



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



DEIVID WILLIAM PIRES

**Influência da Motilidade Gastrintestinal no processo
de desintegração de comprimidos**

Dissertação de Mestrado

BOTUCATU-SP

2016

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu

Deivid William Pires

**Influência da Motilidade Gastrointestinal no processo
de desintegração de comprimidos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Adj. José Ricardo de Arruda Miranda

Co-Orientador: Dr. Uilian Andreis

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pires, Deivid.

Influência da motilidade gastrintestinal no processo de desintegração de comprimidos / Deivid Pires. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Coorientador: Uilian Andreis

Capes: 20903006

1. Medicamentos - Administração. 2. Biodisponibilidade.
3. Dissolução. 4. Sistema gastrointestinal - Motilidade.

Palavras-chave: Biodisponibilidade; Dissolução; Fator de similaridade; Prucaloprida; Trânsito gastrintestinal.

Deivid William Pires

**Influência da Motilidade Gastrointestinal no processo
de desintegração de comprimidos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Adj. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Comissão examinadora

Prof. Adj. Dr José Ricardo de Arruda Miranda

Universidade: Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP

Prof(a). Dr(a) Luciana Aparecida Corá

Universidade: Universidade Estadual de
Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Prof(a). Dr(a) Maria Palmira Daflon Gremião

Universidade: Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara-UNESP

Botucatu, _____ de _____ de _____.

A minha amada Família

Itamar Pires

Jaciinta Fernandes Pires

Deise Cristina Pires

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adjunto José Ricardo de Arruda Miranda, pela orientação que me incentivou no caminho do conhecimento científico e formação acadêmica, pelo respeito profissional e por sua grande amizade.

Ao Dr. Uilian de Andreis, pela co-orientação durante estes quase dois anos de mestrado, que me ajudou com todo conhecimento técnico e científico, profissional e principalmente pela sua grande amizade.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e em especial ao Programa de Pós-graduação que me ofereceram o espaço e toda formação acadêmico e científico.

Ao Laboratório de Biomagnetismo e Laboratório de Física Aplicada ao Radiodiagnóstico, assim como toda a equipe que me ofereceu o espaço físico e ajuda durante este período de desenvolvimento de minha pesquisa e formação acadêmica.

À CAPES pelo fomento à pesquisa, e a FAPESP pelo auxílio financeiro cedido para toda a instalação laboratorial do Laboratório de Biomagnetismo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama funcional da Biosusceptometria AC.

Figura 2: (i) Monossensor BAC. (ii) Multissensor BAC.

Figura 03: Linha temporal dos procedimentos experimentais.

Figura 04: Posicionamento do BAC-Multissensor sobre a região de projeção gástrica, para aquisição da Atividade de Contração Gástrica.

Figura 05: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos com núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 01.

Figura 06: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos sem núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 02

Figura 07: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos sem núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 03.

Figura 08: Tempo de trânsito do material ferromagnético em diversos seguimentos do Trato Gastrointestinal mensurados a partir do BAC Monossensor.

Figura 09: Perfil de Trânsito Gastrointestinal para o voluntário 02.

Figura 10: Aquisição de sinal magnético em um voluntário, sob tratamento com Prucaloprida.

Figura 11: Perfil de concentração de Metronidazol para o voluntário 01.

Figura 12: Quantificação dos parâmetros farmacocinéticos da curva de concentração sérica de metronidazol, Placebo X Prucaloprida.

Figura 13: Perfis médios de concentração do Metronidazol: dissolução *in vitro* e Biodisponibilidade *in vivo*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Lote 01, composição dos comprimidos magnéticos.

Tabela 02: Lote 02, composição dos comprimidos não magnéticos simulando o mesmo volume dos comprimidos do Lote 01.

Tabela 03: Lote 03, composição dos comprimidos não magnéticos simulando comprimidos de ordem de grandeza comercial.

Tabela 04: Valores médios obtidos para os parâmetros Farmacotécnicos de produção.

Tabela 05: Perfil de dissolução dos lotes de comprimidos. As médias entre os lotes foram comparadas ponto a ponto (tempo).

Tabela 06: Fatores de diferença (f1) e similaridade (f2) para a comparação dos perfis de liberação do metronidazol *in vitro* entre os lotes de comprimidos.

Tabela 7: Quantificação das médias no parâmetro de eficiência de dissolução para cada lote de comprimidos.

Tabela 8: Quantificação das médias para os parâmetros de Trânsito Gastrintestinal.

Tabela 9: Quantificação das médias no parâmetro de Tempo de Início de Dissolução para cada tratamento.

Tabela 10: Tempos do início da Desintegração do comprimido (TID) e trânsito da ferrita no Trato Gastrintestinal (TTOC) e Tempo para início da Absorção (tlag) e Concentração máxima do fármaco Metronidazol (tmax).

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius

µl – microlitros

µm – micrômetros

A/D – Analógico/Digital

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCII - *American Standard Code for Information Interchange*

AUC - Area Under Curve

BAC – Biosusceptometria de Corrente Alternada

C – concentração recuperada

C₀ – concentração teórica inicial

CLUE – Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência

C_{max} – concentração máxima

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

ED – eficiência de dissolução

EUA – Estados Unidos da América

f1 – fator de diferença

f2 – fator de similaridade

g - gramas

HCl - Ácido Clorídrico

Hz – Hertz

IC – inclinação da curva analítica

Kgf – kilograma força

kN – kilonilton

LD – limites de detecção

log - logarítimo

LQ – limites de quantificação

mg - miligrama

min - minutos

ml – mililitros

mm - milímetro

MT - metronidazol

n – n-ésimo

N – Nilton

ng – nanogramas

nm – nanômetros

φ - diâmetro

pH – potencial de Hidrogeniônico

R% - porcentagem de recuperação

rpm – rotações por minuto

Rt – valor de dissolução média do produto referência

s – segundos

t – tempo

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDI – tempo de início da desintegração

TEG – Tempo de Esvaziamento Gástrico

TGI – Trato Gastrintestinal

t_{lag} – tempo de início da absorção

t_{max} – tempo da concentração máxima

Tt – valor de dissolução média do produto teste

TTID – Tempo de Trânsito do Intestino Delgado

TTOC – Tempo de Trânsito Oro-Cecal

UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography

USA – United States of American

USP – *United States Phamacopeia*

UV – Ultra Violeta

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

v/v- volume/volume

RESUMO

A via oral de administração de fármacos é seguramente a mais empregada, não apenas pela facilidade de administração, mas também pela adesão do paciente ao tratamento. Dentre as formas de apresentação oral, os comprimidos são os mais utilizados, uma vez que são apresentações bastante seguras e estáveis. Para o desenvolvimento de novas formulações é essencial o conhecimento de parâmetros fisiológicos que possam influenciar no desempenho da forma farmacêutica. É possível supor que parâmetros da atividade motora do trato gastrointestinal podem trazer implicações significativas na biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. A Prucaloprida é um agonista do receptor 4-serotonina com conhecidos efeitos colicinéticos e possíveis efeitos procinéticos, acelerando a propulsão do conteúdo luminal. Assim, estudar o efeito da Prucaloprida no trânsito gastrointestinal se torna importante, já que pode influenciar no processo de desintegração de comprimidos e na biodisponibilidade de um fármaco. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da Prucaloprida no Trânsito Gastrointestinal e como esse efeito influi nos processos de desintegração de um comprimido e na biodisponibilidade do Metronidazol (marcador farmacocinético). Foram produzidos lotes de comprimidos contendo 100 mg de metronidazol, com e sem adição de ferrita na formulação, para estudar os fatores de correlação entre os perfis de dissolução, *in vitro*, e verificar a influência da ferrita no processo de dissolução do fármaco. Cada lote foi avaliado através de testes farmacotécnicos e avaliados segundo o perfil de dissolução. Para os experimentos *in vivo*, cada voluntário foi submetido a duas fases de estudos, em dias distintos, para avaliar a biodisponibilidade do metronidazol. Os dispositivos BAC multissensor e monossensor foram empregados para a avaliação em tempo real do processo de desintegração do comprimido e avaliar os parâmetros de trânsito no trato gastrointestinal. Os lotes de comprimidos com e sem ferrita tiveram perfis de dissolução significativamente diferentes para concentração dissolvida e eficiência de dissolução, mas apresentaram similaridade segundo o fator f_2 proposto por Moore & Flaner, 1996, com variação máxima de 10% entre elas. Nos ensaios *in vivo*, o efeito do tratamento por prucaloprida provocou significativa redução no TEG e na biodisponibilidade do metronidazol sérico. A Prucaloprida, em dose de 1 mg, apresentou efeitos significativos no Trânsito Gastrointestinal e em parâmetros da biodisponibilidade do Metronidazol (MT), devido a rápida exposição do conteúdo gástrico ao intestino delgado e, dessa forma, alterando significativamente a taxa de absorção do MT.

Palavras-chave: Prucaloprida, Trânsito Gastrointestinal, Biodisponibilidade, Dissolução, Fator de Similaridade.

ABSTRACT

The oral route of drugs administration is surely the most used, not only for being easily employed, but also due to the patient adhesion. Among them, tablets are the most common, since they present safe and stable features. In order to develop new formulations, it is essential to acknowledge some physiological parameters and their influence on the pharmaceutical form performance. It is possible to speculate that motor activity parameters of the gastrointestinal tract might interfere in the drug availability after oral administration. Prucalopride is a 4-serotonine receptor agonist with known colonkinetic and possible prokinetic effects, which accelerates the luminal content propulsion. Therefore, it is important to study its effects on the gastrointestinal transit, since it might influence the tablet disintegration process and bioavailability. The objective of this study was to assess the Prucalopride effect on the gastrointestinal transit and how it affects the tablet disintegration process and the Metronidazol (pharmacokinetic marker) bioavailability. Tablet batches were produced, 100 mg of Metronidazol, with and without ferrite, in order to study correlation factors between the *in vitro* dissolution process for each batch. The influence of the ferrite in the drug dissolution process was also evaluated. Each batch was assessed by pharmacokinetic tests and by their dissolution profile. On regards to the *in vivo* experiment, each volunteer was submitted to a two phase study, in distinct days, in order to assess the metronidazol bioavailability. Both monossensor and multissensor ACB systems were employed in the real time evaluation of the tablet disintegration process and in the assessment on the gastrointestinal transit parameters. Both tablet batches (with and without ferrite) showed different dissolution profiles for dissolved concentration and dissolution efficiency, although some similarities were found in the f2 factor, proposed by Moore & Flaner, 1996, with maximum variation of 10% between them. Regarding the *in vivo* study, the prucalopride treatment demonstrated a significant reduction effect in the gastric emptying time and in the serum metronidazol bioavailability. The prucalopride, at 1 mg, produced significant effects in the gastrointestinal transit and in the metronidazol bioavailability due to the fast exposure of the gastric content to the small bowel and, therefore, modifying significantly, the metronidazol absorption rate.

Keyword: Prucalopride, Gastrointestinal Transit, Bioavailability, Dissolution, Similarity Factor.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. GERAL.....	18
2.2. ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. MATERIAIS	19
3.1.1. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS.....	19
3.1.2. PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS	19
3.2. COMPRIMIDOS E TESTES <i>IN VITRO</i>.....	20
3.2.1. PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS (TESTE).....	20
3.2.2. PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS NÃO MAGNÉTICOS	21
3.2.3. REVESTIMENTO	22
3.2.4. ENSAIOS FARMACOTÉCNICOS.....	22
3.3. BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA - BAC	24
3.4. ESTUDO DO TRÂNSITO GASTRINTESTINAL E DA BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL	26
3.4.1. FASE I – PLACEBO	29
3.4.2. FASE II – PRUCALOPRIDA.....	29
3.5. DETERMINAÇÃO DO METRONIDAZOL SÉRICO	29
3.5.1. PROTOCOLO DE ANÁLISE POR CLUE	29
3.5.2. PREPARAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DE METRONIDAZOL EM SORO	33
3.6. ANÁLISE DOS DADOS	33
3.6.1. PERFIL DA DISSOLUÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
3.6.2. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL	35
3.6.3. DESINTEGRAÇÃO DO COMPRIMIDO TESTE <i>IN VIVO</i>	35
3.6.4. BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL.....	35
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....	37
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO, ENSAIOS DE DUREZA E FRIABILIDADE.....	37
4.1.2. ESTUDO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO (APARATO II).....	38
4.2. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	44
4.2.1. EFEITO DO TRATAMENTO POR PRUCALOPRIDA NO TRÂNSITO GASTRINTESTINAL	44
4.2.2. DESINTEGRAÇÃO DE COMPRIMIDOS <i>IN VIVO</i> (BAC).....	47
4.2.3. INFLUÊNCIA DA PRUCALOPRIDA NA BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL.....	49
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, têm-se estudado diversas vias de administração de fármacos, mas a via oral ainda continua sendo preferencial. Isto ocorre devido à sua conveniência, baixo custo e maior adesão do paciente ao tratamento (SOUZA *et al.*, 2007). O desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas mais efetivas está associado ao conhecimento dos parâmetros fisiológicos que influenciam o seu desempenho no Trato Gastrointestinal (TGI) (DRESSMAN *et al.*, 1998; McCONNEL *et al.*, 2008; VARUM *et al.*, 2010).

