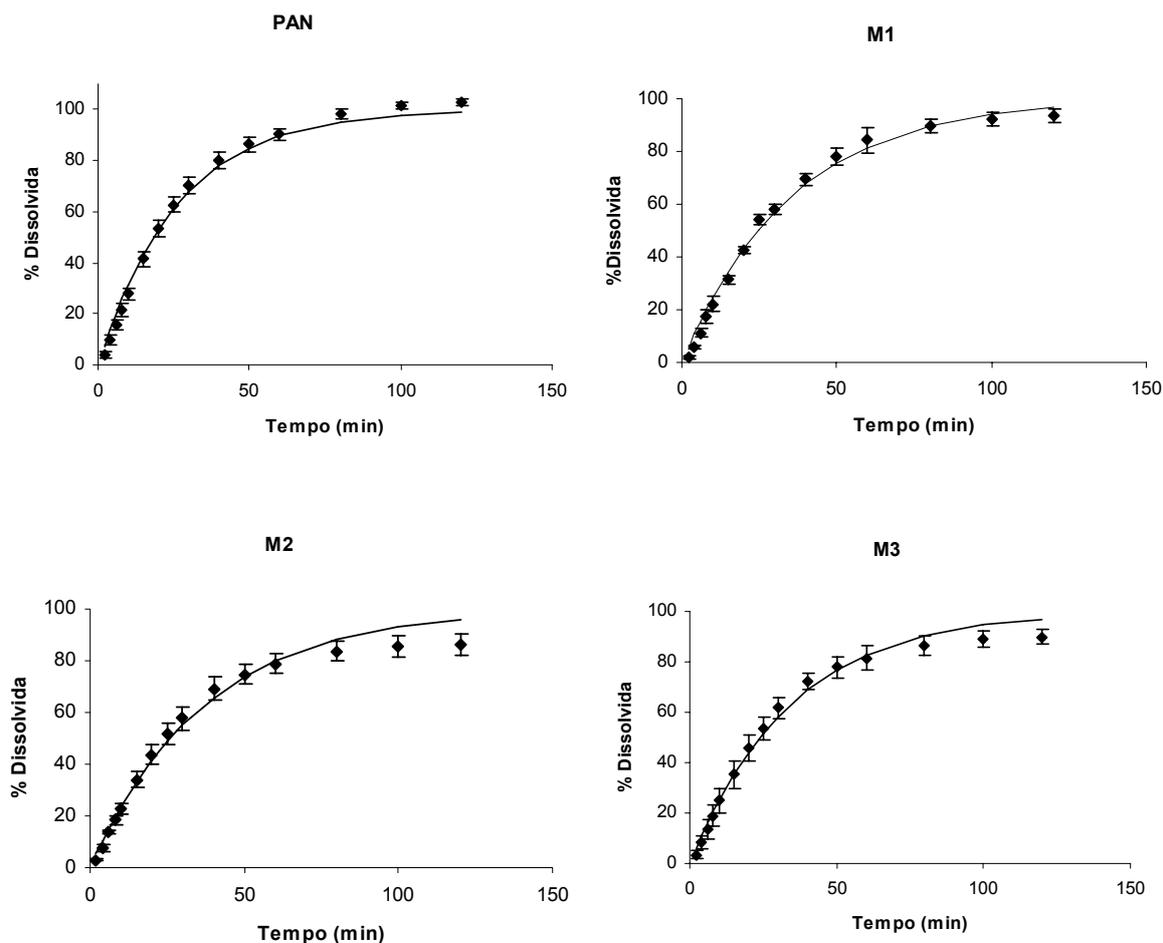


Figura 13. Modelagem da equação monoexponencial para a curva média da dissolução de PAN puro e associado às micropartículas M1, M2 e M3.

Tabela 13. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução em tampão fosfato pH 7,4 de PAN puro e associado a micropartículas M1, M2 e M3 utilizando a equação monoexponencial.

	<b>K (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>MSC</b>	<b>r</b>
<b>PAN</b>	0,03773 ± 0,00349	4,52575 a 4,74607	0,99934 a 0,99948
<b>M1</b>	0,02788 ± 0,00132	4,24645 a 5,11982	0,99581 a 0,99785
<b>M2</b>	0,02672 ± 0,00290	3,04848 a 4,49894	0,98704 a 0,99563
<b>M3</b>	0,02932 ± 0,00449	3,81323 a 4,92821	0,99125 a 0,99758

Os valores de K representam a média mais ou menos o desvio padrão referente à triplicata do lote.

A velocidade de dissolução variou conforme a formulação estudada e, embora os valores sejam muito próximos, pequenas variações podem ocasionar diferenças importantes na dissolução *in vivo*, interferindo também na absorção (OBACH, 2002). As constantes observadas  $k$ , relativas à velocidade do processo de dissolução, foram comparadas para as diferentes formulações e o fármaco puro através da metodologia de ANOVA com  $\alpha=0,05$  (Tabela 14). Estes valores apontam para diferenças significativas entre as velocidades quando analisadas em conjunto. Quando comparadas duas a duas, as velocidades de M1 e M2 mostraram-se diferentes do fármaco puro, sendo semelhantes entre si. Apenas os resultados referentes a velocidade de M3 foram inconclusivos, uma vez que M3 mostrou-se semelhante ao fármaco puro e às micropartículas M1 e M2.

Tabela 14. ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) da velocidade de dissolução ( $k$ ) de PAN puro e das formulações de micropartículas M1, M2 e M3.

<b>Velocidades comparadas (k)</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>	<b>Conclusão</b>
PAN, M1, M2 e M3	7,05	4,07	Diferentes
PAN e M1	20,96		Diferentes
PAN e M2	17,67		Diferentes
PAN e M3	6,58	7,71	Similares
M1 e M2	0,39		Similares
M1 e M3	0,29		Similares
M2 e M3	0,45		Similares

A menor velocidade foi verificada para a formulação M2, fato este que pode dever-se a uma menor área superficial disponível ao acesso do meio, já que estas partículas não apresentam as reentrâncias observadas em M1 e M3. Também pode ser considerada a hipótese de o fármaco estar associado de forma diferenciada às micropartículas. Além de uma fração adsorvida, outras frações podem estar associadas mais internamente à rede polimérica.

O tempo de meia-vida da liberação foi calculado através da Equação 10. Os valores foram definidos como 18,37 minutos para o PAN puro, 24,86 minutos para M1, 25,93 minutos para M2 e 23,63 minutos para M3. Assim, o maior tempo de meia-vida verificado para M2 demonstrou que a liberação do fármaco é 1,04 vezes mais lenta que M1, 1,10 vezes mais lenta que M3 e 1,41 vezes mais lenta que o fármaco puro.

A modelagem matemática foi realizada também pelo modelo de Lei das Potências (Equação 11), com a finalidade de elucidar os mecanismos de liberação do PAN a partir das micropartículas M1, M2 e M3, caracterizados pelo parâmetro  $n$  obtido com a aplicação deste modelo.

Para todas as formulações os pontos experimentais foram modelados até 120 minutos. Os valores de  $r$ , MSC e do parâmetro  $n$  obtidos são apresentados na Tabela 15, enquanto os gráficos obtidos para os perfis médios são apresentados na Figura 14.

Tabela 15. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução em tampão fosfato pH 7,4 das micropartículas M1, M2 e M3 utilizando o modelo de Lei das Potências.

	<b>n</b>	<b>MSC</b>	<b>r</b>
<b>M1</b>	0,54367 ± 0,00761	2,30190 a 2,55308	0,96432 a 0,97235
<b>M2</b>	0,49915 ± 0,03300	2,11806 a 2,46257	0,95623 a 0,96938
<b>M3</b>	0,49824 ± 0,03707	2,23055 a 2,27980	0,96144 a 0,96627

Os valores de  $n$  representam a média mais ou menos o desvio padrão referente à triplicata do lote.

