



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UILIAN DE ANDREIS

**FARMACOMAGNETOGRAFIA COLÔNICA: ESTUDO *IN VIVO* DA
DESINTEGRAÇÃO DE COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS REVESTIDOS**

**BOTUCATU - SP
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UILIAN DE ANDREIS

**FARMACOMAGNETOGRAFIA COLÔNICA: ESTUDO *IN VIVO* DA
DESINTEGRAÇÃO DE COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS REVESTIDOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como exigência parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Farmacologia).

Orientador: Prof. Adj. José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU - SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Andreis, Uilian.

Farmacomagnetografia colônica : estudo in vivo da desintegração de comprimidos magnéticos revestidos / Uilian de Andreis. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

Capes: 21001014

1. Tecnologia farmacêutica. 2. Diclofenaco - Farmacocinética.

Palavras-chave: Biomagnetismo; Desintegração; Farmacocinética;
Farmacomagnetografia, Formas Farmacêuticas Sólidas; Imagens Magnéticas.

Agradecimentos

"Quem acolhe um benefício com gratidão, paga a primeira prestação da sua dívida."

(Sêneca)

À minha família.

A minha fé mais profunda é que podemos mudar o mundo pela verdade e pelo amor.

(Mahatma Gandhi)

Agradecimentos

A meu Orientador, Professor Adjunto José Ricardo de Arruda Miranda, pela cordialidade e respeito profissional, por compartilhar todos os dias seu conhecimento científico, por dividir as dificuldades, por sua amizade.

"Não há estrada real para a ciência e só têm possibilidade de chegar aos seus cumes luminosos aqueles que não temem cansar-se a subir as suas escarpadas veredas"
(Karl Marx - 1872)

A minha grande colaboradora nesse trabalho, Profa. Dra. Luciana Aparecida Corá, por trabalhar com grande dedicação em todas as etapas, pelas palavras de incentivo e pela agradável amizade.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."
(Albert Einstein)

Com atenção e carinho especiais, agradeço aos amigos e colaboradores no desenvolvimento desse trabalho: Murilo Stelzer, Madileine Francely Américo, Fabiano Carlos Paixão, Paulo Roberto Fonseca, Giovana Evangelista, Marcelo Agostinho, Caio Cesar Quini e Ronaldo Vitor de Matos que me acompanharam em todos os momentos, esforçaram-se e contribuíram para meu aprendizado.

Aos voluntários, que gentilmente se dispuseram em colaborar, tornando possível esse estudo.

Ao Instituto de Biociências, UNESP, por propiciar as condições necessárias para execução do trabalho.

Aos Professores José Roberto C. Saglietti e Paulo R. Ramos, pelo apoio e consideração desde minha Iniciação Científica.

À FAPESP pelo apoio à pesquisa e concessão de minha Bolsa de Doutorado, processo 2006/06489-8.

Agradecimentos pessoais

Agradeço a Deus, sempre e por tudo.

"A vida sem amor... não tem sentido."

À Marina, por toda sua dedicação, amor e incondicionalidade, por trazer encanto e graça à minha vida e a alegria de formar uma nova família.

*Que a família comece e termine sabendo onde vai
E que o homem carregue nos ombros a graça de um pai
Que a mulher seja um céu de ternura aconchego e calor
E que os filhos conheçam a força que brota do amor*

(Padre Antônio Maria)

A meus pais pelo carinho, pelas orações, pelo conforto e a certeza de sempre ter o seu amor, por terem me proporcionado a mais linda convivência em família.

"Filho meu, ouve o ensino do teu pai e não deixes a instrução de tua mãe. Porque serão diadema de graça para a tua cabeça e colares, para o teu pescoço"

(Provérbios 1:8-9).

A meus Irmãos Sílvia, Fernando e Luciano, vocês são minha maior herança, o grande presente que meus pais me deram. A meus Sobrinhos Diego, Tiago, Lucas, Natália, Guilherme, Felipe e Mariana, pela alegria, graça e tanto carinho.

A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.

(Aristóteles, 360 a.c.)

A meus cunhados Fernando, Marinalva e Daniela, pois tenho a graça de tê-los como meus irmãos.