Considerando a atividade motora do TGI, é possível supor que esse parâmetro tem implicações significativas na biodisponibilidade de fármacos administrados pela via oral. Isto é particularmente importante para a farmacocinética, visto que a biodisponibilidade é influenciada pela interação entre a fisiologia do TGI e as propriedades do fármaco, tais como a solubilidade nos fluidos e sua permeabilidade através das membranas (DRESSMAN *et al.*, 2007; KORTEJÄRVI *et al.*, 2007). Além disso, os mecanismos de liberação do fármaco devem ser considerados, uma vez que refletem a dinâmica da taxa e extensão da absorção.

Ademais, uma série de doenças que afetam a função motora do TGI também pode influenciar a absorção de fármacos. Por isso, a coadministração de medicamentos é um fator relevante visto que pode alterar a biodisponibilidade (BERGSTRAND *et al.*, 2009).

Procinéticos são agentes que estimulam a atividade contrátil da musculatura lisa gastrointestinal, aumentando a propulsão e, conseqüentemente, promovendo o deslocamento aboral do conteúdo luminal. Estes são considerados os fármacos de escolha para tratamento de disfunções motoras do TGI superior, principalmente aquelas associadas à doença do refluxo gastroesofágico, dispepsia funcional, gastroparesia diabética e prevenção de náusea e vômito (TONINI *et al.*, 1996, 2004).

A Prucaloprida é um agonista do receptor 4-serotonina altamente seletivo e potente que facilita a neurotransmissão colinérgica e excitatória não adrenérgica, não colinérgica. O fármaco é altamente absorvido e tem possíveis efeitos procinéticos pois age por meio de um sistemático mecanismo para iniciar o peristaltismo, aumentando a ocorrência de contrações migratórias gigantes e acelerando a propulsão (PRIEM *et al.*, 2012). Estudos em voluntários saudáveis confirmaram que a prucaloprida diminui o tempo de esvaziamento gástrico e de trânsito do intestino delgado, sugerindo que podem também melhorar a função do intestino superior e sintomas associados, bem como apresentar propriedades colocinéticas (EMMANUEL, 2002; QUIGLEY, 2012; KESSING *et al.*, 2014).

Nesse contexto, avaliar a função motora do TGI torna-se relevante na medida em que os parâmetros fisiológicos tais como o trânsito gastrintestinal, o estado prandial, o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e a variação do pH ao longo do TGI, podem interferir significativamente na absorção dos fármacos (MARTINEZ & AMIDON, 2002; McCONNEL *et al.*, 2008; VARUM *et al.*, 2010).

Diversas técnicas foram propostas para avaliar a atividade motora do TGI, sendo algumas consideradas o “padrão-ouro”, como a cintilografia (SMOUT & MUNDT, 2009). No entanto, a exposição à radiação ionizante, como nas radiografias contrastadas empregando marcadores radio-opacos, ou na cintilografia, ou ainda o fato de serem métodos invasivos, como a manometria, implica em limitações e desconforto ao paciente.

Como opções às dificuldades técnicas ou em virtude de minimizar o desconforto e a exposição dos pacientes, métodos alternativos com base na detecção de campo magnético foram desenvolvidos (WEITSCHIES *et al.*, 2005; CORÁ *et al.*, 2005a).

Dessa maneira, a Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) surgiu como uma técnica inovadora para avaliar o trânsito gastrintestinal (BAFFA *et al.*, 1995; MIRANDA *et al.*,

1997). Trata-se de um método não invasivo e livre de radiação ionizante, que não requer ambiente controlado, magneticamente blindado, e possui baixo custo de implantação, quando comparada às técnicas já estabelecidas.

Essa técnica utiliza bobinas de detecção para registrar a variação temporal do fluxo magnético, sendo essa variação causada pela presença de um material ferromagnético quando imerso no campo magnético de indução gerado pelo sistema. Esse material tem como principal característica uma alta susceptibilidade magnética e, por isso, produz uma resposta intensa quando excitado por um campo magnético alternado aplicado (CORÁ *et al.*, 2010).

O constante aperfeiçoamento dessa instrumentação permitiu o desenvolvimento de diversos estudos aplicados à fisiologia básica do TGI, tanto em humanos (ROMEIRO *et al.*, 2006; AMÉRICO *et al.*, 2007, 2009), quanto em animais (MORAES *et al.*, 2003; ANDREIS *et al.*, 2008) e em pesquisas envolvendo a tecnologia farmacêutica (CORÁ *et al.*, 2003; 2005a,b; 2006; 2008; 2010; MIRANDA *et al.*, 2010).

Na pesquisa farmacêutica, esse método oferece uma oportunidade única para monitorar as formas farmacêuticas, bem como outros processos relacionados com a liberação de fármacos. Nos últimos anos, estudos utilizando partículas magnéticas em detrimento de radioisótopos em formas farmacêuticas sólidas, culminaram na aplicação desses métodos na investigação dos processos farmacêuticos bem como dos parâmetros fisiológicos que influenciam a biodisponibilidade de fármacos administrados em formas farmacêuticas sólidas orais.

Dentro deste contexto exposto, esse trabalho consistiu em avaliar os efeitos da Prucaloprida no Trânsito do TGI e nos parâmetros farmacotécnicos da desintegração de um comprimido e da biodisponibilidade de um fármaco modelo.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito da Prucaloprida no Trânsito Gastrintestinal e como esse efeito influencia nos processos de desintegração de um comprimido e na biodisponibilidade do Metronidazol.

2.2. ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar comprimidos contendo ferrita (marcador magnético) e metronidazol (fármaco modelo), revestidos com uma preparação gastrossolúvel (Opadry® TM) para liberação imediata;
- Estudar os fatores de correlação do perfil de dissolução, *in vitro*, para comprimidos com e sem núcleo de ferrita;
- Avaliar o processo de desintegração dos comprimidos, *in vivo*, utilizando um dispositivo de Biosuceptometria AC (BAC);
- Estudar o efeito da Prucaloprida no Trânsito Gastrintestinal e na desintegração do comprimido teste, bem como na biodisponibilidade do Metronidazol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS

- Acetonitrila (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil)
- Celulose microcristalina (Henrifarma, São Paulo, Brasil)
- Estearato de magnésio (Henrifarma, São Paulo, Brasil)
- Ferrita - $MnZnFe_2O_3$; 53-75 μm (Br4Science, Brasil)
- Metanol (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil)
- Metronidazol (Audaz, São Paulo, Brasil)
- Metronidazol Padrão (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Prucaloprida (Jansen)
- Polímero de revestimento Opadry[®] TM (Colorcon, São Paulo, Brasil)

3.1.2. PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS

- Biosusceptômetro de Corrente Alternada (BAC) monosensor/multisensor 7 canais (Br4Science, Brasil)
- Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência – H-Class – UPLC Acquity[®], Waters (EUA)
- Durômetro Dr. Schleuniger-Pharmatron modelo 6D (EUA)
- Liofilizador Labconco modelo FreeZone 2.5 (EUA)
- Paquímetro Digital Starrett 799A-6 (EUA)
- Prensa Manual MA-90 (Marconi)

3.2. COMPRIMIDOS E TESTES *IN VITRO*

Foram produzidos 3 lotes de comprimidos. Todos os lotes foram produzidos por compressão direta, em uma prensa manual (MA-098/1CPE, Marconi Ltda., Brasil).

3.2.1. PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS (TESTE)

Um lote de comprimidos magnéticos (Lote 01), com núcleo de ferrita, foi produzido conforme as proporções de excipientes, tabela 01, utilizando matriz e punção de 12 mm de diâmetro, sob uma força de 30 kN. Esse, portanto, se trata do lote de comprimidos a serem testados nos experimentos *in vivo*.

Tabela 01: Lote 01 (comprimido teste): composição dos comprimidos magnéticos.

Material	Fornecedor	(%)	g/dose
Ferrita (Fe_2MnO_4 ; $90 < \varnothing < 125 \mu\text{m}$)	Imag	50,00	0,500
Metronidazol	Audaz	10,00	0,100
Celulose Microcristalina	Blanver	30,00	0,300
Estearato de Magnésio	Henrifarma	1,00	0,010
Aerosil®	Evonik Degussa GmbH	5,00	0,050
Explosol	Blanver	4,00	0,040
TOTAL		100,00	1,000

A ferrita em pó é um material insolúvel e inerte, que não é absorvido pela mucosa do TGI, sendo desprovido de qualquer efeito adverso ao organismo (BELIKOV & KUREGYAN, 2001). Diversos estudos já foram realizados utilizando ferrita como marcador e demonstrando que não implica em alterações significativas nas propriedades farmacotécnicas dos comprimidos (CORÁ *et al.*, 2003, 2005a, 2005b, 2006, 2008, 2010, 2011; MIRANDA *et al.*, 2003, 2010).

3.2.2. PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS NÃO MAGNÉTICOS

Foram produzidos dois lotes de comprimidos não magnéticos, sem adição de ferrita na formulação. O Lote 02 (tabela 02) foi produzido utilizando uma matriz e punção de 12 mm de diâmetro, com excipientes em quantidade suficiente para apresentar o mesmo volume do comprimido magnético (Lote 01), sob uma força de 30 kN. O lote 02 foi produzido em conformidade com as medidas externas, diâmetro e altura, do lote 01. A ferrita utilizada no Lote 01 apresenta alta densidade e, dessa forma, a mesma massa de excipientes extrapolaria o volume máximo da câmara de compressão.

Tabela 02: Lote 02, composição dos comprimidos não magnéticos simulando o mesmo volume dos comprimidos do Lote 01.

Material	Fornecedor	(%)	g/dose
Metronidazol	Audaz	14,29	0,100
Celulose Microcristalina	Blanver	71,43	0,500
Estearato de Magnésio	Henrifarma	1,43	0,010
Aerosil®	Evonik Degussa GmbH	7,14	0,050
Explosol	Blanver	5,71	0,040
TOTAL		100,00	0,700

O Lote 03 (tabela 03) foi produzido com massa de 300 mg, sendo esse um valor frequente de massa total de comprimidos comerciais, que contém uma dose de fármaco equivalente a 100 mg. Esses comprimidos, foram produzidos utilizando matriz e punção de 9 mm de diâmetro e 20 kN de força de compressão. Esta força de compressão foi diferente, pois o comprimido tem volume menor e comprimi-lo com 30 kN deixaria o comprimido com dureza muito elevada.

Tabela 03: Lote 03, composição dos comprimidos não magnéticos simulando comprimidos de ordem de grandeza comercial.

Material	Fornecedor	(%)	g/dose
Metronidazol	Audaz	33,33	0,100
Celulose Microcristalina	Blanver	56,67	0,170
Estearato de Magnésio	Henrifarma	1,00	0,003
Aerosil®	Evonik Degussa GmbH	5,00	0,015
Explosol	Blanver	4,00	0,012
TOTAL		100,00	0,300

3.2.3. REVESTIMENTO

Os comprimidos foram revestidos por polímero de revestimento gastrossolúvel Opadry® TM (Colorcon), conforme orientação do fabricante, em uma única etapa, utilizando uma máquina de revestimento (PCCA, Brazil) mantendo a temperatura controlada entre 40-60°C. O revestimento dos três lotes foi previsto de forma idêntica, ajustados para massa e área do comprimido, de tal forma que cada lote tenha 3,5% de ganho de massa absoluta.

3.2.4. ENSAIOS FARMACOTÉCNICOS

Os comprimidos foram submetidos às análises de características físicas, de acordo com os parâmetros preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2010):

3.2.4.1. *Peso Médio*

O peso médio foi calculado mediante a pesagem individual de 12 comprimidos de cada lote (01, 02 e 03). Esse teste foi realizado para verificar a uniformidade dos comprimidos de cada formulação, podendo-se tolerar não mais que duas unidades fora do limite de variação de $\pm 5\%$.

3.2.4.2. Dureza

Dureza ou resistência à quebra determina o quão duros são os comprimidos, de modo a resistir à fratura durante processos de revestimento, embalagem, transporte, armazenagem e manipulação. No entanto, devem ter características suficientes para desintegrar e liberar o fármaco. A dureza mínima aceitável é de 45 N ou 4,5 Kgf, sendo os ensaios realizados em sextuplicata utilizando durômetro Dr. Schleuniger-Pharmatron modelo 6D (EUA).

3.2.4.3. Friabilidade

O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. A friabilidade dos comprimidos foi determinada utilizando um sistema automatizado, Friabilômetro EF-2 (Electrolab, Brasil) em 25 rpm durante 4 minutos e, logo após, pesados e a perda de peso (%) foi calculada.

3.2.4.4. Desintegração

O teste de desintegração permite verificar se os comprimidos desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote são submetidas à ação de aparelhagem específica. A desintegração deve ocorrer para que o fármaco se apresente totalmente disponível para dissolução e posterior absorção no trato gastrointestinal.

O teste de desintegração *in vitro* foi realizado num aparelho que consiste num sistema de cestas e tubos onde os comprimidos foram inseridos e movimentados verticalmente com frequência constante e percurso específico dentro de um recipiente contendo o meio gástrico simulado (pH = 1,2; HCl 0,1 N) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$.