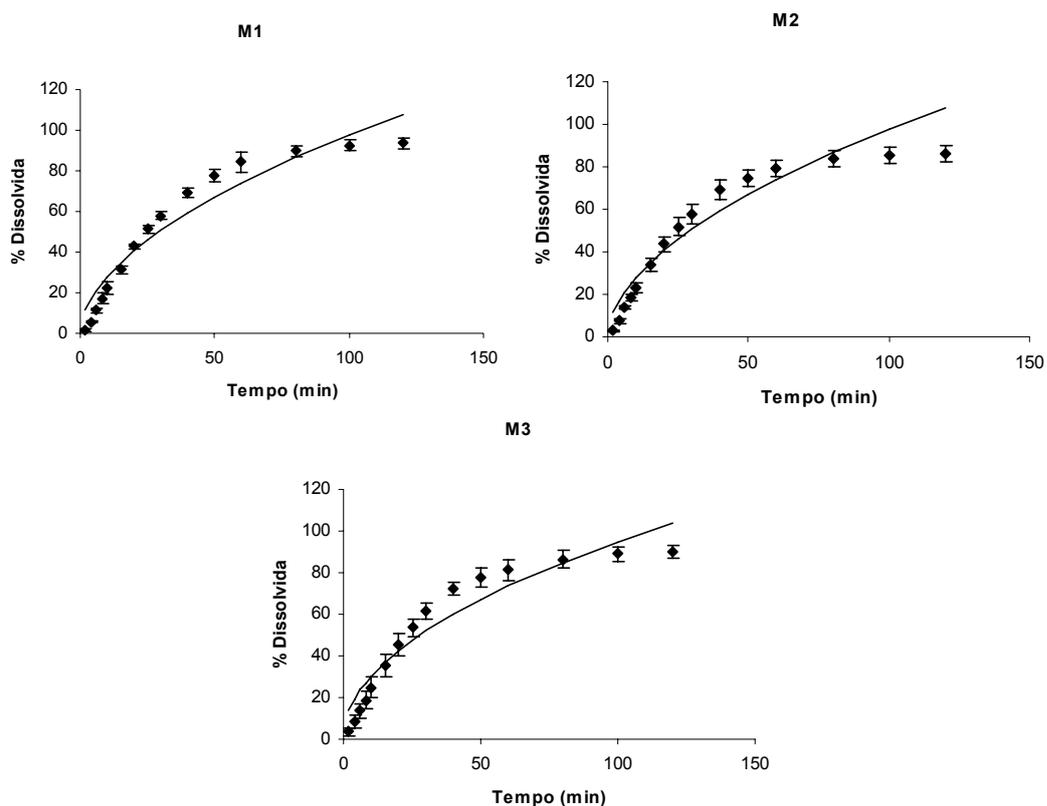


Figura 14. Ajuste dos dados experimentais da curva média da liberação de PAN associado às micropartículas M1, M2 e M3 ao modelo de Lei da Potência.

Coeficientes de correlação de 0,99 indicam ajuste satisfatório dos dados ao modelo em questão. Para todos os sistemas estudados observou-se valores de  $r$  próximos de 0,96, situando-se relativamente próximos ao valor de referência, porém permitindo questionar a adequabilidade dos valores experimentais ao modelo.

Os expoentes de liberação obtidos para M1, M2 e M3 apresentaram valores superiores a 0,43, indicando que a liberação do fármaco é governada por processos de difusão e inchamento do sistema (transporte anômalo) (SIEPMANN e PEPPAS, 2001). No entanto, o mecanismo sugerido pelo modelo pode ser descartado, ao menos para a formulação M1, uma vez que é sabido que o polímero EUD S100 solubiliza-se no pH do experimento. Desse modo, a liberação do fármaco a partir da formulação M1 (constituída exclusivamente por EUD S100) deve ocorrer principalmente por uma desorganização, com posterior dissolução, da matriz polimérica. Para as formulações constituídas pelo polímero EUD RS30D (M2 e M3) o

mecanismo proposto pela modelagem poderia ser adequado, contudo os valores de  $r$  e MSC não se mostraram superiores aos valores encontrados para a formulação M1, o que deixa dúvidas quanto à autenticidade dos resultados obtidos para os parâmetros e/ou a adequabilidade ao modelo aplicado.

### 5.2.9.1.3 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido

A liberação do fármaco a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 foi investigada após a passagem por um estágio ácido constituído de solução de HCl 0,1 M pH 1,2, em célula de fluxo, durante 180 ou 360 minutos, este último somente no caso da formulação M2. Este estágio mimetiza a passagem gástrica e tem como objetivo avaliar a gastrorresistência das micropartículas em estudo, importante pelo fato do PAN degradar rapidamente em meio ácido. Os perfis de dissolução em função do tempo são apresentados na Figura 15.

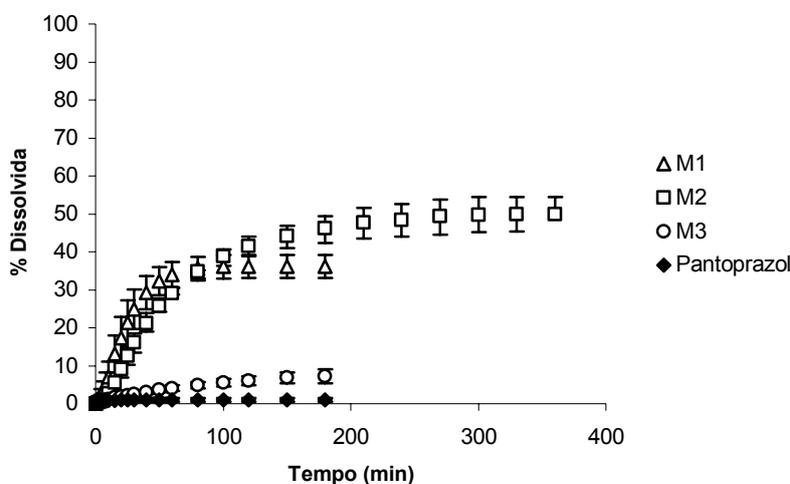


Figura 15. Perfis obtidos pela dissolução do fármaco e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido (HCl 0,1 M) utilizando célula de fluxo.

O ensaio de dissolução realizado anteriormente, utilizando tampão fosfato pH 7,4 como único meio de dissolução, além de permitir a realização de análises relativas aos perfis de liberação, é útil como controle da estabilidade do PAN após a preparação e durante os ensaios de dissolução *in vitro*. Desse modo, pode-se garantir

que a degradação do fármaco determinada pelo estágio ácido deve-se unicamente a este fator, não estando relacionada com estágios prévios de preparação (secagem por aspersão), nem com o meio de dissolução a partir do qual as alíquotas são analisadas.

Assim, observando o gráfico, pode-se constatar que as formulações M1 e M2 mostraram-se aptas para proteger o PAN em meio ácido, mantendo  $36,17 \pm 3,06$  % do fármaco estável, no caso de M1, e  $49,96 \pm 4,50$  %, no caso de M2. O fármaco puro, utilizado como controle para avaliar esta proteção, permaneceu  $0,95 \pm 0,50$  % estável após o estágio ácido. Nota-se que as partículas que apresentaram EUD S100 em sua constituição, foram capazes de proteger o PAN da degradação ácida, dada a característica gastrorresistente deste polímero (KIBBE, 2000). O fato da formulação M2 ter garantido maior proteção ao fármaco pode ser atribuído à sua constituição de mistura polimérica EUD S100/ EUD RS30D, o primeiro polímero sendo gastrorresistente e o segundo com pouca permeabilidade à água (ESPOSITO *et al.*, 2002). Pode-se considerar ainda a influência do formato dessas partículas (esférico), hipoteticamente com menor área superficial em relação à M1, o que implica em menor área de contato com o meio ácido, levando à menor degradação do fármaco carregado.

A formulação M3, por sua vez, constituída unicamente por EUD RS30D, não demonstrou capacidade em proteger o PAN em ambiente ácido (apenas  $7,18 \pm 1,85$  % do fármaco permaneceu estável), demonstrando a ineficácia deste polímero para este fim, especialmente quando utilizado como único constituinte polimérico da formulação.

A proteção ao fármaco em meio ácido, avaliada pela quantidade de PAN que permaneceu estável, foi comparada para as diferentes formulações e o fármaco puro através da metodologia de ANOVA com  $\alpha=0,05$  (Tabela 16). Estes valores apontam para diferenças significativas entre a proteção conferida pelas diferentes formulações, tendo o fármaco puro como controle.

Tabela 16. ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) da proteção do fármaco em meio ácido para PAN puro (controle) e para as formulações de micropartículas M1, M2 e M3 utilizando célula de fluxo.