"A alegria não está nas coisas: está em nós."

(Goethe)

A meus sogros Pedro e Edmar Nilce e minhas cunhadas Bárbara e Simony, pelo carinho e amor. Vocês são minha família.

"A felicidade é difícil de se atingir, pois só a atingimos tornando felizes os outros."

(Stuart Clock)

Aos amigos Gustavo Henrique Vieira, Carlos Eduardo F. Domingues, Ligia Subitoni Antonio, Thiago M. Moraes, Celso A. R. A. Costa, Rodrigo A. R. Vela, pelo apoio, reflexões e inestimável amizade.

*A amizade torna a prosperidade mais brilhante e ilumina a adversidade,
por dividi-la e compartilhá-la.*

(Cícero)

Ao meu amigo Murilo Stelzer, companheiro também em outras batalhas, pelas muitas consultorias e paciência durante minhas crises de criatividade quando eu decidia organizar a oficina do laboratório.

"Virtudes não são acidentes da natureza. Virtudes são algo que se constrói".

(Toni Morrison)

Resumo

A avaliação dos parâmetros motores do trato gastrintestinal é condição necessária para caracterizar o comportamento de formas farmacêuticas sólidas administradas pela via oral. A função motora gastrintestinal pode ser alterada em detrimento de doenças, interações com medicamentos ou intervenções cirúrgicas. Essas alterações, por sua vez, podem influenciar diversos processos farmacêuticos e, conseqüentemente, a biodisponibilidade dos fármacos. Comprimidos são as formas farmacêuticas mais utilizadas na terapia. Para garantir a eficácia e segurança dessas preparações, são necessários testes *in vitro* que simulam o trato gastrintestinal. Entretanto, não é possível estimar com precisão a influência dos parâmetros gastrintestinais na liberação do fármaco. Por essa razão, os ensaios *in vivo* realizados por técnicas não invasivas e inócuas ao indivíduo são necessários, pois permitem monitorar simultaneamente os parâmetros motores e suas interrelações com os processos de liberação e biodisponibilidade dos fármacos. O objetivo desse trabalho foi empregar a técnica de Biosusceptometria AC associada à farmacocinética para avaliar a influência da motilidade gastrintestinal, bem como das alterações induzidas nessa função pela administração prévia de um procinético (Domperidona) e um antimuscarínico (Butilbrometo de Escopolamina). Além disso, foram avaliadas as influências desses parâmetros no processo de liberação e biodisponibilidade de um fármaco modelo (Diclofenaco Sódico) adicionado a comprimidos revestidos.

Palavras chave: Farmacomagnetografia, Farmacocinética, Biomagnetismo, Formas Farmacêuticas Sólidas, Desintegração, Imagens Magnéticas.

Abstract

The evaluation of gastrointestinal motor parameters is necessary towards characterize the behavior of solid dosage forms orally administered. The gastrointestinal motor function may be altered by diseases, drugs or surgery. These alterations may influence a number of pharmaceutical processes and consequently the bioavailability of drugs. Tablets are the dosage forms most commonly used in therapy. To ensure the efficacy and safety of these formulations, in vitro tests in simulated gastrointestinal conditions are needed. However, such conditions as well as the influence of gastrointestinal parameters on drug release cannot be fully predicted. For these reasons, in vivo studies are realized by noninvasive and harmless techniques, since they allows monitoring gastrointestinal motor parameters and the relationships with drug delivery and bioavailability. The aim of this work was to employ the AC Biosusceptometry to evaluate the influence of gastrointestinal motility as well as the induced changes on this function by previous administration of a prokinetic drug (domperidone) and an antimuscarinic agent (scopolamine butilbromide). In addition, it have been evaluated how these alterations influenced the drug release and bioavailability of a model drug (sodium diclofenac) added to coated tablets.

Keywords: Pharmacomagnetography, Pharmacokinetic, Biomagnetism, Solid Dosage Forms, Disintegration, Magnetic Images.

Lista de ilustrações

Figura 3.01: Mono-sensor BAC.

Figura 3.02: Diagrama funcional da Biosusceptometria AC.

Figura 3.03: Multi-sensor BAC.

Figura 3.04: Posicionamento do sensor BAC para mapeamento do voluntário.