3.2.4.5. Dissolução

O ensaio de dissolução do fármaco foi realizado para verificação do perfil de liberação *in vitro* em meio gástrico simulado (pH = 1,2; HCL 0,1 N). Os ensaios foram realizados utilizando um aparato USP II (pás), sob velocidade de agitação de 50 rpm, temperatura do banho mantida a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Durante o ensaio, alíquotas de 1,0 ml foram coletadas nos períodos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos para análise em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), utilizando um detector UV ajustado para leitura de comprimento de onda em 320 nm, seguindo o protocolo descrito no item 3.5.

3.3. BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA - BAC

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) consiste em bobinas de indução que aplicam um campo magnético de corrente alternada em um meio biológico e, através de bobinas de detecção mede-se o campo magnético proveniente da interação entre o primeiro campo induzido e o material ferromagnético, ferrita (Fe_2MnO_4), imerso no meio (MIRANDA *et al.*, 1992, 1997, 2003, 2010).

A figura 01 ilustra o diagrama de funcionamento de um dispositivo BAC. Nela, podemos notar que a aproximação de um material ferromagnético causa um desbalanceamento de fluxo magnético no sistema de medida, o qual é medido pela subtração com o sistema de referência.

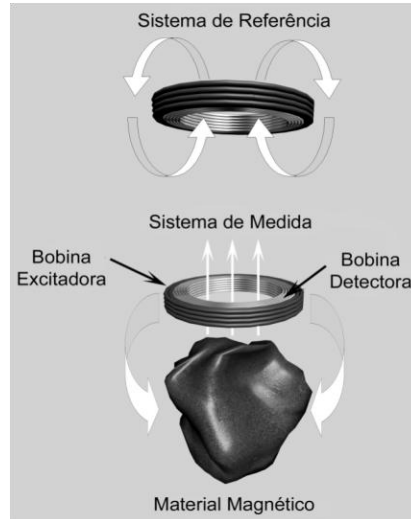


Figura 1: Diagrama funcional da Biosusceptometria AC. A aproximação de um material magnético no sistema de medidas causa um desbalanceamento de fluxo magnético e a resposta é monitorada.

Um dispositivo Monossensor BAC é constituído por dois pares de bobinas de indução separadas por uma linha de base fixa, sendo cada par de bobinas composto por uma bobina de excitação e uma bobina de detecção. As bobinas de detecção estão arranjadas em uma configuração gradiométrica de primeira-ordem e dispostas em um arranjo coaxial, ou seja, a bobina de excitação é externa, enquanto a bobina de detecção é interna (figura 2-i).

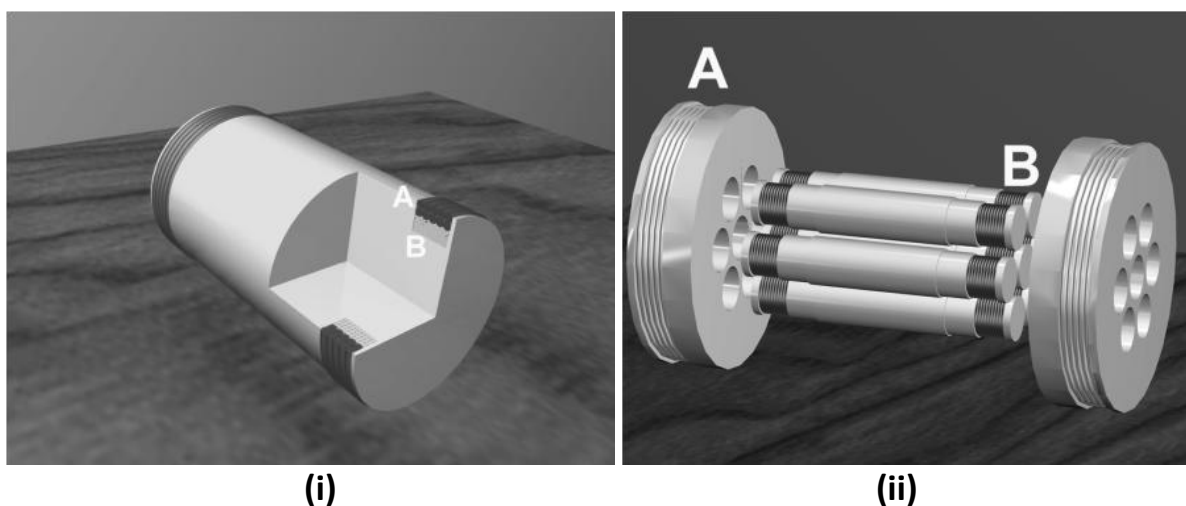


Figura 2: (i) Monossensor BAC (A: Bobina excitadora; B: Bobina detectora). (ii) Multissensor BAC mostrando o par de bobinas de excitação (A) e os sete pares de bobinas de detecção (B).

Esta concepção foi utilizada no desenvolvimento de um sistema Multissensor BAC, cuja finalidade foi aumentar a resolução espacial e a sensibilidade para aplicações farmacêuticas. A diferença entre o sistema BAC multissensores (Figura 2-ii) e o citado anteriormente é que o novo arranjo utiliza apenas um par de bobinas de excitação e sete pares de bobinas de detecção, utilizados para aquisição dos sinais em pontos distintos (CORÁ *et al.*, 2003).

3.4. ESTUDO DO TRÂNSITO GASTRINTESTINAL E DA BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL

Participaram do estudo 5 voluntários, sendo homens com idades entre 19 e 26 (média de 22 ± 3 anos), que não apresentavam qualquer disfunção motora e que não estavam utilizando medicamentos que pudessem interferir com o trânsito no TGI e, ainda, que não tinham restrições quanto à administração dos fármacos propostos (Metronidazol e Prucaloprida). Todos os participantes foram devidamente informados sobre as características da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme protocolo aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CAAE: 41563015.3.0000.5411).

O voluntário, ao aderir à participação na pesquisa, comprometeu-se em comparecer ao local às 8 horas da manhã, nas datas propostas e combinadas, em jejum mínimo de 8 horas e abstenção alcoólica nas últimas 24 horas. Cada voluntário foi convidado a 3 comparecimentos ao laboratório de pesquisa.

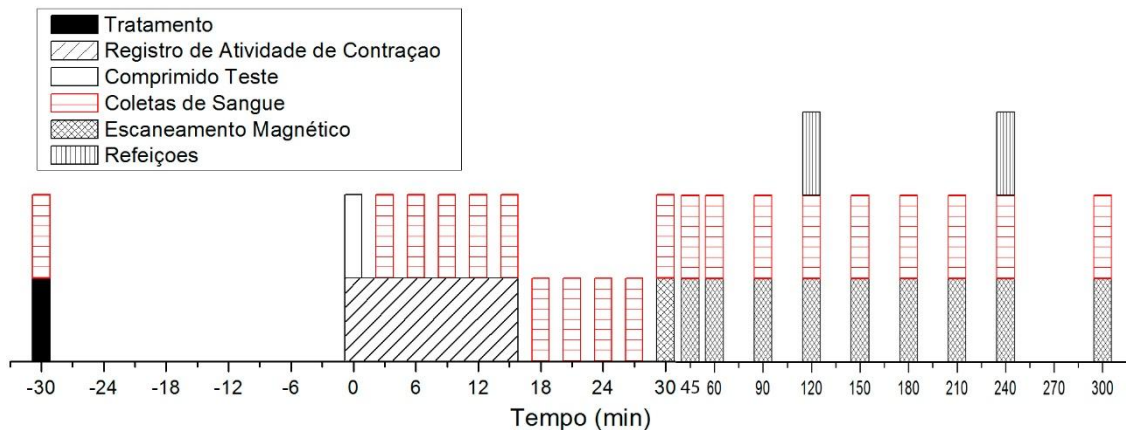


Figura 03: Linha temporal dos procedimentos experimentais.

No primeiro, foi fornecido um comprimido magnético, sem adição de Metronidazol, com o propósito de averiguar a eficiência na leitura magnética. O princípio de funcionamento da técnica é baseado na suscetibilidade do material magnético e sua intensidade é inversamente proporcional à distância. Dessa forma, em voluntários que apresentem espessa camada de gordura abdominal, o dispositivo não é capaz de adquirir o sinal magnético. Em caso de boa leitura, foi então anotado o posicionamento do comprimido no estômago, com base nas distâncias de referências anatômicas externas, como a cicatriz umbilical, o processo xifoide e o gradil costal.

Nos outros dois comparecimentos, os voluntários foram avaliados para o tratamento, em 2 etapas, denominadas de fases I e II. Os ensaios foram conduzidos de modo cego e randômico. Durante a realização do estudo, foi mantida moderada atividade e fornecido lanche e almoço padronizados. Entre cada comparecimento, houve um período de eliminação (*wash out*), correspondente a no mínimo 7 dias.

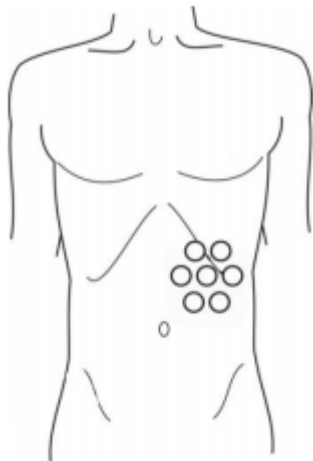


Figura 04: Posicionamento do BAC-Multissensor sobre a região de projeção gástrica, para aquisição da Atividade de Contração Gástrica.

Em conformidade com o protocolo proposto, ilustrado na figura 03, 30 minutos após o tratamento, com o voluntário em posição ortostática, um sistema BAC Multissensor foi posicionado sobre a região do estômago, com base nas referências prévias de escaneamento magnético da primeira visita, para aquisição do registro de sinais e demonstração da desintegração do comprimido magnético (figura 04).

Após o registro contínuo, foram tomados registros magnéticos pontuais sobre a região do estômago e do cólon proximal, utilizando um BAC Monossensor, conforme o procedimento experimental, nos tempos 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos. Esses registros permitiram calcular o Tempo de Esvaziamento Gástrico (TEG), Tempo de Trânsito do Intestino Delgado (TTID) e Tempo de Trânsito Oro-Cecal (TTOC).

Durante todo o procedimento experimental, foram tomadas amostras de sangue, através de uma punção venosa utilizando um cateter BD Intima® heparinizado, nos tempos 0 (pré-dose), 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 minutos, com o propósito de mensurar a curva de concentração sérica do Metronidazol.

As amostras foram imediatamente centrifugadas e o soro foi coletado e armazenado em freezer -80°C para posterior processamento e análise.

3.4.1. FASE I – PLACEBO

Nesta etapa, conforme descrito no procedimento experimental e ilustrado na figura 03, o voluntário recebeu um placebo, ingerido com 100 ml de água, e, após 30 min, recebeu o comprimido teste (lote 01), ingerido com 200 ml de água. Em seguida, conforme descrito acima, foram tomados os sinais magnéticos e coletas de sangue.

3.4.2. FASE II – PRUCALOPRIDA

Nesta etapa, seguindo o procedimento experimental, o voluntário foi tratado com um comprimido de Prucaloprida (Resolor® 1 mg, JANSSEN-CILAG), em vez de um placebo.

3.5. DETERMINAÇÃO DO METRONIDAZOL SÉRICO

Para a análise farmacocinética do Metronidazol, amostras de sangue seriadas foram coletadas e analisadas por cromatografia, conforme método adaptado por Ferrari, 2012 (dados não publicados).

3.5.1. PROTOCOLO DE ANÁLISE POR CLUE

3.5.1.1. Determinação do pico de absorção máxima do fármaco na região do ultravioleta (UV)

Foram realizadas análises do metronidazol (MT) por espectrofotometria na região do UV em pH ácido, simulando o fluido gástrico, para determinação do pico de absorção máxima do fármaco. Para tanto, uma solução diluída de MT em HCl 0,1 N pH 1,2 foi obtida e analisada na região do UV (200 e 400 nm) e o pico de absorção máxima foi registrado.

3.5.1.2. *Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação do fármaco por CLUE*

As amostras foram coletadas em tubo seco (BD® Vacutainer Serum, Clot Activator), centrifugadas a 4500 rpm, 10 minutos, 4°C, e o soro sobrenadante aliqotado em amostras de 500 µl em tubos de 1,5 ml e armazenadas em freezer -80°C até o processo de extração e análise por CLUE.