<b>Formulações comparadas</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>	<b>Conclusão</b>
PAN, M1, M2 e M3	164,61	4,07	Diferentes
PAN e M1	259,87		Diferentes
PAN e M2	350,96		Diferentes
PAN e M3	21,66	7,71	Diferentes
M1 e M2	16,60		Diferentes
M1 e M3	131,24		Diferentes
M2 e M3	215,96		Diferentes

### 5.2.9.2 Dissolutor

#### 5.2.9.2.1 Liberação em tampão fosfato pH 7,4

A liberação do fármaco a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 foi investigada, adicionalmente, pela metodologia de dissolução *in vitro* utilizando dissolutor. As micropartículas foram colocadas diretamente nas cestas (USP I) e a dissolução foi avaliada durante 180 minutos. As alíquotas provenientes da liberação foram coletadas automaticamente, nos mesmos intervalos de tempo utilizados para a célula de fluxo, sendo analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta a 290 nm. Os perfis de dissolução obtidos são apresentados na Figura 16 e representam a média de três determinações.

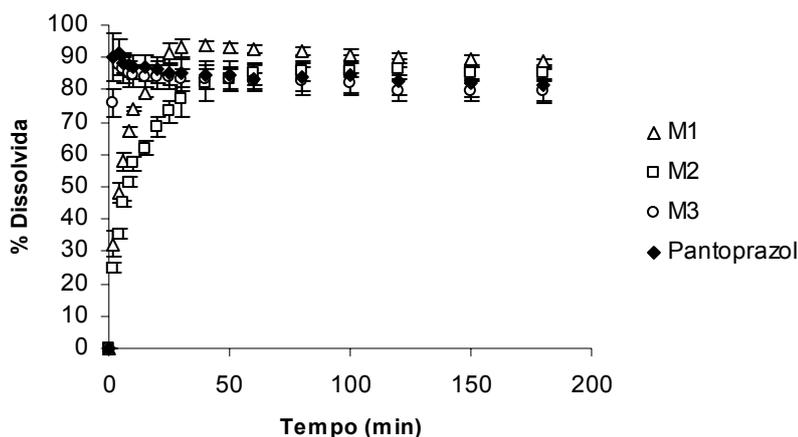


Figura 16. Perfis obtidos pela dissolução do PAN e micropartículas M1, M2 e M3 em tampão fosfato pH 7,4 utilizando dissolutor.

Observando o gráfico, pode-se constatar que o PAN puro apresentou uma dissolução imediata, com valor máximo de  $91,09 \pm 4,30$  % já nos primeiros 4 minutos. A liberação a partir de M3 foi visualmente semelhante à do PAN puro, com valor máximo de  $87,69 \pm 4,72$  % também nos primeiros 4 minutos, reiterando a ineficiência desta formulação para o controle da liberação. As formulações M1 e M2, por sua vez, demonstraram uma liberação mais lenta, em comparação com PAN puro e M3, apresentando valores de  $93,54 \pm 1,62$  % em 40 minutos e  $86,44 \pm 1,95$  % em 120 minutos, respectivamente.

Estes achados confirmam a hipótese da liberação da formulação M2 estar relacionada ao seu formato esférico, hipoteticamente com menor área superficial, bem como à eficiência da mistura polimérica em reduzir a velocidade de dissolução.

A comparação entre os perfis de dissolução através da metodologia f1/f2 não se fez possível, uma vez que este método deve ser aplicado para os pontos experimentais até 85% de dissolução (SHAH *et al.*, 1998), o que corresponderia a um único ponto para M3, não havendo nenhum ponto para o perfil do PAN. Apenas as formulações M1 e M3 poderiam ser comparadas, mas esta comparação não seria vantajosa sem os valores correspondentes à liberação do fármaco puro. Do mesmo

modo, a ausência de pontos experimentais descrevendo perfis para PAN e M3 impediu a comparação por meio de modelagem matemática.

Assim mesmo, a simples análise exploratória dos dados provenientes das liberações de PAN a partir das micropartículas M1, M2 e M3, permite observar diferenças entre as duas metodologias (célula de fluxo e dissolutor), o que chama a atenção para o fato de que resultados experimentais não devam ser considerados de maneira absoluta, mas sim de forma comparativa.

#### 5.2.9.2 Liberação em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido

A liberação do fármaco a partir das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 foi investigada após a passagem por um estágio ácido constituído de solução de HCl 0,1 M pH 1,2, em dissolutor, durante 180 minutos. Como já mencionado, este estágio mimetiza a passagem gástrica, tendo como objetivo avaliar a gastrorresistência das micropartículas em estudo. Ainda, a realização do teste de dissolução unicamente em tampão fosfato pH 7,4, demonstrou a estabilidade do fármaco neste meio de dissolução, garantindo que os teores de fármaco observados após o estágio constituído por HCl 0,1 M devam-se apenas à degradação ácida. Os perfis de dissolução em função do tempo são apresentados na Figura 17 e representam a média de três determinações.

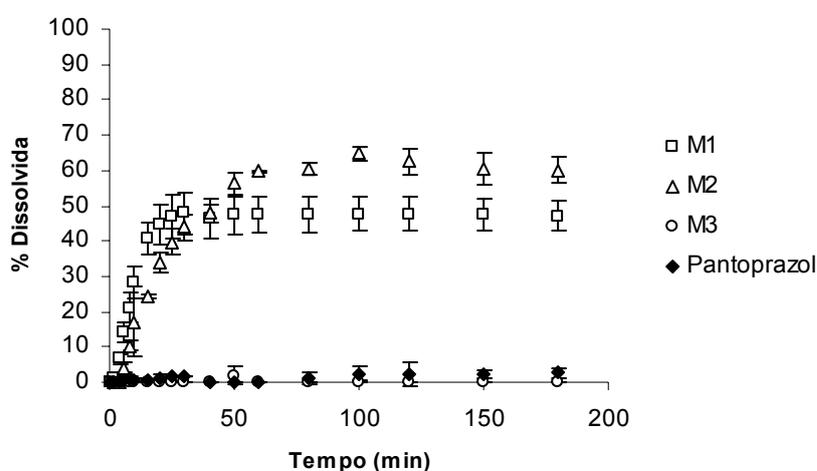


Figura 17. Perfis obtidos pela dissolução do fármaco e micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 após estágio ácido (HCl 0,1 M) utilizando dissolutor.

Pela observação do gráfico, pode-se perceber que as formulações M1 e M2, como já constatado pela metodologia de célula de fluxo, mostraram-se adequadas para proteger o PAN em meio ácido, mantendo  $48,01 \pm 5,93$  % do fármaco estável, no caso de M1, e  $64,91 \pm 1,96$  %, no caso de M2. O fármaco puro, utilizado como controle para avaliar esta proteção, permaneceu  $2,74 \pm 1,38$  % estável após o estágio ácido. Isto reitera o observado no experimento anterior, de que as partículas que apresentaram EUD S100 em sua constituição, foram capazes de proteger o PAN da degradação ácida. Novamente o fato da formulação M2 ter garantido maior proteção ao fármaco, pode ser atribuído a sua constituição de mistura polimérica, bem como a influência do formato esférico das partículas.

Semelhantemente aos resultados do experimento de célula de fluxo, a formulação M3 não demonstrou capacidade em proteger o PAN em ambiente ácido (apenas  $1,87 \pm 2,66$  % do fármaco permaneceu estável), demonstrando a ineficácia deste polímero para este fim, especialmente quando utilizado como único constituinte polimérico da formulação.

A capacidade de estabilização em meio ácido foi expressa pela quantidade de PAN que permaneceu estável e foi comparada para as diferentes formulações e o fármaco puro através da metodologia de ANOVA com  $\alpha=0,05$ . Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) da proteção do fármaco em meio ácido para PAN puro (controle) e para as formulações de micropartículas M1, M2 e M3 utilizando dissolutor.

<b>Formulações comparadas</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabelado</b>	<b>Conclusão</b>
PAN, M1, M2 e M3	129,61	5,41	Diferentes
PAN e M1	102,11	10,13	Diferentes
PAN e M2	1347,54	18,51	Diferentes
PAN e M3	0,17	18,51	Semelhantes
M1 e M2	13,87	10,13	Diferentes
M1 e M3	99,10	10,13	Diferentes
M2 e M3	733,74	18,51	Diferentes

Os valores obtidos apontam para diferenças significativas entre a proteção conferida pelas formulações M1 e M2, em comparação com o fármaco puro, mostrando ainda que as duas formulações diferem entre si. Apenas a formulação M3

apresentou-se semelhante ao PAN, o que reafirma a sua ineficácia na proteção do mesmo.

No experimento de gastrorresistência *in vitro* também é possível observar diferenças entre as duas metodologias de análise, reiterando que os resultados obtidos devam ser analisados de maneira comparativa. A Tabela 18 apresenta os valores da proteção ao meio ácido (em termos de % de fármaco que permaneceu estável) conferida ao PAN pelas micropartículas, de acordo com as diferentes metodologias de análise empregadas.