Figura 3.05: Linha temporal dos procedimentos executados durante o estudo.

Figura 4.01: Perfil de dissolução dos comprimidos magnéticos revestidos em solução tampão.

Figura 4.02: Perfil da Atividade de Contração Gástrica, Fase I.

Figura 4.03: Perfil da Atividade de Contração Colônica. Fase I.

Figura 4.04: Perfil da Atividade de Contração Gástrica (ACG), Fase II.

Figura 4.05: Perfil da Atividade de Contração Colônica, Fase II.

Figura 4.06: Perfil da Atividade de Contração Gástrica, Fase III.

Figura 4.07: Perfil da Atividade de Contração Colônica, Fase III.

Figura 4.08: Perfil do trânsito gastrointestinal de um comprimido magnético.

Figura 4.09: Sequência de imagens magnéticas, Fase I.

Figura 4.10: Sequência de imagens magnéticas, Fase II.

Figura 4.11: Sequência de imagens magnéticas, Fase III.

Figura 4.12: Perfil da concentração sérica de Diclofenaco Sódico.

Figura 4.13: Farmacomagnetografia.

Figura 4.14: Evolução da área magnética e concentração sérica de Diclofenaco Sódico.

Figura 4.15: Correlação entre TCC e T_{lag} , nas fases I (A), II (B) e III (C).

Tabela 3.01: Composição dos comprimidos.

Tabela 3.02: Composição e proporção da mistura para a pré-capa.

Tabela 3.03: Composição e proporção da mistura para o Revestimento pH dependente.

Tabela 4.01: Distribuição dos dados de atividade de contração gástrica e colônica.

Tabela 4.02: Tempo de trânsito do comprimido magnético no trato gastrointestinal.

Tabela 4.03: Parâmetros farmacocinéticos para as fases I, II e III do estudo.

Tabela 4.04: Quantificação dos parâmetros de tempo de desintegração (TD) e de absorção (TA).

Lista de abreviaturas e siglas

ACG – Atividade de Contração Gástrica;

ASC_{0-t} – Área Sob a Curva do tempo t=0 até a última mensuração

BAC – Biosusceptometria de Corrente Alternada

C_{max} – Máxima concentração sérica

CMM –Complexo Motor Migratório

cpm – ciclos por minuto

EGG – Eletrogastrografia

FFT – Fast Fourier Transform (Transformada Rápida de Fourier)

Freq – Frequência

IM – Índice de Motilidade

MnFe₂O₄ – Ferrita

SQUID – Superconducting Quantum Interference Device

TA – Tempo de Absorção

TCC – Tempo de Chegada ao Cólon

TD – Tempo de Desintegração

TGI – Trato Gastrintestinal

T_{lag} – Tempo de primeira mensuração de concentração sérica de Diclofenaco Sódico.

T_{max} – Tempo para atingir C_{max}

TRG – Tempo de Retenção Gástrica

TTI – Tempo de Trânsito Intestinal

UV – Ultra-Violeta

Sumário

Folha de rosto	<i>i</i>
Dedicatória	<i>ii</i>
Agradecimentos	<i>iii</i>
Resumo	<i>v</i>
Abstract	<i>vi</i>
Lista de ilustrações	<i>vii</i>
Lista de Abreviaturas e Siglas	<i>viii</i>
Sumário	<i>ix</i>
Capítulo 1 – Introdução	01
Capítulo 2 – Objetivos	09
Capítulo 3 – Material e Métodos	11
3.1. BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA – BAC	11
3.2. ELETROGASTROGRAFIA	14
3.3. COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS	15
3.4. ENSAIOS IN VIVO	18
3.4.1. Procedimento experimental	18
3.4.2. Análise dos dados	21
3.4.3 Ensaio de Biodisponibilidade	22
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	26
4.1. COMPRIMIDO MAGNÉTICO	26
4.2. ATIVIDADE DE CONTRAÇÃO GÁSTRICA (ACG) E COLÔNICA (ACC)	27
4.3. TRÂNSITO DO COMPRIMIDO E IMAGENS MAGNÉTICAS	34
4.4. FARMACOCINÉTICA	39
4.5. FARMACOMAGNETOGRAFIA	42
Capítulo 5 – Discussão e Conclusão	48
Referências	54
Anexo	60

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 - Introdução

O desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas mais efetivas está associado ao conhecimento dos parâmetros fisiológicos que influenciam o seu desempenho no trato gastrointestinal (TGI) do homem (DRESSMAN *et al.*, 1998; McCONNEL *et al.*, 2008).