A extração do metronidazol das amostras coletadas dos voluntários foi realizada seguindo protocolo previamente estabelecido por El-Sayed (1988). Brevemente, adicionou-se 2,0 ml de acetonitrila a 500 µl de soro homogeneizando manualmente e, em seguida, em vórtex por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4500 rpm a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido, congelado a -80°C e liofilizado. Posteriormente, reconstituído com a fase móvel, misturado em vórtex por 1 minuto e transferido para um tubo do tipo Eppendorf. Em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C, 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para o *vial* de análise e injetado no cromatógrafo.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), utilizando o equipamento Waters® Acquity HClass, equipado com detector UV-Vis e Photodiode Array (Acquity UPLC® PDA). Para determinar o melhor comprimento de onda de absorção do metronidazol, inicialmente fez-se uma varredura entre 210-390 nm. O comprimento de onda do detector foi fixado em 320 nm e a área do pico foi analisada automaticamente. Os experimentos foram conduzidos em fase reversa, usando uma coluna Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm 2,1 x 50 mm; Waters®, EUA), com injetor automático, mantida a 25±1°C. A fase móvel foi eluída por modo isocrático em um fluxo de 0,5 ml.min⁻¹, sendo composta por água:acetonitrila (90:10, v/v). A solução estoque foi preparada na concentração de 1,0 mg.ml⁻¹, em que o metronidazol foi cuidadosamente pesado e

dissolvido em água deionizada. Esta solução foi diluída em água, 100 vezes, para obter a solução de fortificação na concentração de 10 ng.ml^{-1} .

O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e pela ANVISA (2003), dentre eles: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme descrito abaixo:

3.5.1.2.1 Linearidade

A linearidade do método, na faixa de concentração testada, foi avaliada pela análise da regressão linear. Foram construídas três curvas analíticas com soluções de metronidazol em água deionizada em diferentes concentrações: $C_1 = 0,25 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $C_2 = 0,50 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $C_3 = 1,25 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $C_4 = 2,50 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $C_5 = 5,00 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e $C_6 = 10,00 \text{ ng}/\mu\text{l}$. As soluções foram injetadas no cromatógrafo para obter a curva de concentração do metronidazol em função da área de pico.

3.5.1.2.2 Precisão

A precisão foi avaliada através de ensaios de precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária. No ensaio de precisão instrumental, foram feitas seis injeções consecutivas da solução padrão de metronidazol em três diferentes concentrações. Foram calculados a média, o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade foi avaliada através da análise de três injeções consecutivas da solução padrão do fármaco em seis diferentes concentrações em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de três injeções consecutivas da solução padrão do metronidazol em seis diferentes concentrações em três dias distintos.

3.5.1.2.3 Exatidão

A exatidão foi calculada como sendo a porcentagem de recuperação de quantidade conhecida do fármaco adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão do método foi determinada por 9 injeções contemplando seis concentrações, com 3 réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica. As porcentagens de recuperação foram calculadas conforme a Equação 1:

$$R\% = \frac{C}{C_0} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que R% = % de recuperação; C = concentração recuperada; C₀ = concentração teórica inicial.

3.5.1.2.4 Especificidade

Amostras de sangue provenientes de um ensaio com comprimidos sem fármaco foram processadas e injetadas no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes das formulações não interfiram na detecção e quantificação do metronidazol. A especificidade foi demonstrada pela comparação entre os cromatogramas de uma amostra contendo concentração conhecida do fármaco, de um cromatograma de amostra de sangue proveniente de ensaio com comprimido contendo metronidazol (Fase II) e de amostra de sangue proveniente do ensaio com o comprimido sem o fármaco.

3.5.1.2.5 Seletividade

Para ser possível selecionar o fármaco entre os componentes que poderiam estar presentes no ensaio de liberação, foi comparado um cromatograma de um resultado positivo (comprimido contendo metronidazol em meio gástrico simulado) com um cromatograma de um resultado negativo (comprimido sem o fármaco em meio gástrico simulado).

3.5.1.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos puderam ser calculados pelas Equações 2 e 3, respectivamente:

$$LD = \frac{DP.3}{IC} \quad (Eq. 2)$$

$$LQ = \frac{DP.10}{IC} \quad (Eq.3)$$

em que DP = desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC = inclinação da curva analítica.

3.5.2. PREPARAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DE METRONIDAZOL EM SORO

Para as análises das amostras de soro, preparou-se uma solução estoque de metronidazol de 1,0 mg/ml em água e a partir dela obteve-se uma solução a 10 ng/μl. Adicionou-se diferentes volumes desta solução de fármaco a 500 μl de soro pré-dose em tubos tipo Falcon obtendo desta maneira diluições nas concentrações de 0,25 a 25 ng/μl.

As análises das amostras ocorreram de acordo com o item 3.5.1.2.1. Na preparação das amostras de soro para quantificação do Metronidazol, a extração do metronidazol das amostras coletadas dos voluntários foi realizada conforme descrito na preparação analítica.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS

3.6.1. PERFIL DA DISSOLUÇÃO IN VITRO

Os fatores de diferença (f1) e similaridade (f2) foram calculados para avaliar a semelhança entre as curvas de dissolução (MOORE & FLANNER, 1996). Os perfis de

dissolução podem ser considerados semelhantes em virtude de: (1) similaridade em cada ponto de tempo de dissolução das amostras; (2) similaridade do perfil global (DIAZ *et al.*, 2016).

O fator $f1$ calcula a diferença percentual entre os dois perfis de dissolução em cada ponto de tempo e é uma medida do erro relativo entre os dois perfis (DIAZ, *et al.*, 2016):

$$f1 = \left\{ \sum_{t=1}^n |Rt - Tt| / \sum_{t=1}^n Rt \right\} \cdot 100$$

onde n é o número de pontos de tempo, Rt é o valor de dissolução média para o produto de referência no tempo t , e Tt é o valor de dissolução média para o produto de teste em que mesmo ponto de tempo. O valor $f1$ é igual a zero quando os perfis de teste e de referência são idênticos e aumenta à medida que os dois perfis de se tornar menos semelhante (DIAZ *et al.*, 2016).

O fator de $f2$ é uma transformação logarítmica e indica a medida da semelhança percentual de dissolução entre os dois perfis (DIAZ *et al.*, 2016):

$$f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + 1/n \cdot \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

Khan e Rhodes (1972) propuseram a eficiência de dissolução (ED) como outro parâmetro utilizado para fazer a comparação entre formulações, calculada a partir do perfil de dissolução, através do método dos trapézoides (soma da área de todos os trapézios) (KHAN & RHODES, 1997).

$$ED = \frac{AUC_{0-t}}{AUC_{total}} \cdot 100$$

3.6.2. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL

Os tempos de transito do Trato Gastrintestinal foram determinados a partir dos registros de sinais magnéticos adquiridos nas regiões de interesse, utilizando um dispositivo BAC monossensor. Assim, nas duas fases experimentais, o TEG (tempo que existe sinal magnético no estômago monitorado pelo dispositivo BAC monossensor), TTID (TTOC subtraído de TEG) e TTOC (tempo de início de registro de sinal magnético no cólon monitorado pelo dispositivo BAC monossensor) foram mensurados em cada voluntário.

3.6.3. DESINTEGRAÇÃO DO COMPRIMIDO TESTE IN VIVO

Para essa determinação, os sinais magnéticos obtidos pelo dispositivo BAC multissensor foram adquiridos por 15 minutos, utilizando um sistema BAC multissensor, programado com frequência de aquisição de 20 Hz/canal. Os dados foram armazenados em formato ASCII e analisados em ambiente MatLab (Mathworks, Inc.).

O Tempo de Início da Desintegração (TID) foi obtido através da inspeção visual do registro de sinais magnéticos do voluntário, sendo este considerado como o tempo em segundos onde ocorre a variação do sinal, pelo espalhamento do material magnético em todos os canais (conversão de marcador para traçador magnético).

3.6.4. BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL

A partir da curva de concentração sérica, obtida das análises de amostras de sangue, foi determinado o perfil de absorção do fármaco em função do tempo por meio dos parâmetros farmacocinéticos: t_{lag} , tempo de primeira mensuração do metronidazol sérico, C_{max} , definida como a concentração sérica máxima que o fármaco atinge após administração;

t_{max} , tempo necessário para alcançar a C_{max} ; AUC_{0-t} , área sob a curva de concentração sérica no tempo t , correspondente à medida da exposição do organismo ao fármaco.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O perfil de dissolução *in vitro* foi avaliado ponto a ponto (Concentração X Tempo), sextuplicata por lote, Análise de Variância de Duas Vias Ordinária, seguido de pós teste de Tukey. O mesmo teste foi realizado para Eficiência de Dissolução nos tempos 30, 45 e 60 minutos.

Para os parâmetros de Trânsito Gastrintestinal (TEG, TTID, TTOC, TID) e farmacocinéticos (t_{lag} , t_{max} , C_{max} , AUC_{0-t}), foi realizada estatística descritiva e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. As médias foram comparadas utilizando o teste t de *Student* pareado (controle X prucaloprida, mesmo voluntário).

Os dados foram considerados significativamente diferentes se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS IN VITRO

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO, ENSAIOS DE DUREZA E FRIABILIDADE.

A comparação em 3 lotes foi realizada para mensurar diferenças na caracterização física ao comparar comprimidos com dimensões e massas diferentes, como também, para mensurar o efeito do marcador magnético presente na formulação. Em todos os ensaios, verificou-se que os lotes apresentaram valores de acordo com os preconizados pela Farmacopeia (tabela 4).

Tabela 04: Valores médios obtidos para os parâmetros Farmacotécnicos de produção.

Lote	Massa g	Diâmetro mm	Altura mm	Dureza N	Friabilidade %	Revestimento %
01	1,004±0,003	12,12±0,01	6,08±0,04	140,3±0,2	0,18	3,5
02	0,705±0,002	12,14±0,01	6,37±0,06	139,8±0,4	0,17	3,5
03	0,303±0,003	9,08±0,01	4,89±0,03	140,7±0,3	0,11	3,5

Os ensaios com diferentes lotes foram conduzidos de modo a apresentar que as variações dimensionais, de massa e da adição do marcador magnético na formulação não produzem alterações entre os fatores físicos mensurados. O lote 02 apresenta comprimidos com massa e dimensões bastantes diferentes das encontradas em um comprimido comercial com 100 mg de ativo. Ainda assim, os parâmetros de dureza e friabilidade se mantiveram dentro dos limites de especificação determinados pela farmacopeia e em comparação aos parâmetros mensurados para o lote 03 (massa e dimensões similares a comprimidos comerciais).

Da mesma forma, a observação dos parâmetros mensurados para o lote 01, com adição de ferrita em sua formulação, se apresenta dentro dos limites de especificação.

Contudo, estudos considerando lotes com comprimidos de mesma massa, com formulação contendo ferrita e sem ferrita não foram possíveis de realizar, uma vez que a ferrita é densa e formulações com massa de excipientes equivalente extrapolava o volume máximo da matriz (câmara de compressão utilizada). Ademais, a utilização de uma matriz com câmara de maior capacidade, exigiria maior força de compressão para produzir comprimidos com as mesmas dimensões de diâmetro e altura.

Assim, os ensaios de caracterização corroboram a equivalência entre os parâmetros avaliados para os comprimidos produzidos com adição de marcador magnético e as formulações de padrão comercial.

4.1.2. ESTUDO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO (APARATO II)

Os 3 lotes de comprimidos estudados receberam a mesma solução de revestimento, preparados conforme orientação do fabricante e com atenção aos parâmetros e limites de especificação constantes da farmacopeia. O revestimento consistiu de uma preparação de Opadry® TM, para 3,5% de ganho de peso real, sendo cada lote revestido separadamente, de forma a normalizar o ganho de peso. Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.2.4.5.

As figuras 05, 06 e 07 apresentam os perfis de dissolução das amostras dos lotes 01, 02 e 03, respectivamente. As curvas de concentração foram avaliadas ponto a ponto (Concentração X Tempo), nas seis amostras de cada grupo, comparando os grupos entre si. A comparação entre os lotes 01 e 02 e entre os lotes 01 e 03 apresentou diferença significativa, ponto a ponto, com $p < 0,0001$. A comparação entre os lotes 02 e 03 não apresentou diferença significativa para mesma avaliação. O tempo para concentração máxima foi o mesmo entre os lotes ($t = 6$ min).

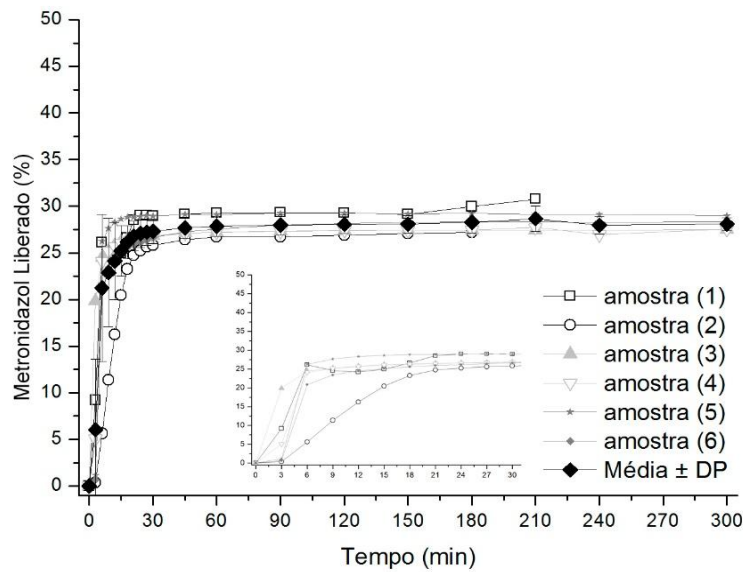


Figura 05: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos com núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 01. *Inset:* apresenta em detalhe os primeiros 30 minutos de ensaio.