Tabela 18. Porcentagem de PAN que permaneceu estável após passagem pelo estágio ácido em célula de fluxo e dissolutor.

	<b>Célula de Fluxo</b>	<b>Dissolutor</b>
PAN puro	0,95 ± 0,50%	2,34 ± 1,92%
M1	36,17 ± 3,06%	48,01 ± 5,93%
M2	49,96 ± 4,50%	64,91 ± 1,96%,
M3	7,18 ± 1,85%	1,87 ± 2,66%

### 5.2.10 Avaliação da ação antiulcerativa das micropartículas

A avaliação da atividade anti-ulcerosa das micropartículas foi realizada pela indução de úlceras gástricas em ratos Wistar, utilizando etanol p.a. por via oral seguido de tratamento com solução de bicarbonato de sódio (BIC), PAN ou as formulações de micropartículas M1 e M2. A solução de BIC foi utilizada como controle, em substituição à água pura, pelo fato desta substância apresentar elevado pH em solução, semelhantemente ao PAN. Assim, é possível esclarecer se a ação antiulcerativa do PAN deve-se a sua atividade farmacológica ou ao seu pH elevado quando em solução. A formulação M3 não foi avaliada *in vivo* por ter apresentado resultados insatisfatórios quanto a gastrorresistência *in vitro*.

Os parâmetros avaliados, que compreendem a área total do estômago, a área ulcerada, os índices lesionais calculados a partir das duas primeiras (Equações 12 e 13), além do índice lesional médio de cada grupo, são apresentados na Tabela 19. As médias dos índices lesionais, com os respectivos desvios padrões, também podem ser visualizados na Figura 18.

Tabela 19. Valores de área total, área ulcerada e índices lesionais obtidos para os diferentes grupos.

Grupo	Tratamento após etanol	Área total do estômago (mm <sup>2</sup> )	Área ulcerada (mm <sup>2</sup> )	Índice lesional	Média ± DP
1	BIC	1212,62	23,98	0,20	0,42 ± 0,17
		1241,95	1,56	0,51	
		1408,73	12,04	0,52	
		1509,79	89,57	0,59	
		1497,78	40,98	0,27	
2	PAN	842,02	18,72	0,22	0,31 ± 0,13
		1241,93	36,17	0,29	
		1089,88	27,14	0,25	
		1371,20	36,67	0,27	
		1434,21	76,88	0,54	
3	M1	1390,98	7,21	0,05	0,10 ± 0,05
		1265,26	16,24	0,13	
		1137,21	10,20	0,09	
		1180,10	6,56	0,06	
		1465,83	24,32	0,17	
4	M2	1423,95	24,43	0,17	0,15 ± 0,08
		1428,90	18,01	0,13	
		1231,10	5,96	0,05	
		1479,80	38,07	0,26	
		1117,26	16,86	0,15	

DP = desvio padrão referente a média de cinco determinações

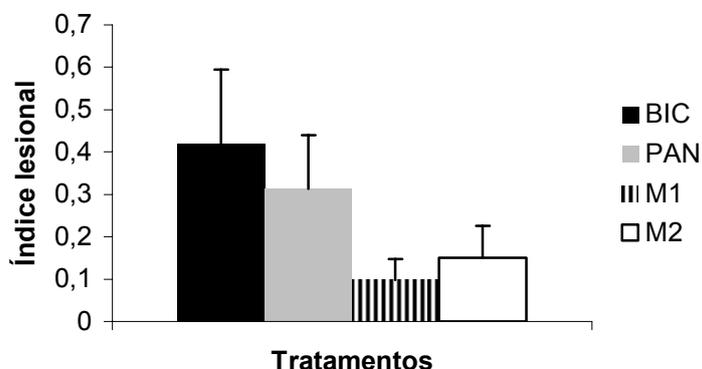


Figura 18. Índices lesionais obtidos para os grupos tratados com BIC, PAN ou micropartículas M1 ou M2.

O gráfico mostra com clareza valores elevados de índices lesionais nos grupos controle (bicarbonato de sódio ou PAN) e valores mais baixos para os grupos tratados com as formulações de micropartículas. Contudo, em uma observação mais atenta, é possível notar a sobreposição dos desvios referentes aos grupos PAN e M2, o que levanta a hipótese de não serem significativamente diferentes.

Para o esclarecimento desta questão, os índices lesionais foram comparados pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Walis, realizando-se comparações dois a dois pelo método de Student-Newman-Keuls (RAFFIN *et al.*, 2003). Os resultados do teste são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Comparação não-paramétrica pelo método Student-Newman-Keuls dos índices lesionais obtidos para bicarbonato de sódio, PAN e as formulações de micropartículas M1 e M2.

<b>Grupos comparados</b>	<b>P</b>	<b>Diferença (P&lt;0,05)</b>
Bicarbonato e PAN	0,165	Não-significativa
Bicarbonato e M1	0,003	Significativa
Bicarbonato e M2	0,006	Significativa
PAN e M1	0,026	Significativa
PAN e M2	0,043	Significativa
M1 e M2	0,486	Não-significativa

O método de Student-Newman-Keuls demonstrou que ambas as formulações testadas são significativamente diferentes dos controles (BIC e PAN), não diferindo entre si quanto a ação anti-ulcerosa. Os resultados obtidos demonstram a efetividade das micropartículas em proteger o fármaco durante sua passagem pelo ambiente ácido do estômago, permitindo que o mesmo alcance o lúmen intestinal e seja absorvido em quantidade suficiente para expressar sua ação farmacológica. Outra constatação é que a inibição da ulceração deve-se à atividade farmacológica do PAN, descartando-se a hipótese da influência do pH, demonstrado pela ineficiência do BIC em proteger a mucosa estomacal da agressão ácida.

Na Figura 19 são apresentadas imagens da mucosa estomacal de animais pertencentes a diferentes grupos de tratamentos. No tratamento com BIC ou PAN, as úlceras são extensas podendo ser facilmente visualizadas. Já no tratamento com as micropartículas M1 ou M2, as úlceras são menores, apresentando-se em menor quantidade.

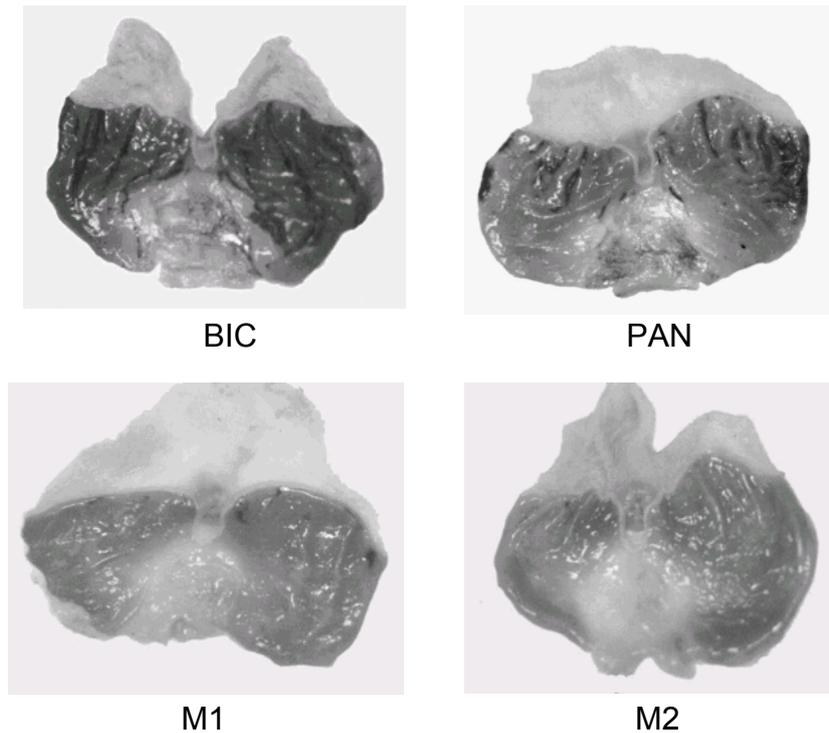


Figura 19. Imagens da mucosa estomacal de ratos tratados com BIC, PAN, formulação M1 ou formulação M2.