Formas farmacêuticas sólidas, especialmente comprimidos, são muito utilizadas na terapia e, dentre as vantagens que apresentam, destacam-se a facilidade para administração, estabilidade da composição, segurança para prescrição e maior adesão do paciente ao tratamento (SASTRY *et al.*, 2000). Segundo a lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2010), dentre os 417 produtos constantes do índice de preparações farmacêuticas, 193 são comprimidos. Convém salientar a importância de avaliar a eficácia e segurança dessas preparações, uma vez que qualquer falha nos processos relacionados com a liberação do fármaco pode resultar em alteração da biodisponibilidade.

A absorção de fármacos administrados pela via oral é um processo complexo e pode ser influenciado por diversos fatores. As propriedades físico-químicas do fármaco, as características da forma farmacêutica, os excipientes utilizados, a tecnologia para a obtenção do produto e, fundamentalmente, os parâmetros fisiológicos do TGI são determinantes para o processo de absorção (MARTINEZ *et al.*, 2002; SHARGEL *et al.*, 2005; KARALIS *et al.*, 2008). Além disso, esse processo é dependente da motilidade e do trânsito gastrointestinal, com considerável variabilidade da cinética de absorção em diferentes segmentos do TGI (ROUGE *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 2002;).

A ingestão oral é a primeira etapa que caracteriza o movimento de formas farmacêuticas sólidas através do TGI, sendo a atividade contrátil nos diferentes segmentos governada por propriedades eletrofisiológicas fundamentais. Uma característica importante

da atividade mioelétrica do TGI é o padrão elétrico onipresente chamado de ondas lentas que não promove as contrações, visto que estas estão condicionadas a ocorrência de potenciais de ação ou *spikes*. No homem, a frequência de contração do estômago é caracterizada em 3 ciclos por minuto (cpm). No duodeno, a frequência de contração oscila entre 11 e 12 cpm e sofre um declínio ao longo do intestino delgado, atingindo 9 cpm no íleo distal (QUIGLEY, 1996). O cólon, por sua vez, apresenta um padrão de motilidade complexo e variável, caracterizado por uma frequência de contração mais lenta e organizada de acordo com a função do segmento (RAO *et al.*, 2010).

Além das diferenças encontradas ao longo dos segmentos que compõem o TGI, a motilidade difere consideravelmente de acordo com o estado prandial (VARUM *et al.*, 2010). No jejum, a atividade motora do TGI superior é organizada em um padrão cíclico e recorrente, denominada de complexo motor migratório (CMM).

O CMM é composto por três fases distintas que ocorrem sequencialmente e migram no sentido aboral, tendo início com um período de quiescência motora (fase I), que é seguido por um período de contrações irregulares (fase II), culminando em atividade motora organizada, com contrações potentes e regulares (fase III) (QUIGLEY, 1996). É durante a fase III do CMM que ocorre o esvaziamento do conteúdo gástrico não digerido, incluindo as formas farmacêuticas sólidas. Com a ingestão de alimento, o CMM é abolido e substituído por um grupo de contrações aleatórias, chamado pós-prandial, com duração de 1 hora para cada 200 kcal ingeridas. Após esse período, o padrão jejum continua, uma vez que mais alimento não tenha sido ingerido (CAMILLERI, 2006).

O trânsito da forma farmacêutica ao longo TGI determina quanto tempo o fármaco permanece em contato com o seu local de absorção, sendo que sua biodisponibilidade pode ser influenciada por fatores que alteram o trânsito gastrointestinal.