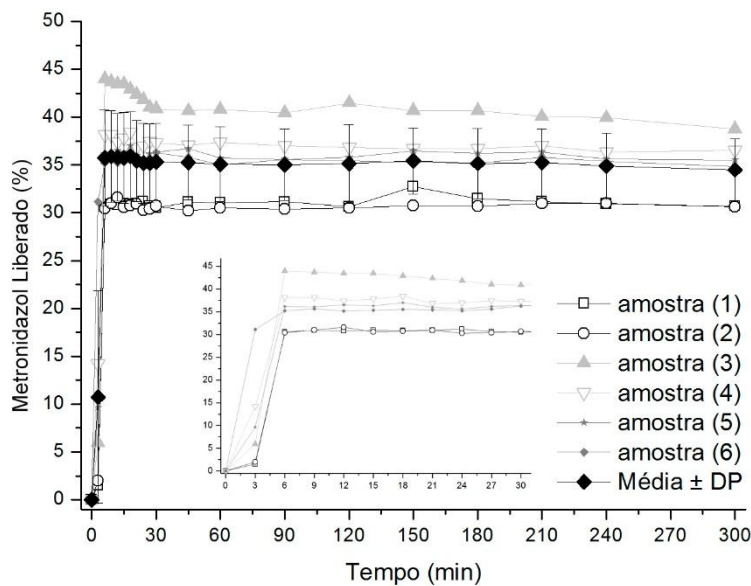


Figura 06: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos sem núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 02. *Inset:* apresenta em detalhe os primeiros 30 minutos de ensaio.

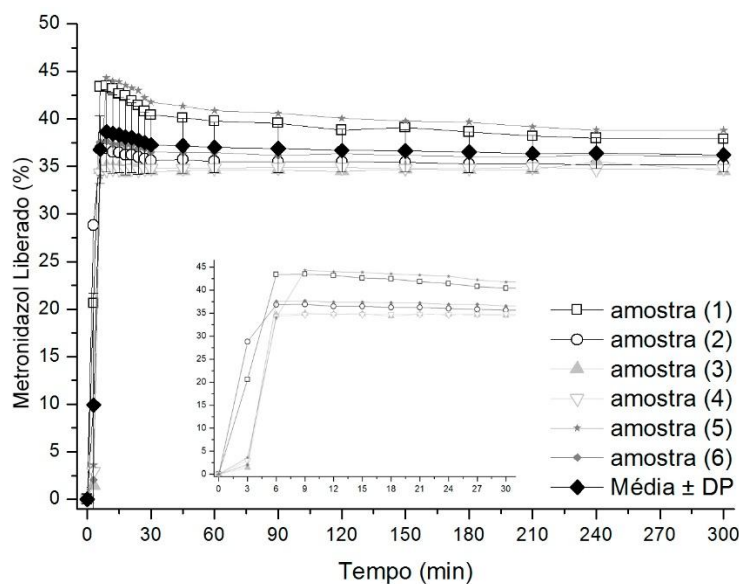


Figura 07: Perfil de dissolução e curva média para o conjunto de amostras de comprimidos produzidos sem núcleo de ferrita, correspondente ao Lote 03. *Inset:* apresenta em detalhe os primeiros 30 minutos de ensaio.

Os resultados das avaliações estão apresentados na tabela 5. As médias foram comparadas para cada lote, em cada tempo. Médias com letras diferentes em linha representam diferença significativa com $p < 0,05$.

Tabela 05: Perfil de dissolução dos lotes de comprimidos. As médias entre os lotes foram comparadas ponto a ponto (tempo). **Lote 01**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 1.000 mg com ferrita na formulação; **Lote 02**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 700 mg, sem ferrita na formulação; **Lote 03**, comprimidos de 9 mm de diâmetro, massa de 300 mg, sem ferrita na formulação. DP = Desvio Padrão da Média.

Perfil de Dissolução <i>in vitro</i> (% Metronidazol liberado)						
Tempo (min)	Lote 01		Lote 02		Lote 03	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
3	6,05 ^a	7,56	10,73 ^b	11,08	9,91 ^b	11,77
6	21,24 ^a	7,88	35,75 ^b	5,07	36,78 ^b	3,54
9	22,90 ^a	5,81	35,90 ^b	4,78	38,65 ^b	4,22
12	24,11 ^a	4,11	35,81 ^b	4,57	38,43 ^b	4,12
15	25,22 ^a	2,68	35,73 ^b	4,77	38,31 ^b	3,97
18	26,15 ^a	1,79	35,92 ^b	4,65	38,07 ^b	3,95
21	26,81 ^a	1,58	35,42 ^b	4,24	38,01 ^b	3,66
24	27,08 ^a	1,53	35,18 ^b	4,18	37,77 ^b	3,57
27	27,23 ^a	1,42	35,21 ^b	4,08	37,51 ^b	3,22
30	27,32 ^a	1,30	35,33 ^b	4,03	37,27 ^b	3,06
45	27,69 ^a	1,15	35,26 ^b	3,92	37,17 ^b	2,86
60	27,85 ^a	1,06	35,08 ^b	3,89	37,01 ^b	2,65
90	27,97 ^a	1,08	35,02 ^b	3,75	36,89 ^b	2,54
120	28,06 ^a	1,01	35,12 ^b	4,13	36,69 ^b	2,25
150	28,08 ^a	0,92	35,43 ^b	3,45	36,67 ^b	2,21
180	28,26 ^a	1,13	35,16 ^b	3,66	36,51 ^b	2,13
210	28,66 ^a	1,33	35,23 ^b	3,53	36,37 ^b	1,86
240	27,95 ^a	0,94	34,87 ^b	3,43	36,40 ^b	1,64
300	28,08 ^a	0,71	34,50 ^b	3,24	36,20 ^b	1,75

Letras diferentes em linha representam diferença significativa com $p < 0,05$.

4.1.2.1. FATORES DE CORRELAÇÃO DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO

A caracterização de uma forma farmacêutica sólida com base nos parâmetros farmacopeicos está baseada em formulações equilibradas em proporção de fármaco e excipientes, considerando as necessidades de fluxo, coesão, adesão e estabilidade. Dessa

forma, uma formulação de 1.000 mg, contendo 50% de um marcador magnético de alta densidade, desperta a necessidade de investigar suas possíveis diferenças ou similaridades com as formulações convencionais.

Dessa forma, avaliamos os parâmetros de dissolução *in vitro* segundo os fatores de diferença (f1) e de similaridade (f2) proposto por Moore e Flanner (1996), conforme descrito no item 3.6.1.

A tabela 6 sumariza os valores de f1 e f2 nas comparações entre os lotes. Em cada comparação, os fatores são calculados apresentando uma formulação como teste (Tt) e outra como referência (Rt).

Tabela 6: Fatores de diferença e similaridade em comparação aos lotes 01, 02 e 03. As siglas Tt e Rt indicam lote teste e lote de referência respectivamente. **Lote 01**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 1.000 mg com ferrita na formulação; **Lote 02**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 700 mg, sem ferrita na formulação; **Lote 03**, comprimidos de 9 mm de diâmetro, massa de 300 mg, sem ferrita na formulação.

Tt	Rt	f1	f2
Lote 01	Lote 02	24	53
Lote 01	Lote 03	28	49
Lote 02	Lote 03	5	84

De acordo com as orientações emitidas pelas 14 autoridades reguladoras apresentadas no estudo de Diaz *et al.*, 2016, os valores f1 até 15 (0 - 15) e f2 valores superiores a 50 (50 - 100) garantem a igualdade ou equivalência dos dois perfis.

O estudo expõe que há fatores de diferença, $f1 > 15$, nas comparações entre os lotes 01 X 02 e 01 X 03 e de não existir diferença entre os lotes 02 X 03, $f1 < 15$. Esse resultado presume que a adição de ferrita na formulação pode promover diferenças na dissolução do comprimido teste, uma vez que as variações de massa e dimensão não registraram diferenças (lote 02 X 03).

A análise do fator f_2 , contudo, constata $f_2 > 50$ entre os lotes 01 X 02, fator que caracteriza que os perfis de dissolução são similares. Assim, essa análise permite dizer que a adição de ferrita não traduz diferença no perfil de dissolução.

Para comparação entre os lotes 02 X 03 os fatores f_1 e f_2 não apresentam diferença ($f_1 < 15$) e apresentam similaridade ($f_2 > 50$), caracterizando que o perfil de dissolução não difere entre esses lotes.

Corroborando a diferença entre os lotes, as concentrações máximas de dissolução entre formulação com e sem ferrita. Contudo, o fator $f_2 > 50$, indica uma semelhança global entre os perfis de liberação do metronidazol.

Além das análises pelos fatores de diferença e de similaridade propostos por Moore e Flanner (1996), uma forma alternativa de avaliar o perfil de dissolução foi proposta por Khan e Rhodes (1972), denominada como Eficiência de Dissolução. O método está descrito no item 3.6.1.

A tabela 7 apresenta as médias avaliadas em 3 tempos diferentes, entre o início da dissolução até um tempo após a concentração máxima obtida. Notadamente, a eficiência de dissolução para os tempos analisados apresentou significativa diferença entre os lotes com e sem ferrita na formulação, corroborando as análises anteriores de que a adição de ferrita na formulação alterou o perfil de dissolução.

Tabela 7: Quantificação das médias no parâmetro de eficiência de dissolução para cada lote de comprimidos. As comparações foram feitas nos tempos 30, 45 e 60 minutos, entre o início da dissolução e após o registro da concentração máxima. **Lote 01**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 1.000 mg com ferrita na formulação; **Lote 02**, comprimidos de 12 mm de diâmetro, massa de 700 mg, sem ferrita na formulação; **Lote 03**, comprimidos de 9 mm de diâmetro, massa de 300 mg, sem ferrita na formulação. DP = Desvio Padrão da Média.

Eficiência de Dissolução (%)

Tempo (min)	Lote 01		Lote 02		Lote 03	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
30	7,99 ^a	0,88	8,96 ^b	0,34	9,09 ^b	0,49
45	12,99 ^a	0,88	14,05 ^b	0,37	14,22 ^b	0,51
60	18,03 ^a	0,86	19,12 ^b	0,38	19,34 ^b	0,54

Letras diferentes em linha representam diferença significativa com $p < 0,05$.

Os ensaios *in vitro* realizados tiveram por motivação demonstrar a equivalência entre os comprimidos teste (com adição de ferrita na formulação) utilizados e comprimidos convencionais, uma vez que o marcador magnético deve ser incorporado à formulação para possibilitar seu mapeamento no Trato Gastrointestinal.

Embora as avaliações tenham demonstrado diferenças significativas entre os perfis dos lotes estudados, através de avaliações estatísticas, o fator de similaridade, ainda que próximo do limite inferior, caracterizou os lotes como similares. É importante resgatar, que $f_2 = 50$, limite inferior, está vinculado a uma variação máxima de 10% entre os lotes.

Essas variações, especialmente aquelas em relação a concentração máxima de metronidazol dissolvido ser menor no lote 01, podem estar associadas a um arraste de material aderido aos grânulos de ferrita. Duas ocorrências experimentais chamaram atenção durante o estudo: 1, ainda que com agitação no aparato II, uma pequena quantidade de precipitado se formou na base do vaso de dissolução; 2, todas as amostras coletadas (lotes 01, 02 e 03) foram centrifugadas antes de serem filtradas para análise por cromatografia,

uma vez que a ferrita causava entupimento do filtro e impedia o processo. Assim, em todas amostras do lote 01 foi possível observar um pequeno pélete no fundo do tubo.

Dessa forma, é importante atentar para possibilidade de alguma porção de Metronidazol não ter sido dissolvida por estar aderida à ferrita. Assim, novos estudos modificando parâmetros nessas etapas, poderiam apresentar novos fatos sobre esses fatores não controlados e, eventualmente, ensaios *in vivo* de equivalência poderiam demonstrar variações sobre isso.

4.2. ENSAIOS IN VIVO

Considerando os efeitos colocinéticos e possíveis efeitos procinéticos conhecidos da Prucaloprida (PRIEM *et al.*, 2012; QUIGLEY *et al.*, 2012; KESSING *et al.*, 2014) na região proximal do tubo digestório, foram investigados os efeitos fisiológicos do tratamento e suas relações de interferência na Biodisponibilidade do Metronidazol, fármaco utilizado como marcador farmacocinético neste estudo.

4.2.1. EFEITO DO TRATAMENTO POR PRUCALOPRIDA NO TRÂNSITO

GASTRINTESTINAL

Utilizando um BAC monossensor, foram tomados registros de sinal magnético nas regiões de projeção gástrica e do cólon proximal, para determinar os parâmetros de Tempo de Esvaziamento Gástrico (TEG) e de Tempo de Trânsito Oro-Cecal (TTOC), sendo assim, por consequência, determinado o tempo de trânsito segmentar (TTID, Tempo de Trânsito do Intestino Delgado). A figura 08 apresenta as médias dos tempos de trânsito mensurados em

cada ensaio, onde se pode notar diferença significativamente pronunciada no efeito do tratamento sobre o TEG. As quantificações estão apresentadas na tabela 8.