#### 4.2.2.13 Avaliação da permeação de PAN carregado por micropartículas no epitélio intestinal de ratos

Após constatar, por meio das investigações *in vitro* e *in vivo*, a efetividade das micropartículas M1 e M2 em proteger o PAN no ambiente ácido do estômago, entendeu-se como relevante a avaliação *ex vivo* da permeação do PAN carregado pelas micropartículas através do epitélio intestinal, uma vez que este é o primordial sítio de absorção do fármaco.

Para o ensaio de absorção intestinal, foram utilizados segmentos intestinais invertidos de ratos Wistar, que foram incubados em meio de cultura tecidual contendo PAN puro ou as formulações de micropartículas em estudo. Os segmentos intestinais foram coletados em intervalos de tempos pré-determinados, tendo o líquido interno analisado por CLAE quanto à concentração de fármaco presente. O experimento foi realizado em triplicata para o fármaco puro e para cada uma das

formulações. A partir dos dados obtidos, foi possível construir um perfil de absorção em função do tempo, o qual é apresentado na Figura 20.

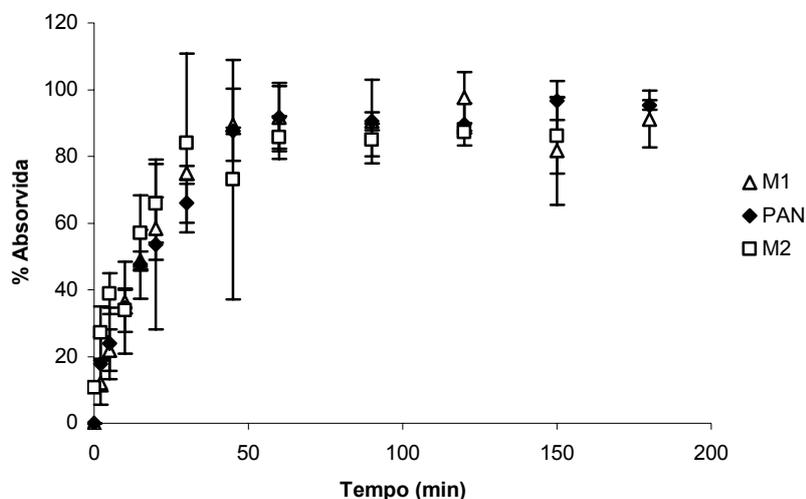


Figura 20. Perfis de absorção obtidos para PAN puro e carreado pelas micropartículas M1 e M2.

A análise visual do gráfico permite inferir semelhança entre os perfis obtidos para as diferentes formulações e o fármaco puro. Os valores individuais reforçam a semelhança: o PAN apresentou valor máximo de absorção de  $96,73 \pm 5,85$  % em 150 minutos, M1 alcançou  $97,59 \pm 7,69$  % em 120 minutos e M2, por sua vez, chegou a  $87,33 \pm 0,40$  % em 150 minutos.

Uma comparação mais criteriosa também foi realizada através da modelagem matemática dos perfis de absorção, segundo as equações monoexponencial e biexponencial (Equações 8 e 9, respectivamente). A modelagem foi realizada para os pontos experimentais até 60 minutos no caso do PAN, até 120 minutos no caso de M1 e até 90 minutos para M2, tempos além dos quais não foram observados acréscimos nas quantidades absorvidas.

Considerando o critério de seleção de modelo (MSC), o coeficiente de correlação, o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade, a equação monoexponencial mostrou-se a mais adequada para descrever os dados experimentais. Este achado é sustentado por

COSTA e LOBO (2001), quando afirmam que este modelo é adequado para descrever processos de absorção e eliminação de fármacos.

A modelagem matemática pelo programa Micromath Scientist<sup>®</sup> forneceu as constantes cinéticas observadas  $k$  e o coeficiente de correlação  $r$  (Tabela 21). O ajuste dos pontos experimentais ao modelo calculado é apresentado na Figura 21.

Tabela 21. Parâmetros da modelagem matemática da absorção intestinal *ex vivo* de PAN puro e associado a micropartículas M1 e M2, utilizando a equação monoexponencial.

	$K$ ( $\text{min}^{-1}$ )	MSC	$r$
<b>PAN</b>	$0,04393 \pm 0,01678$	2,24974 a 3,14015	0,98215 a 0,98238
<b>M1</b>	$0,03997 \pm 0,00510$	2,46710 a 3,31992	0,98162 a 0,98903
<b>M2</b>	$0,03683 \pm 0,01996$	0,88291 a 2,05828	0,90911 a 0,95238

Os valores de  $K$  representam a média mais ou menos o desvio padrão referente à triplicata.

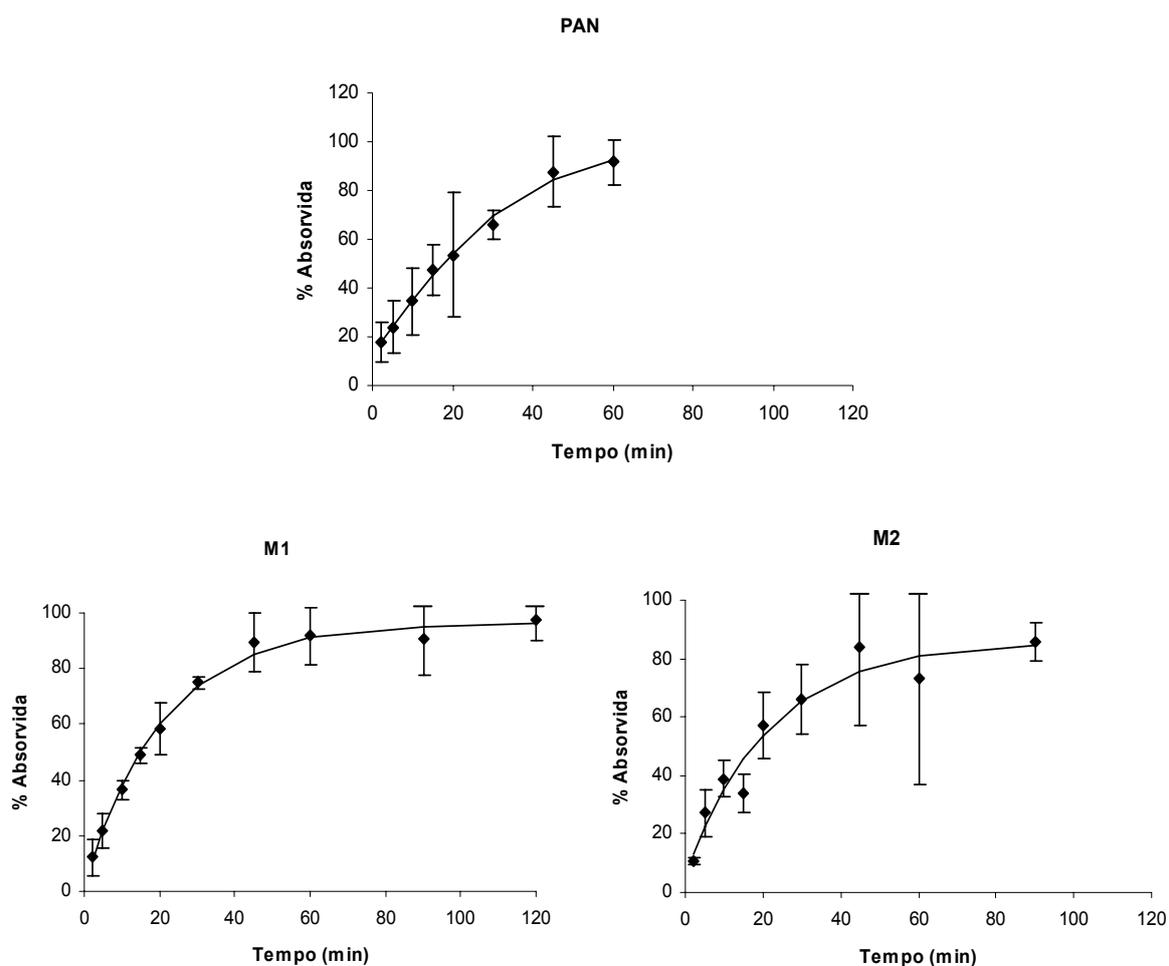


Figura 21. Modelagem da equação monoexponencial para curva média da absorção de PAN puro e associado às micropartículas M1e M2.

As constantes observadas  $k$ , relativas à velocidade do processo de absorção, foram comparadas para as formulações M1 e M2 e o fármaco puro através da metodologia de ANOVA, com  $\alpha=0,05$ . O valor de F obtido foi 0,14, indicando que as velocidades comparadas não são significativamente diferentes ( $F$  crítico = 6,94). Disto pode-se concluir pela similaridade da absorção do PAN carreado pelas micropartículas em relação ao fármaco puro.