Em se tratando da administração oral de formas farmacêuticas sólidas, o esvaziamento gástrico que, nesse caso, também pode ser denominado tempo de residência ou retenção gástrica, é o intervalo no qual a forma farmacêutica permanece no estômago e caracteriza uma etapa limitante para a absorção de fármacos. Esse parâmetro é altamente variável e é influenciado por uma série de fatores, incluindo estado prandial e características físicas da forma farmacêutica, além de fatores biológicos (DAVIS *et al.*, 1986; GIBALDI, 1991; DRESSMAN *et al.*, 1993; WILSON, 2000; HELLSTRÖN *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2008). A retenção gástrica de formas farmacêuticas pode ser explorada como uma abordagem interessante visando melhor absorção para fármacos cuja janela terapêutica está restrita ao TGI superior (CHAWLA *et al.*, 2003; DAVIS, 2005; STREUBEL *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 2010; VARUM *et al.*, 2010;).

Diferente do esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal parece ser menos variável, apesar de alguns estudos demonstrarem importante variabilidade intra-individual (DAVIS *et al.*, 1986; COUPE *et al.*, 1991; MIRANDA *et al.*, 2010; VARUM *et al.*, 2010). O tempo de trânsito do intestino delgado é determinado por dois tipos principais de movimentos classificados como propulsão aboral e mistura. Considerando que o intestino delgado é o principal local de absorção, o tempo de trânsito entre o estômago e o cólon é um fator importante para a biodisponibilidade dos fármacos (GIBALDI, 1991).

A liberação colônica de fármacos vem ganhando importância significativa nos últimos anos, considerando a possibilidade para o tratamento de doenças que afetam localmente esse órgão, bem como para liberação sistêmica de fármacos e de proteínas ou peptídeos com potencial terapêutico (SHAREEF *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2007). A motilidade colônica é lenta, sendo o tempo de trânsito geralmente mais longo se comparado aos outros segmentos do TGI. O trânsito colônico pode variar de 2 a 48 horas, dependendo de várias

condições, incluindo o tipo de forma farmacêutica administrada, a dieta, o estado prandial e determinadas doenças (SHAREEF *et al.*, 2003).

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 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 podem influenciar a absorção de fármacos. Por isso, a co-administração 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. São considerados 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 Domperidona é um antagonista de receptor dopaminérgico que estimula a motilidade do TGI superior, com propriedades antieméticas semelhantes as da metoclopramida e de certos fármacos neurolépticos (BRAUN *et al.*, 2009). Seus efeitos antieméticos podem ser devidos a uma combinação de efeitos periféricos (gastrocinético) com o antagonismo dos receptores dopaminérgicos na zona quimiorreceptora de gatilho. Estudos em humanos mostram que a Domperidona aumenta a duração das contrações do

antro e duodeno, melhora a coordenação do peristaltismo pilórico, aumentando a taxa de esvaziamento gástrico e a pressão do esfíncter esofágico inferior. Esse fármaco não produz efeitos sobre as secreções gástricas e é rapidamente absorvido após administração oral, tendo seu pico de concentração plasmática variando entre 15 e 75 min e o tempo de meia vida plasmática entre 7 a 9 h (CHAMPION *et al.*, 1986; TONINI *et al.*, 2004; REDDYMASU *et al.*, 2007; BRAUN, 2009).

São reconhecidos dois subtipos de receptores dopaminérgicos - D1 e D2, cuja estimulação causa efeitos inibitórios na motilidade gastrintestinal: redução do tônus do esfíncter esofágico inferior, redução do tônus e da pressão intragástrica e diminuição da motilidade antroduodenal (CHAMPION, 1988; TONINI *et al.*, 2004). O bloqueio dos receptores dopaminérgicos por antagonistas seletivos, como a Domperidona, resulta no efeito procinético (BARONE, 1999; FRANZESE *et al.*, 2002). Diferentemente da metoclopramida, a Domperidona não atravessa a barreira hematoencefálica sendo, portanto, desprovida de efeitos extra-piramidais (CHAMPION, 1988).

Por outro lado, existem situações em que é necessário obter efeitos inibitórios sobre a atividade motora (redução de tônus, amplitude e frequência), como em procedimentos radiológicos e endoscópicos (MOCHIKI *et al.*, 1998, YOSHIKAWA *et al.*, 2006). O Butilbrometo de Escopolamina é um reconhecido medicamento anticolinérgico com alta afinidade por receptores muscarínicos localizados nas células do músculo liso do TGI (TYTGAT, 2007). Constitui uma opção de tratamento para diversas afecções com eficácia e segurança (MÜLLER-LISSNER *et al.*, 2006; TYTGAT 2007).