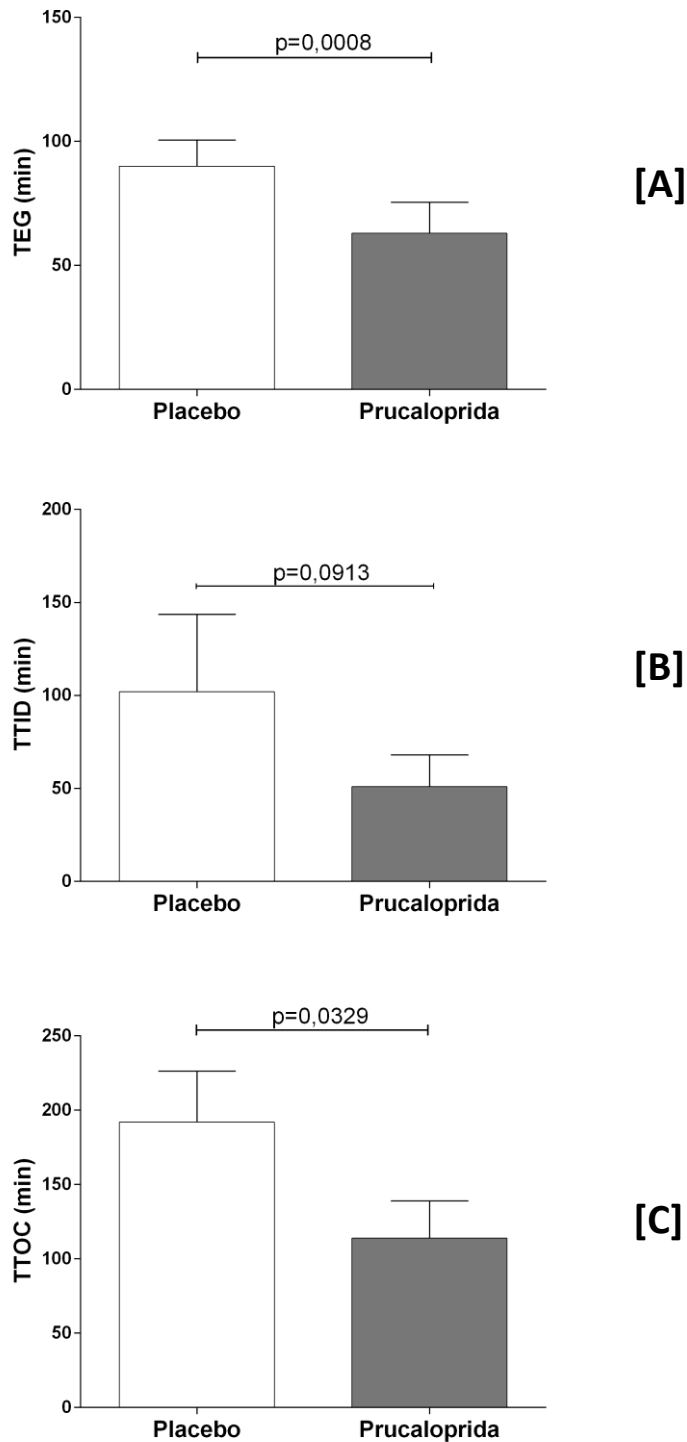


Figura 08: Tempo de trânsito do material ferromagnético em diversos seguimentos do Trato Gastrointestinal mensurados a partir do BAC Monosensor. **A** - Tempo de Trânsito gástrica (TEG). **B** - Tempo de Transito no intestino delgado (TTID). **C** - Tempo de Trânsito Oro-Cecal (TTOC).

Tabela 8: Quantificação das médias para os parâmetros de Trânsito Gastrointestinal. TEG = Tempo de Esvaziamento Gástrico; TTID = Tempo de Trânsito do Intestino Delgado; TTOC = Tempo de Trânsito Oro-Cecal; DP = Desvio Padrão da Média. Valores expressos em minutos.

Voluntário	Placebo			Prucaloprida		
	TEG	TTID	TTOC	TEG	TTID	TTOC
1	90	90	180	60	60	120
2	105	45	150	75	45	120
3	75	135	210	45	45	90
4	90	150	240	60	30	90
5	90	90	180	75	75	150
Média	90^a	102^a	192^a	63^b	51^a	114^b
DP	11	42	34	13	17	25

Letras diferentes em cada parâmetro representam diferença significativa com $p < 0,05$.

Os registros de TEG demonstram o forte efeito da prucaloprida na fisiologia do TGI e, embora ainda não existam claras referências de sua ação no estômago, pode-se presumir uma possível coordenação antro-piloro-duodenal, capaz de propelir mais rapidamente o material ingerido no sentido aboral. Registros de efeitos pronunciados já foram apresentados anteriormente por Bouras *et al.*, 2001, com significativa redução sobre o TEG em pacientes com constipação crônica.

Consequentemente, a redução no TEG se sobrepõe a mensuração do TTOC, que também apresentou significativa redução sob efeito de Prucaloprida. Contudo, ao observarmos o TTID, podemos notar que não ocorreu variação significativa sob efeito do tratamento. Assim, não foi registrado nenhum efeito da Prucaloprida sobre o trânsito segmentar (intestino delgado).

A figura 09 apresenta o estudo de trânsito do comprimido marcado para o voluntário 02. Pode-se visualizar na apresentação as indicações do TEG e TTOC nas duas fases do ensaio.

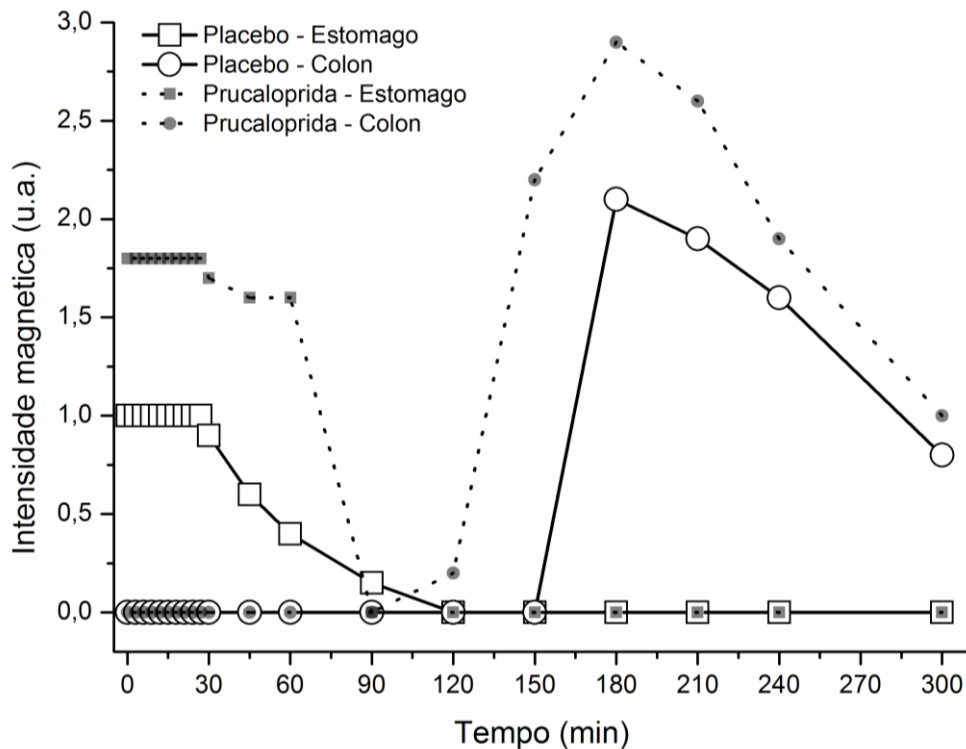


Figura 09: Perfil de Trânsito Gastrointestinal para o voluntário 02. A curva cinza apresenta o ensaio sob tratamento com o Placebo. A curva em verde, o ensaio sob tratamento com Prucaloprida. TEG (Tempo de Esvaziamento Gástrico); TTOC (Tempo de Trânsito Oro-Cecal).

À luz dessas informações, pode-se, portanto, presumir que os efeitos mais significativos da Prucaloprida ocorrem no estômago e no cólon e, por conseguinte, outros trabalhos que mensurem de maneira mais abrangente efeitos dose-dependente sobre a atividade de contração nesses segmentos, podem colaborar no entendimento dos mecanismos que regulam sua ação no estômago.

4.2.2. DESINTEGRAÇÃO DE COMPRIMIDOS IN VIVO (BAC)

Utilizando um BAC Multissensor, foi monitorado o Tempo de Início da Desintegração (TID), caracterizado pelo tempo em segundos para que ocorra o início da desintegração do comprimido, através da inspeção visual da aquisição de sinais magnéticos do voluntário, conforme ilustrado na figura 10. A tabela 9 sumariza os valores obtidos para cada voluntário, nas duas etapas, e suas respectivas médias e desvio padrão.

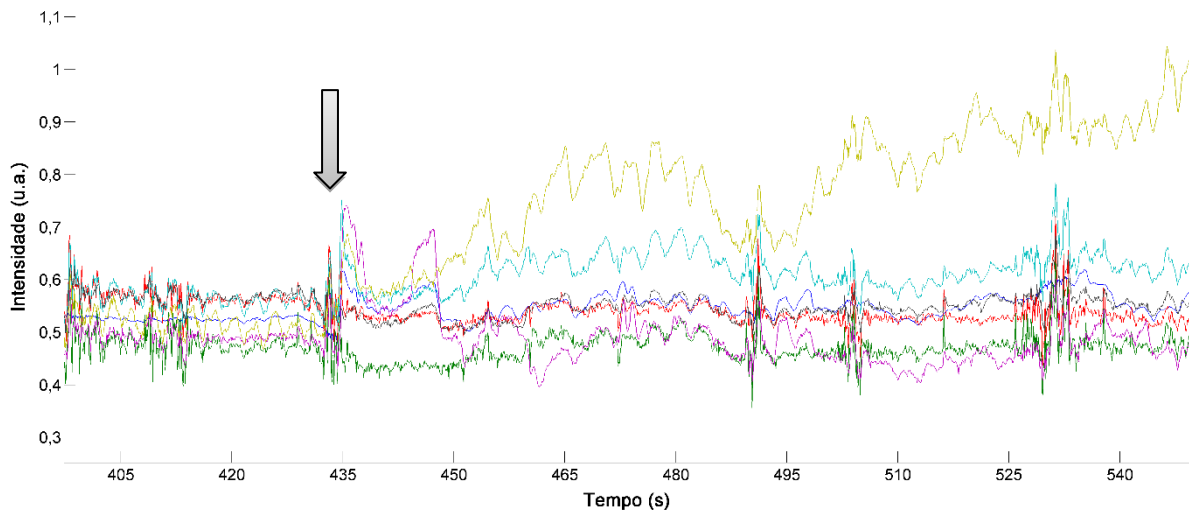


Figura 10: Aquisição de sinal magnético do voluntário 02, sob tratamento com Prucaloprida. A seta indica o momento em que ocorre a Desintegração do comprimido magnético, determinada por inspeção visual da abertura do espectro de sinal em virtude do espalhamento da ferrita no lúmen gástrico.

Tabela 9: Quantificação das médias no parâmetro de Tempo de Início de Dissolução para cada tratamento. DP = Desvio Padrão da Média.

Tempo de Início da Desintegração (TID, minutos)		
Voluntários	Placebo	Prucaloprida
1	12,3	10,2
2	14,7	7,3
3	9,6	7,3
4	8,5	9,5
5	9,0	9,6
Média ± DP	11 ± 2,6 ^a	8,8 ± 1,4 ^a

Letras diferentes em linha representam diferença significativa com $p < 0,05$.

A comparação entre as médias dos grupos demonstra que não houve diferença significativa no TID dos comprimidos revestidos ($p > 0,05$). Isso sugere que a administração da prucaloprida não interferiu nos processos de desintegração do comprimido. Supostamente, os efeitos do fármaco no estômago que levaram à diminuição do TEG podem não ter gerado modificações na frequência e força de contração, uma vez que poderíamos supor que o aumento desses parâmetros poderia influenciar mais efetivamente sobre o TID.

Dessa forma, conforme já mencionado anteriormente, este registro aponta a necessidade de realização de outros experimentos que possam ilustrar indícios dos mecanismos modificados pelo efeito da Prucaloprida no estômago.

4.2.3. INFLUÊNCIA DA PRUCALOPRIDA NA BIODISPONIBILIDADE DO METRONIDAZOL

A biodisponibilidade é um parâmetro que expressa a quantidade de fármaco absorvido, ou seja, a extensão da absorção atingida após administração da dose, que está relacionada à velocidade do processo de absorção (BRASIL, 2010).

Notadamente, a biodisponibilidade pode ser modificada por variações na motilidade do trato gastrointestinal, uma vez que esses parâmetros influenciam diretamente o tempo de residência segmentar e, por conseguinte, a exposição à superfície de absorção com diferentes valores de pH (QUIGLEY *et al.*, 2012). Assim, conforme já determinado neste trabalho, uma variação significativa no TEG ou no TTID podem causar variações significantes na biodisponibilidade de um fármaco.