O tempo de meia-vida da absorção foi calculado através da Equação 10. Os valores foram definidos como 15,77 minutos para o PAN puro, 17,34 minutos para M1 e 18,82 minutos para M2, evidenciando, também por este parâmetro, a similaridade entre os perfis.







- ❖ As micropartículas de PAN preparadas por *spray-drying* apresentaram rendimento ponderal bruto de  $56 \pm 2 \%$ ,  $58 \pm 6 \%$  e  $43 \pm 6 \%$  para M1, M2 e M3, respectivamente. O teor de fármaco situou-se na faixa de 136 a 137,6 mg/g de pó e as taxas de recuperação variaram de 93,0 a 100,7% de acordo com a formulação preparada.
- ❖ A avaliação morfológica através de MEV evidenciou a existência de um sistema microparticulado para as três formulações, possibilitando a constatação de diferenças no formato das partículas que apresentaram-se semelhante a hemáceas no caso de M1 e M3, ou esféricas, no caso de M2. Características de superfície também variaram entre lisa (M1) e rugosa (M2 e M3), atribuindo-se esta última à utilização do polímero EUD RS30D. As imagens da microscopia óptica permitiram constatar evidências da encapsulação do fármaco nas micropartículas.
- ❖ A análise granulométrica revelou diâmetros em torno de 10  $\mu\text{m}$  e valores de SPAN inferiores a 2 para M1 e M2, caracterizando estas partículas como de potencial aplicação para a administração oral. Diferentemente, M3 apresentou diâmetro médio de 51  $\mu\text{m}$  e os valores de SPAN indicaram maior polidispersão das partículas em relação às outras duas formulações.
- ❖ Os termogramas de DSC e os espectros de infravermelho demonstraram evidências da solubilização ou dispersão molecular do fármaco pelo polímero. O aparecimento de novos eventos térmicos nos termogramas e novas bandas nos espectros foi indicativo de salificação dos polímeros após o processo de *spray-drying*, fato que pode garantir maior mucoadesividade, sendo vantajoso para sistemas de administração oral como a micropartículas preparadas neste estudo.
- ❖ A técnica coulométrica de Karl Fischer demonstrou que as formulações contendo o fármaco apresentaram teores de água mais elevados em comparação com àquelas em que o mesmo estava ausente, fato atribuído à forma sesquidratada do PAN utilizado na preparação das micropartículas. Ainda assim os valores de umidade residual encontrados (7,14 a 17,9%) mostraram-se elevados, o que se deve à presença do NaOH, componente altamente higroscópico, em todas as formulações.

- ❖ Os perfis de liberação *in vitro* realizado em célula de fluxo demonstraram liberação de aproximadamente 90% do PAN a partir das micropartículas em 120 minutos. A metodologia  $f_1/f_2$  demonstrou similaridade entre os perfis do fármaco e das três formulações. A metodologia de eficiência de dissolução, por sua vez, mostrou que o valor determinado para o perfil do fármaco puro foi significativamente maior (ANOVA,  $\alpha=0,05$ ) que aqueles atribuídos aos das micropartículas, sendo que estas últimas apresentaram perfis semelhantes entre si.
- ❖ A modelagem matemática dos perfis de liberação demonstrou que o modelo monoexponencial mostrou-se o mais adequado para descrever os dados experimentais, tanto para o fármaco quanto para as micropartículas. As constantes de velocidade do processo de dissolução apresentaram valores de mesma ordem de magnitude, sendo que M1 e M2 mostraram-se semelhantes entre si e diferentes do fármaco puro (ANOVA,  $\alpha=0,05$ ). Os dados relativos à formulação M3 foram inconclusivos por assemelharem-se aos do fármaco puro e àqueles das micropartículas M1 e M2. O cálculo do tempo de meia-vida mostrou valores mais elevados para a formulação M2 em comparação com as demais.
- ❖ Diferentemente dos resultados obtidos pela metodologia de célula de fluxo, os perfis de dissolução *in vitro* utilizando dissolutor demonstraram dissolução imediata do PAN puro e a partir da formulação M3, apresentando valores em torno de 90 % em 4 minutos. As formulações M1 e M2 demonstraram percentagens semelhantes em 40 e 120 minutos, respectivamente. A partir disso pode-se concluir que os resultados obtidos a partir de diferentes metodologias não devem ser considerados de maneira absoluta, mas sim de forma comparativa.
- ❖ O ensaio de gastrorresistência *in vitro* realizado em célula de fluxo evidenciou a eficiência das formulações M1 e M2 em proteger o PAN em meio ácido, mantendo  $36,17 \pm 3,06$  % e  $49,96 \pm 4,50$  % do fármaco estável, respectivamente. Em contrapartida, a formulação M3 não demonstrou eficácia na proteção, uma vez que apenas  $7,18 \pm 1,85$  % do fármaco permaneceu estável, assemelhando-se aos valores obtidos com o fármaco puro ( $0,95 \pm 0,56$  %). O mesmo ensaio realizado em dissolutor confirmou estes resultados, apresentando valores mais

elevados para a proteção conferida por M1 e M2 ( $48,01 \pm 5,93 \%$  e  $64,91 \pm 1,96 \%$ , respectivamente). Isto demonstrou a capacidade das partículas que apresentaram EUD S100 em sua constituição em proteger o PAN da degradação ácida.

- ❖ Na avaliação da ação antiulcerativa *in vivo*, a análise estatística (Student-Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ) demonstrou que as formulações M1 e M2 foram significativamente diferente dos controles (PAN puro e BIC), não diferindo entre si quanto à ação antiulcerativa. Assim, demonstrou-se a efetividade das micropartículas em proteger o PAN durante sua passagem pelo ambiente ácido do estômago, permitindo sua absorção entérica em quantidade suficiente para expressar sua ação farmacológica. Também foi possível constatar que a inibição da ulceração deve-se à atividade do fármaco, descartando-se a hipótese da influência do pH.
- ❖ O estudo da permeação do PAN puro e a partir das micropartículas M1 e M2 no epitélio intestinal demonstrou valores em torno de 90% de absorção do fármaco em 120 a 150 minutos. A modelagem matemática dos perfis de absorção indicou o modelo monoexponencial como o mais adequado para descrever os dados experimentais. As constantes cinéticas observadas  $k$ , relativas à velocidade do processo de absorção, apresentaram-se na mesma ordem de magnitude e não diferiram significativamente (ANOVA,  $\alpha=0,05$ ), demonstrando a similaridade dos perfis de absorção.







- ALAMILLA-BELTRÁN, L.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. R.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Description of morphological changes of particles along spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 179-184, 2005.
- ALONSO, M.J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168-172, 2004.
- ARELLANO, C.; PHILIBERT, C.; LACOMBE, O.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Liquid chromatographic – mass spectrometric method to assess cytochrome P450-mediated metabolism of testosterone by rat everted gut sacs. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p.263-270, 2004.
- ARMIJO, C. J. V. **Aplicação de Métodos Termo-Analíticos e Espectroscópicos na Avaliação do Comportamento do Fármaco Isoniazida frente a Adjuvantes**. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed: Porto Alegre, 2005.
- AVNER, D. Clinical Experience with pantoprazole in gastroesophageal reflux disease. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 10, p.1170-1185, 2000.
- BARTHE, L.; BESSOUET, M.; WOODLEY, J. F.; HOUIN, G. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 173, p. 255-258, 1998.
- BILLON, A.; BATAILLE, B.; CASSANAS, G.; JACOB, M. Development of spray-dried acetaminophen microparticles using experimental designs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p.159-168, 2000.
- BILLON, A.; BATAILLE, B.; DELALONDE, M.; JACOB, M. Spray-dried microparticulate systems containing acetaminophen. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p.165-172, 2002.
- BOCHENEK, W.; WEINSTEIN, W.; METZ, D.; MISKA, D.; Pantoprazole 40 and 20 mg prevents gastroesophageal reflux disease (GERD) relapse regardless of H. pylori status. **American Journal of Gastroenterology**, Abstracts, p. 2415, 2000.
- BOSQUILLON, C.; ROUXHET, P. G.; AHIMOU, F.; SIMON, D.; COLUT, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Aerosolization properties, surface composition, and physical state of spray-dried protein powders. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 357-367, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de julho de 2003.
- BROWN, J.R.; COLLETT, J. H.; ATTWOOD, D.; LEY, R. W.; SIMS, E. E. Influence of monocaprin on the permeability of a diacid drug BTA-243 across caco-2 cell