A figura 11 apresenta o perfil de concentração em função do tempo para o voluntário 01. Note que ao receber o tratamento por prucaloprida, ocorreu uma diminuição no tempo de início da absorção (t_{lag}) e no tempo para Concentração Máxima (t_{max}).

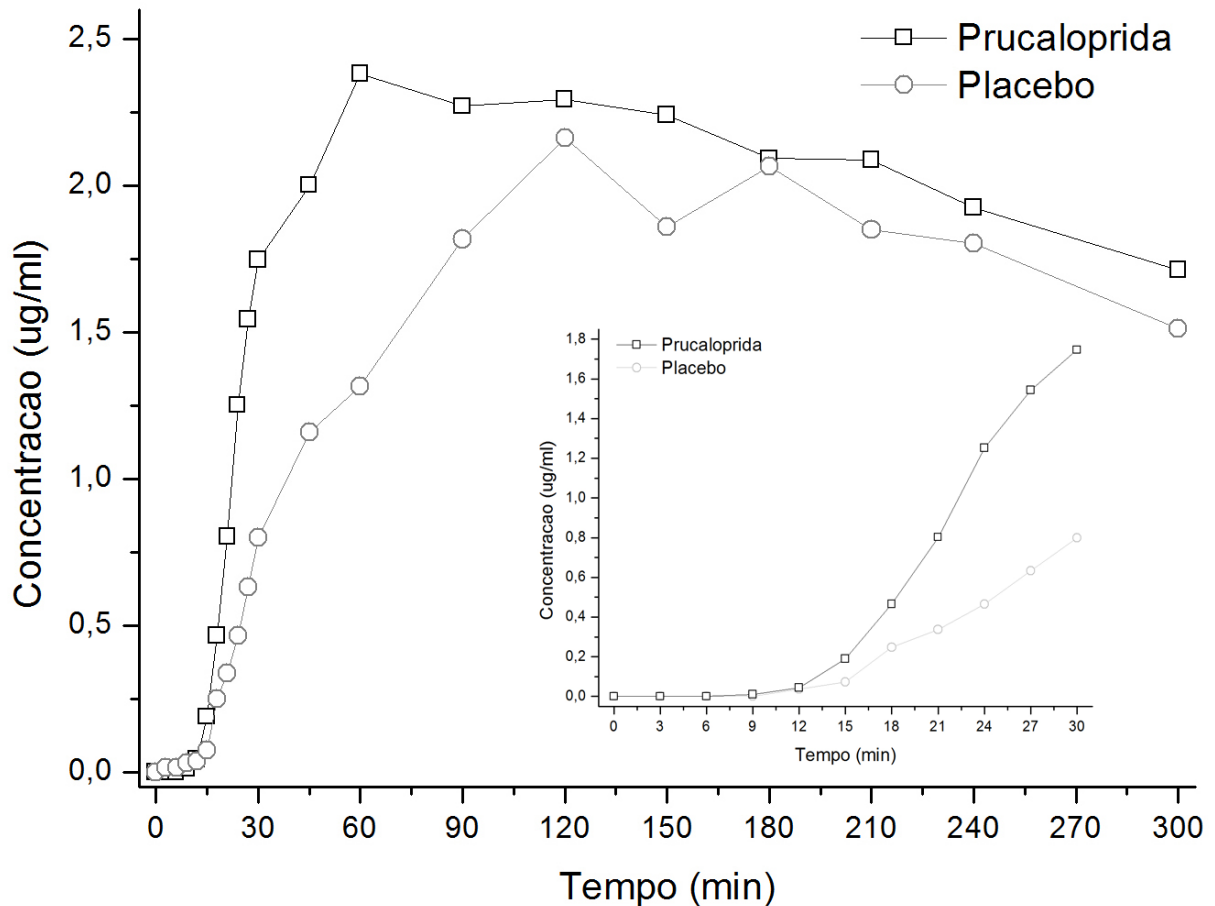


Figura 11: Perfil de concentração de Metronidazol para o voluntário 01. A curva com círculos abertos apresenta o perfil de concentração para o ensaio feito com Placebo. A curva com o quadrado aberto apresenta o perfil para o ensaio sob tratamento com Prucaloprida. *Insert:* apresenta em detalhe os primeiros 30 minutos de ensaio.

A diminuição significativa nos parâmetros de tempo de início da absorção (t_{lag} , figura 12, painel [A]) e o tempo de concentração máxima (t_{max} , figura 12, painel [B]), no tratamento com Prucaloprida, pode ser explicada pela significativa diminuição no TEG e consequente vantagem na exposição à superfície de absorção intestinal mais precoce. Entretanto, o parâmetro de concentração máxima (C_{max} , figura 12, painel [F]) não apresentou aumento significativo no tratamento com Prucaloprida, uma vez que a quantidade de fármaco ofertada foi idêntica.

Ao avaliar o parâmetro de Área Sob a Curva (AUC), em diferentes intervalos, foi possível observar que ocorreram modificações significativas na quantidade de fármaco absorvido para AUC_{0-30} (figura 12, painel [C]), AUC_{0-60} (figura 12, painel [D]) e AUC_{0-300} (figura 12, painel [E]). O tratamento com Prucaloprida influenciou significativamente a taxa de fármaco absorvido. Esse fato, pode estar envolvido ao rápido esvaziamento gástrico e exposição à ampla superfície de absorção intestinal. A tabela 10 sumariza a distribuição e médias para os parâmetros farmacocinéticos.

Tabela 10: Tempos do início da Desintegração do comprimido (TID) e trânsito da ferrita no Trato Gastrointestinal (TTOC) e Tempo para início da Absorção (t_{lag}) e Concentração máxima do fármaco Metronidazol (t_{max}). Todos os dados estão expressos em minutos.

Voluntário		1	2	3	4	5	Média	DP
Placebo	t_{lag}	18	18	21	12	15	17^a	3
	t_{max}	120	120	90	90	90	102^a	16
	C_{max}	2,13	2,13	2,19	2,15	2,17	2,15^a	0,24
	AUC_{0-30}	5,70	1,24	4,91	4,05	3,77	3,93^a	1,69
	AUC_{0-60}	37,33	29,77	43,20	38,12	35,64	36,81^a	4,84
	AUC_{0-300}	467,37	473,41	441,49	447,52	470,02	459,96^a	14,43
Prucaloprida	t_{lag}	15	9	9	12	9	11^b	3
	t_{max}	60	15	30	45	60	42^b	20
	C_{max}	2,15	3,28	2,12	2,11	2,05	2,34^a	0,52
	AUC_{0-30}	15,02	48,04	18,89	23,68	29,47	27,02^b	12,93
	AUC_{0-60}	74,87	86,54	90,44	87,74	79,94	83,91^b	6,36
	AUC_{0-300}	571,77	519,43	511,49	540,24	529,07	534,40^b	23,49

Letras diferentes em cada parâmetro representam diferença significativa com $p < 0,05$.

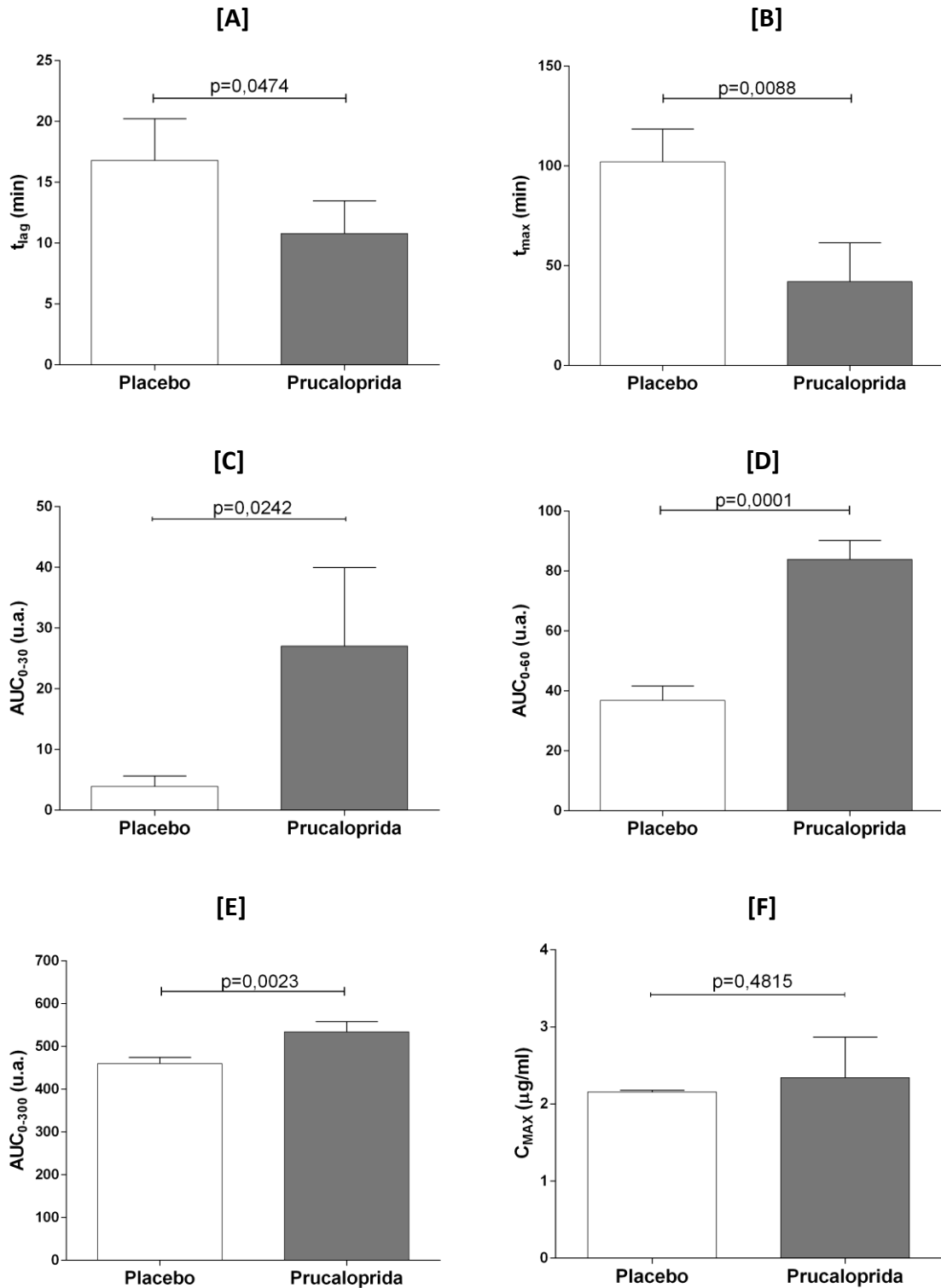


Figura 12: Quantificação do parâmetros farmacocinéticos da curva de concentração sérica de metronidazol, Placebo X Prucaloprida. **[A]** t_{lag} (tempo que ocorre o início da absorção); **[B]** t_{max} (tempo que ocorre a concentração máxima); **[C]** AUC_{0-30} (Área sob a curva da concentração no intervalo de 0 a 30 minutos); **[D]** AUC_{0-60} (Área sob a curva da concentração no intervalo de 0 a 60 minutos); **[E]** AUC_{0-300} (Área sob a curva da concentração no intervalo de 0 a 300 minutos); **[F]** C_{max} (Concentração máxima registrada).

Na figura 13 estão ilustradas as curvas médias da liberação durante o ensaio de dissolução (*in vitro*, curva azul) e as curvas de concentração sérica do metronidazol (*in vivo*, placebo = curva tracejada, Prucaloprida = curva contínua). Nessa figura, podemos observar as diferenças entre os perfis de dissolução e de absorção, bem como a influência do tratamento por Prucaloprida na biodisponibilidade do Metronidazol.

Conhecer a correlação entre esses perfis é fundamental para a avaliação da eficácia de um comprimido, considerando o projeto terapêutico necessário em cada tratamento.