- monolayer and everted gut sacs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 245, p.133-142, 2002.
- CARRENO-GÓMEZ, B.; WOODLEY, J. F.; FLORENCE, A. T. Studies on the uptake of tomato lecithin nanoparticles in everted gut sacs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 7-11, 1999.
- CHEER, S.; PRAKASH, A.; FAULDS, D. & LAMB, H. Pantoprazole- An update of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acid-related disorders. **Drugs**, v. 63, n. 1, p. 101-132, 2003.
- CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19 n. 2, p. 191-201, 2002.
- CILURZO, F.; MINGHETTI, P.; SELMIN, F.; CASIRAGHI, A.; MONTANARI, L. polymethacrylate salts as new low-swelling mucoadhesive materials. **Journal of Controlled Release**, v. 88, p. 43-53, 2003.
- CILURZO, F.; SELMIN, F.; MINGHETTI, P.; RIMOLDI, I.; DEMARTIN, F.; MONTANARI, L. Fast-dissolving mucoadhesive microparticulate delivery system containing piroxicam. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 355-361, 2005.
- CORNAIRE, G.; WOODLEY, J.; HERMANN, P.; CLOAREC, A.; ARELLANO, C.; HOUIIN, G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 119-131, 2004.
- COSTA, P.; LOBO, M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 123-133, 2001.
- CRUZ, L. **Estudo físico-químico comparativo de sistemas nanoestruturados contendo indometacina ou seu éster etílico e avaliação *in vivo* da atividade anti-dematogênica**. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- DENTINGER, P.; SWENSON, C. & ANAIZI, N. Stability of pantoprazole in an extemporaneously compounded oral liquid. **American Journal of Healthy System Pharmacy**, v. 59, n. 10, p. 953-956, 2002.
- DESAI, M.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G.; LEVY, R. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.
- EKPE, A. & JACOBSEN, T. Effect of various salts on the stability of lansoprazole, omeprazole and pantoprazole as determined by high-performance liquid chromatography. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 9, p. 1057-1065, 1999.

- ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p.329-334, 2002.
- FLORENCE, A. T. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 3, p. 259-266, 1997.
- FORD, J.L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications**, Halsted Press: New York, 1989.
- GAO, Y.; ZHOU, S.; WEN, J.; HUANG, M. & XU, A. Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. **Life Sciences**, v. 72, p.731-745, 2002.
- HEGAZY, N.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation and *In Vitro* Evaluation of Pyridostigmine Bromide Microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 171-174, 2002.
- HUBER, R.; MÜLLER, W. High-performance liquid chromatographic determination of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitor (BY 1023/SK&F 96 022) and its sulphone metabolite in serum or plasma by direct injection and fully automated pre-column sample clean-up. **Journal of Chromatography**, v. 529, p. 389, 1990.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. United States of America, 1996.
- JOHNSON, C. Stability of pantoprazole in 0,9 % sodium chloride injection in polypropylene syringes. **American Journal of Health System. Pharmacy**, v. 62, n. 22, p. 2410-2412, 2005.
- JUNGNICKEL, P.W. Pantoprazole: a new proton pump inhibitor. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 11, p.1268-1293, 2000.
- KATZ, P. Pharmacological basis of pantoprazole dosing. **Current Therapeutics Research**, v. 61, n. 8, p. 507-522, 2000.
- KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.
- KIBBE, A. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3<sup>rd</sup> ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.
- KONTUREK, P.; BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; HARSCH, I.; MEIXNER, H.; STACHURA, J.; HAHN, E. & KONTUREK, S. Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 451, p. 191-202, 2002.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery: a review. **Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

- LIN, S.Y.; KAO, Y.H. Tablet study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 919-24, 1991.
- LO, Y.; TSAI, J.; KUO, J. Liposomes and disaccharides as carries in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 259-272, 2004.
- MANSOUR, A.; SOROUR, O. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Pantoprazole in Tablet Dosage Form. **Chromatography**, v. 53, n. S-478 e S-479, 2001.
- MENEGHELLI, U. G.; ZATERKA, S.; CASTRO, L. P.; MALAFAIA, O.; LYRA, L. G. C.; Pantoprazole versus ranitidine in the treatment of duodenal ulcer: a multicenter study in Brasil. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, p. 62-66, 2000.
- MERK & COMPANY INCORPORATED. **The Merck Index**. 13<sup>th</sup> ed: New Jersey, 2001.
- METZ, D.; FORSMARK, C.; LEW, E.; STARR, J.; SOFFER, E.; BOCHENEK, W.; PISEGNA, J. Replacement of oral proton pump inhibitors with intravenous pantoprazole to effectively control gastric acid hipersecretion in patients with Zollinger-Ellison syndrome. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 12, p. 3274-3280, 2001.
- METZ, D.; SOFFER, E.; FORSMARK, C.; CRYER, B.; CHEY, W.; BOCHENEK, W. & PISEGNA, J. Maintenance Oral Pantoprazole Therapy Is Effective for Patients With Zollinger-Ellison Syndrome and Idiopathic Hypersecretion. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 2, p. 301-307, 2003.
- MINER, P.; KATZ, P.; CHER, Y.; SOSTEK, M. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole and rabeprazole: a five-way crossover study. **American Journal of Gastroenterology**, v.98, n. 12, p. 2616-2620, 2003.
- MÜLLER, C. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco**. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- NAKAMURA, C.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KONISHI, N.; HORIKAWA, Y.; MATSUHASHI, T. & WATANABE, S. Rolipram, a specific type IV phosphodiesterase inhibitor, ameliorates indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. **Pathophysiology**, v. 9, p. 195-200, 2003.
- OBACH, E. S. **Avaliação dos Perfis de Liberação In Vitro e da Toxicidade Gastrointestinal In Vivo de Indometacina a partir de Nebulizados de Nanocápsulas**. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

O' HARA, T; DUNNE,A.; BUTLER, J; DEVANE,J. A Review of Methods used to Compare Dissolution Profile Data. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, p. 214-223, 1998.

ONEDA, F.; RÉ, M.I.; The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. **Powder Technology**, v.130, p. 377-384, 2003.

PALMIERI, G., BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P & MARTELLI, S. Spray-Drying as a Method for Microparticulate Controlled Release Systems Preparation: Advantages and Limits. I. Water-Soluble Drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 195-204, 2001.

PETROVIC, S.; DOBRIC, S.; BOKONJIC, D.; NIKETIC, M.; GARCIA-PIÑERES, A. & MERFORT, I. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for an anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 109-113, 2003.

PHARMACOPOEIA of the United States of America 28<sup>th</sup> ed. United States: Rockville Pharmacopoeial Convention, 2005.

POOLE, P. Pantoprazole. **American Journal of Health System Pharmacy**, v. 58, n. 11, p. 999-1008, 2001.

RAFFIN, R.;OBACH, E.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. & GUTERRES, S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RAFFIN, R. P.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Preparation, characterization and *in vivo* anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, *in press*, 2006.

RAVI KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

RICHTER, J.; BOCHENEK, W.; PANTOPRAZOLE US GERD STUDY GROUP. Oral pantoprazole for erosive esophagitis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 11, p. 3071-3080, 2000.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; PRATHA, V. & HOGAN, D. Synthesis or rupture: duration of acid inhibition by proton pump inhibitors. **Drugs of Today**, v. 39, Suplemento A, p. 11-14, 2003.

SCHILLING, R. & MITRA, A. Intestinal mucosal transport of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 62, p. 53-64, 1990.