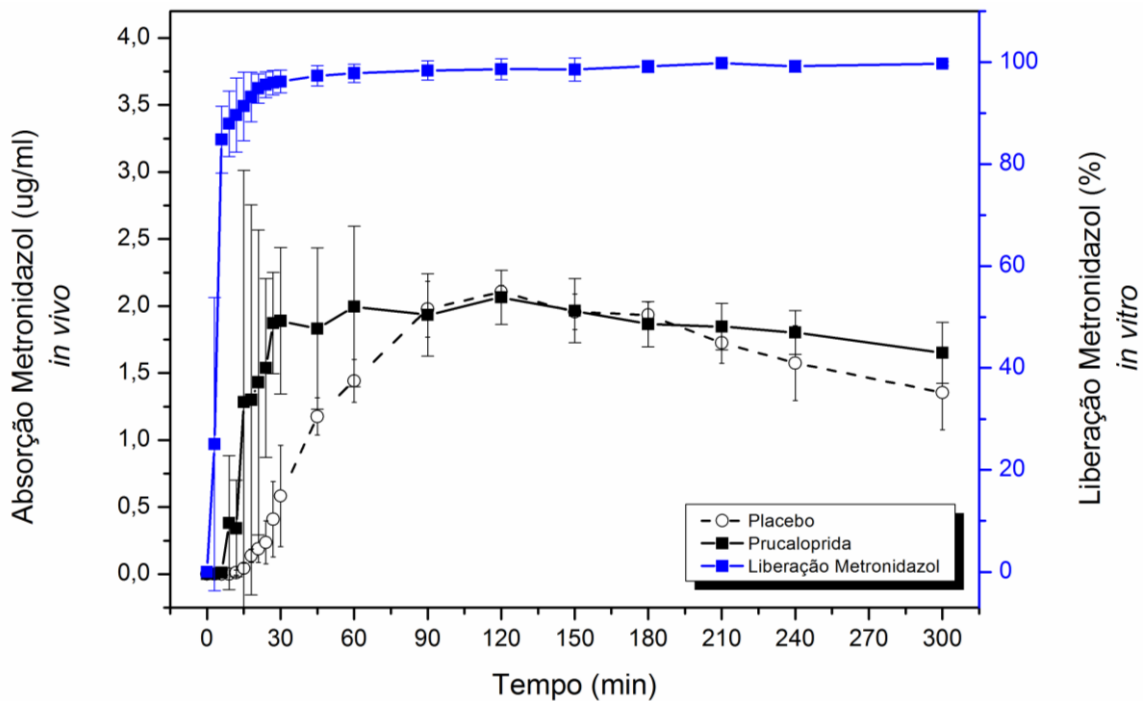


Figura 13: Perfis médios de concentração do Metronidazol: dissolução *in vitro* e Biodisponibilidade *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Os ensaios farmacotécnicos realizados para determinar a equivalência entre comprimidos com adição de ferrita na formulação (lote 01) e comprimidos convencionais (lotes 02 e 03) apresentaram diferenças no perfil de dissolução *in vitro* entre os lotes estudados. As avaliações do perfil de dissolução foram estudadas em 3 situações: avaliação estatística das médias de concentração de MT ponto a ponto (tempo), avaliação dos fatores de diferença (f1) e similaridade (f2), proposto por Moore e Flanner (1996), e avaliação da eficiência de dissolução (ED), proposto por Khan e Rhodes (1972).

Segundo essas avaliações, o perfil de dissolução *in vitro* foi significativamente diferente entre os lotes estudados, com diferenças pronunciadas na concentração de dissolução do MT e no modelo exponencial de dissolução no intervalo de 0 a 30 minutos. Essas diferenças, foram igualmente mensuradas pelo estudo de ED, mesmo considerando se tratar de uma razão entre as proporções de MT absorvido.

Contudo, o fator de similaridade, f2, proposto por Moore e Flanner (1996) caracterizou os perfis de dissolução como similares (f2 = 53). Isso se deve ao fato de f2 ser uma transformação logarítmica e indicar a medida da semelhança percentual global de dissolução entre os dois perfis (DIAZ et al., 2016). Assim, com uma diferença máxima de 10%, os lotes 01 e 02 são considerados similares na avaliação das agências reguladoras. Isso posto, podemos considerar que a adição de marcador magnético na formulação não levou a diferenças na caracterização farmacotécnica dos comprimidos.

A Prucaloprida, em dose de 1 mg, apresentou efeitos significativos no Trânsito Gastrointestinal e em parâmetros da biodisponibilidade do Metronidazol (MT), entretanto, não alterou o processo de desintegração do comprimido teste.

Os ensaios *in vivo* determinaram significativa aceleração no Tempo de Esvaziamento Gástrico (TEG), mensurada por um dispositivo BAC monossensor durante 5 horas de registro magnético e mudança significativa na biodisponibilidade do metronidazol.

Os efeitos pronunciados sobre o TEG promoveram a rápida exposição do conteúdo gástrico ao intestino delgado e, dessa forma, alterou significativamente a taxa de absorção do MT, determinada pela diminuição no tempo de concentração máxima (t_{max}) e pelo favorecimento na extensão de absorção (quantidade de MT absorvido), registrado pela Área Sob a Curva no período de avaliação (ASC_{0-300}).

Esses ensaios fortalecem a elegibilidade de utilização dos dispositivos BAC para avaliar parâmetros fisiológicos de funcionamento do TGI e suas consequências no processo de desintegração de comprimidos magnéticos no estômago, sendo importante resgatar o fato de realizar monitoramento em tempo real, de forma não invasiva e inócua.

6. REFERÊNCIAS

- AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; ROMEIRO, F.G.; BAFFA, O.; CORÁ, L.A.; MIRANDA, J.R.A. *Scintigraphic validation of AC Biosusceptometry to study the gastric motor activity and the intragastric distribution of food in humans*. Neurogastroenterol. Motil., v. 19, p. 804-811, 2007.
- AMÉRICO, M.F.; MIRANDA, J.R.A.; CORÁ, L.A.; ROMEIRO, F.G. *Electrical and mechanical effects of hyoscine butylbromide on the human stomach: a non-invasive approach*. Physiol. Meas., v. 30, p. 363-70, 2009.
- ANDREIS, U.; AMÉRICO, M.F.; CORÁ, L.A.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *Gastric motility evaluated by electrogastrography and alternating current biosusceptometry in dogs*. Physiol. Meas., v. 29, p. 1023-1031, 2008.
- BAFFA, O.; OLIVEIRA, R.B.; MIRANDA, J.R.A.; TRONCON, L.E.A. *Analysis and development of an AC Biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements*. Med. Biol. Eng. Comput., v. 33, p. 353-357, 1995.
- BELIKOV, V.G.; KUREGYAN, A.G. *Generation and medicobiological application of magnetic fields and carriers (Review)*. Pharm. Chem. J., v. 35, p. 27-34, 2001.
- BERGSTRAND, M.; SÖDERLIND, E.; WEITSCHIES, W.; KARLSSON, M. O. *Mechanistic modeling of a magnetic marker monitoring study linking gastrointestinal tablet transit, in vivo drug release, and pharmacokinetics*. Cl. Pharm. Therap., v. 86, p. 77-83, 2009.
- BOURAS, E. P.; CAMILLERI, M.; BURTON, D.D.; THOMFORDE, G.; MCKINZIE, S.; ZINSMEISTER, A. R. *Prucalopride accelerates gastrointestinal and colonic transit in patients with constipation without a rectal evacuation disorder*. Gastroent., v. 120, p. 354-360, 2001.
- CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MORAES, R.; ROMEIRO, F.G.; MIRANDA, J.R.A. *Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry*. Eur. J. Pharm. Biopharm., v. 56, p. 413-420, 2003.
- CORÁ, L.A.; ROMEIRO, F.G.; STELZER, M.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *AC Biosusceptometry in the study of drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., v. 57, p. 1223-1241, 2005a.
- CORÁ, L.A.; ANDREIS, U.; ROMEIRO, F.G.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by AC Biosusceptometry*. Phys. Med. Biol., v. 50, p. 5523-5534, 2005b.
- CORÁ, L.A.; ROMEIRO, F.G.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; STELZER, M.; MIRANDA, J.R.A. *Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by AC Biosusceptometry*. Eur. J. Pharm. Sci., v. 27, p. 1-8, 2006.
- CORÁ, L.A.; FONSECA, P.R.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *Influence of compression forces on tablets disintegration by AC Biosusceptometry*. Eur. J. Pharm. Biopharm., v. 69, p. 372-379, 2008.

- CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F.; ROMEIRO, F.G.; OLIVEIRA, R.B.; MIRANDA, J.R.A. *Pharmaceutical applications of AC Biosusceptometry*. Eur. J. Pharm. Biopharm., v. 74, p. 67-77, 2010.
- CORÁ, L. A.; Américo, M.F.; Oliveira, R.B.; Serra, C.H.R.; Baffa, O.; Evangelista, R.C.; Oliveira, .F.; Miranda, J.R.A. *Biomagnetic Methods: Technologies Applied to Pharmaceutical Research*. Pharm. Res., v. 28, p. 438-455, 2011.
- DAVIS, S. S. *Formulation strategies for absorption windows*. Drug Discov. Today., v. 10, p. 249–257, 2005.
- DIAZ, D. A.; COLGAN, S. T.; LANGER, C. S.; BANDI, N. T.; LIKAR, M. D.; ALSTINE, L. V. *Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations?* The AAPS Journal, v. 18, p. 15–22, 2016.
- DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. *Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms*. Pharm. Res., v. 15, p. 11-22, 1998.
- DRESSMAN, J. B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. *Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract*. Adv. Drug Deliv. Rev., v. 59, p. 591-602, 2007.
- EMMANUEL, A. V.; ROY, A. J.; NICHOLLS, T. J.; KAMM, M. A. *Prucalopride, a systemic enterokinetic, for the treatment of constipation*. Alim. Pham. Ther., v. 16, p. 1347-1356, 2002.
- EL-SAYED, Y. M.; ABDEL-HAMEED, M. E.; SULEIMAN, M. S.; NAJIB, N. M. *A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies*. J. Pharm. Pharmacol., v.40, p.727 -729, 1988.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il.
- KESSING, B. F.; SMOUT, A. J. P. M.; BENNINK, R. J. *Prucalopride decreases esophageal acid exposure and accelerates gastric emptying in healthy subjects*. Neurogastr. Motil., v. 26, p. 1079–1086, 2014.
- KHAN, K. A; RHODES, C. T. *Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems*. Pharm. Acta. Hel., v. 47, p. 594-607, 1997.
- KORTEJÄRVI, H.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. *Pharmacokinetic simulation of biowaiver criteria: The effects of gastric emptying, dissolution, absorption and elimination rates*. Eur. J. Pharm. Sci., v. 30, p. 155–166, 2007.
- LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. *Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system*. Eur. J. Pharm. Biopharm., v. 58, p. 265-278, 2004.
- MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. *A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals*. J. Clin. Pharmacol., v. 42, p. 620-643, 2002.
- McCONNELL, E. L.; FADDA, H.M.; BASIT, A. W. *Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery*. Int. J. Pharm., v. 364, p. 213-226, 2008.

- MIRANDA, J. R. A.; BAFFA, O.; OLIVEIRA, R. B.; MATSUDA, N. M. *An AC Biosusceptometer to study gastric emptying*. Med. Phys., v.19, p.445-448, 1992.
- MIRANDA, J.R.A; OLIVEIRA, R.B.; SOUZA, P.L; BRAGA, F.J.H; BAFFA, O. *A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions*. Phys. Med. Biol., v. 42, p. 1791–1799, 1997 .
- MIRANDA, J.R.A. *Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry*. Eur. J. Pharm. Biopharm., v.56, p.413–420, 2003.
- MIRANDA, J.R.A.; CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F.; ROMEIRO, F.G. *AC Biosusceptometry technique to evaluate the gastrointestinal transit of pellets under influence of prandial state*. J. Pharm. Sci., v.99, p.317-324, 2010.
- MOORE; J. W.; FLANNER; H. H. *Mathematical comparison of dissolution profiles*. Pharm. Tech., v.20, p.64-74, 1996.
- MORAES, R.; CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry*. Physiol. Meas., v. 24, p. 337-345, 2003.
- PRIEM, E., COLEN, I. V.; De MAEYER, J. H. *The facilitating effect of prucalopride on cholinergic neurotransmission in pig gastric circular muscle is regulated by phosphodiesterase 4*. Neuropharm., v. 62, p. 2126–35, 2012.
- QUIGLEY, E. M. M. *Prucalopride: safety, efficacy and potential applications*. Therp. Ad. Gastroent., v. 5, p. 23–30, 2012.
- ROMEIRO, F.G.; CORÁ, L.A.; ANDREIS, U.; AMÉRICO, M.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAFFA, O.; MIRANDA, J.R.A. *A novel biomagnetic approach to study caecocolonic motility in humans*. Neurogastroenterol. Motil., v. 18, p. 1078-1083, 2006.
- SMOUT, A.J.P.M.; MUNDT, M.W. *Gastrointestinal motility testing*. Gastroenterology, v. 23, p. 287-298, 2009.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. *In vitro models for the determination of drug absorption and a prediction of dissolution/absorption relationships*. Braz. J. Pharm. Sci., v. 43, n. 4, out./dez., 2007.
- TONINI, M. *Recent advances in the pharmacology of gastrointestinal prokinetics*. Pharm. Res., v. 33, n. 4/5, 1996.
- TONINI, M.; CIPOLLINA, L.; POLUZZI, E.; CREMAS, F.; CORAZZA, G. R.; DE PONTI, F. *Review article: clinical implications of enteric and central D2 receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics*. Alim. Pharm. and Ther., v. 19, p. 379-390, 2004.
- VARUM, F. J. O.; MERCHANT, H. A.; BASIT, A. W. *Oral modified-release formulations in motion: The relationship between gastrointestinal transit and drug absorption*. Int. J. Pharm., v. 395, p. 26–36, 2010.

WEITSCHIES, W.; KOSCH, O.; MÖNNIKES, H.; TRAHMS, L. *Magnetic Marker Monitoring: an application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked dosage forms*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, p. 1210-1222, 2005.

WEITSCHIES, W.; BLUME, H.; MÖNNIKES, H. *Magnetic marker monitoring: High resolution real-time tracking of oral solid dosage forms in the gastrointestinal tract*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 74, p. 93-101, 2010.