- SHAH, P. J.; GANDHI, M. S.; SHAH, M. B.; GOSWAMI, S. S.; SANTANI, D. Study of *Mimusops elengi* bark in experimental gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 305-311, 2003.
- SHAH, V. T.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, J. P. *In Vitro* Dissolution Profile Comparison – Statistics and Analysis of the Similarity factor, f<sub>2</sub>. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 6, p. 889-896, 1998.
- SHARGEL, L. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2005.
- SHIN, J.M.; BESANCON, M.; SIMON, A. The site of action of pantoprazole in the gastric H<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1148, n. 2, p. 223-233, 1993.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.
- STANGHELLINI, V. Management of Gastroesophageal Reflux Disease. **Drugs of Today**, v. 39, Suplemento A, p.15-20, 2003.
- TAKEUCHI, K.; KONAKA, A.; NISHIJIMA, M.; KATO, S. & YASUHIRO, T. Proton Pump Inhibitor: Effects of pantoprazole, a novel H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor, on duodenal ulcerogenic and healing responses in rats: a comparative study with omeprazole and lanoprazole. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 251-257, 1999.
- THIES, C. A Survey of Microencapsulation Processes. In: BENITA, S. **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**. 10<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1996.
- UNGELL, A. In vitr absorption studies and their relevance to absorption from the GI tract. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 9, p. 879-892, 1997.
- WALTON, D. E. The Morfology of Spray-Dried Particles: a Qualitative View, **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p.1943-1986, 2000.
- WASHINGTON, C. Drug Release from Microdisperse Systems: a Critical Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.
- ZUPANCIC, V.; OGRAJSEK, N.; KOTAR-JORDAN, B.; VRECER, F. Physical Characterization of Pantoprazole Sodium Hydrates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 291, p. 59-68, 2005.





## Validação de metodologia analítica para quantificação do PAN

### 1 Linearidade

Foram desenvolvidas três curvas de calibração em três dias diferentes abrangendo as concentrações 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15 µg/mL. O estudo da linearidade do método analítico foi realizado através de análise de variância (Tabela 1-A1), verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ( $p < 0,01$ ). A Figura 1-A1 ilustra a representação gráfica da curva média obtida para quantificação de PAN, indicando a equação da reta obtida e o coeficiente de correlação encontrado.

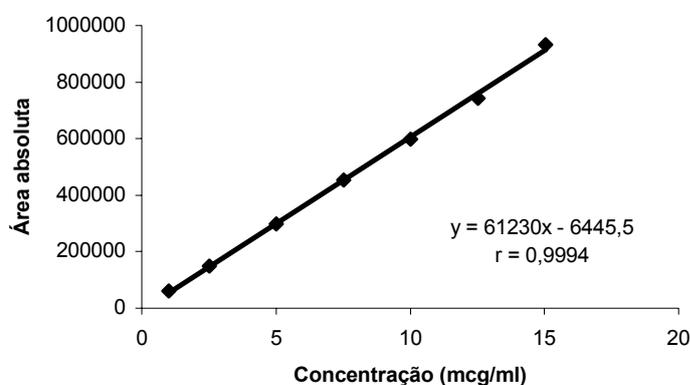


Figura 1-A1. Representação gráfica da curva padrão do PAN obtida por CLAE.

Tabela 1-A1. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do PAN através de CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	6	$5,4579 \times 10^{12}$	$9,0965 \times 10^{11}$	1234,62*
- regressão linear	1	$5,45087 \times 10^{12}$	$5,45087 \times 10^{12}$	7398,19*
- desvio da linearidade	5	7032774497	1406554899	1,91
RESÍDUO	56	41259906633	736784047	
TOTAL	62			

\* significativo para  $p < 0,01$

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade foram calculados os limites de detecção e quantificação através das Equações 2 e 3, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,335 µg/mL para o limite de detecção e 1,118 µg/mL para o limite de quantificação.

## 2 Repetibilidade e precisão intermediária

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária, expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) são apresentados na Tabela 2-A1. Para ambos os estudos os valores de desvios padrões relativos foram inferiores a 5%, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão (BRASIL, 2003).

Tabela 2-A1. Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em três dias diferentes.

Concentração (µg/mL)	DPR Dia 1 (%)	DPR Dia 2 (%)	DPR Dia 3 (%)	Média (%)
6	1,71			
9	0,59	0,54	0,27	0,47
14	1,10			
Média (%)	1,13			

## 3 Exatidão

No que diz respeito à avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 105,78 % para concentração final de 6 µg/mL; 105,28 % para 9 µg/mL e 109,83 % para 14 µg/mL, resultando em uma percentagem média de recuperação de 106,96 %, o que caracteriza método como exato, segundo preceitos do ICH e ANVISA.

## Validação da metodologia para quantificação do PAN nas alíquotas provenientes da liberação

### 1 Linearidade

Foram desenvolvidas três curvas de calibração em três dias diferentes abrangendo as concentrações 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. O estudo da linearidade do método analítico foi realizado através de análise de variância (Tabela 1-A2), verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ( $p < 0,01$ ). A Figura 1-A2 ilustra a representação gráfica da curva média obtida para quantificação de PAN, indicando a equação da reta obtida e o coeficiente de correlação encontrado.

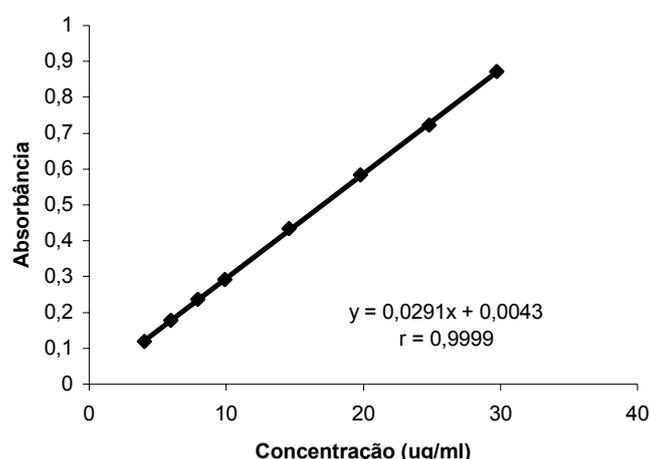


Figura 1-A2. Representação gráfica da curva padrão do PAN obtida por espectrofotometria na região do UV.

Tabela 1-A2. ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do PAN através de espectrofotometria na região do UV.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	7	1,56022	0,22289	190,54326*
- regressão linear	1	1,56005	1,56005	1333,66549*
- desvio da linearidade	6	0,00016	0,00003	0,02289
RESÍDUO	16	0,01872	0,00117	
TOTAL	23			

\* significativo para  $p < 0,01$

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade foram calculados os limites de detecção e quantificação através das Equações 2 e 3, respectivamente. Os valores obtidos foram 1,065 µg/mL para o limite de detecção e 3,551 µg/mL para o limite de quantificação.

## 2 Repetibilidade

Os resultados obtidos na determinação do PAN em amostras de micropartículas através de espectrofotometria na região do UV estão demonstrados na Tabela 2A-2. A repetibilidade é expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 2A-2. Valores experimentais obtidos na determinação do PAN contido em micropartículas por espectrofotometria na região do UV.

<b>Amostra</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Média</b>	<b>DPR</b>
1	98,04	93,44	3,38
2	95,83		
3	94,06		
4	90,68		
5	92,25		
6	89,75		

## 3 Precisão intermediária

O doseamento foi realizado em três dias consecutivos para a verificação da precisão intermediária do método. Os resultados expresso em termos de DPR são apresentados na Tabela 2A-3.

Tabela 2A-3. Determinação do teor de PAN contido em micropartículas por espectrofotometria na região do UV, em três dias consecutivos.

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
Média* (%)	93,44	92,16	91,09
DPR intra-dia (%)	3,38	3,05	2,21
Média geral (%)	92,80		
DPR inter-dia (%)	1,26		

\* cada valor representa a média do doseamento de seis amostras.

Para ambos os estudos acima apresentados, os valores de DPR mantiveram-se em torno de 3 %, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

#### 4 Exatidão

No que diz respeito à avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 98,63 % para concentração final de 5 µg/mL; 101,97 % para 10 µg/mL e 100,71 % para 20 µg/mL, resultando em uma percentagem média de recuperação de 100,44 %, o que caracteriza método como exato, segundo preceitos do ICH e ANVISA. Os valores individuais podem ser visualizados na Tabela 2A-4.

Tabela 2A-4. Valores experimentais obtidos na determinação do PAN contido em micropartículas por espectrofotometria na região do UV.

	<b>Concentração adicionada (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Média (%)</b>
R1	5,0	99,66 98,12 98,12	98,63
R2	10,0	101,36 103,36 101,20	101,97
R3	20,0	100,89 99,66 101,59	100,71

Recuperação média (%) = 100,44





**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2005403

**Título :** Micropartículas nanorrevestidas contendo pantoprazol: desenvolvimento tecnológico, caracterização físico-química e avaliação da absorção intestinal do fármaco.

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
LETÍCIA MARQUES COLOMÉ	PESQ RESPONSÁVEL	lecolome@terra.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 43 , ata nº 64 , de 24/11/2005 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 28 de novembro de 2005

  
**José Roberto Goldim**  
 Coordenador do CEP-UFRGS