Avaliar a função motora do TGI bem como suas alterações, decorrentes de doenças ou administração de fármacos, torna-se relevante na medida em que essas alterações podem interferir significativamente com a absorção de outros medicamentos.

Por muitos anos, a cintilografia tem sido a técnica padrão-ouro para o monitoramento não-invasivo de formas farmacêuticas sólidas no TGI do homem (DIGENIS *et al.*, 1998a, b; WILDING *et al.*, 2001). Esses estudos são realizados após a incorporação de um marcador radioativo na forma farmacêutica ou marcadores que são posteriormente ativados a radiofármacos (DIGENIS *et al.*, 1998a; JAIN *et al.*, 2009).

A modalidade conhecida como farmacocintilografia, que associa a cintilografia com avaliação farmacocinética, foi aplicada para fornecer informações sobre o trânsito de formas farmacêuticas sólidas e posterior liberação e absorção do fármaco (WILDING *et al.*, 2001; HODGES *et al.*, 2009). Embora a cintilografia tenha um grande potencial para avaliar formas farmacêuticas no TGI, há algumas desvantagens a serem elencadas. Essa ferramenta está associada a altos custos, tanto do equipamento como de suprimentos, exposição à radiação, licenciamento para a manipulação de materiais radioativos e aprovação pelo comitê institucional, além de a resolução temporal e espacial limitadas (JAIN *et al.*, 2009).

Como opção as limitações técnicas atribuídas a cintilografia, foram desenvolvidos métodos alternativos com base na detecção de campo magnético (ANDRÄ *et al.*, 2000; WEITSCHIES *et al.*, 2005; CORÁ *et al.*, 2005a;).

O desenvolvimento de métodos fundamentados no Biomagnetismo com a finalidade de monitorar não-invasivamente formas farmacêuticas sólidas vem ganhando importância significativa nos últimos anos. Esses métodos utilizam sensores que são capazes de monitorar o campo magnético resultante da atividade elétrica intrínseca dos tecidos e órgão excitáveis ou de materiais com propriedades magnéticas (WILLIAMSON & KAUFMAN, 1981; CORÁ *et al.*, 2010). Dentre os métodos magnéticos empregados na pesquisa farmacêutica, destacam-se os Dispositivos Supercondutores de Interferência Quântica

(SQUID), os sensores magnetorresistivos (AMR) e a Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC).

A BAC despontou como uma técnica inovadora para avaliar a motilidade gastrointestinal (BAFFA *et al.*, 1995; MIRANDA *et al.*, 1997). Além de ser um método não invasivo e livre de radiação ionizante, a BAC não requer ambiente magneticamente blindado e possui um custo de implantação relativamente baixo, comparativamente aos métodos vigentes. Essa técnica utiliza bobinas de indução para registrar a variação temporal do fluxo magnético obtida pela resposta de um material ferromagnético. Esse material tem como principal característica uma alta susceptibilidade magnética e, por isso, produz uma resposta intensa quando um campo magnético é aplicado ao meio biológico (CORÁ *et al.*, 2010). O constante aperfeiçoamento dessa instrumentação permitiu o desenvolvimento de diversos estudos aplicados a fisiologia básica do TGI do homem (ROMEIRO *et al.*, 2006; AMÉRICO *et al.*, 2007, 2009) e de animais (MORAES *et al.*, 2003; ANDREIS *et al.*, 2008) e, paralelamente, em pesquisas envolvendo tecnologia e processos farmacêuticos (CORÁ *et al.*, 2003; 2005a,b; 2006a,b; 2008b; 2010; MIRANDA *et al.*, 2010).

Como já mencionado anteriormente, as técnicas biomagnéticas constituem tecnologias versáteis que podem ser empregadas de maneira bastante diversificada. Na pesquisa farmacêutica, esses métodos oferecem uma oportunidade única para monitorar as formas farmacêuticas, bem como diversos 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. Ao associar o monitoramento biomagnético com perfis farmacocinéticos, um novo conceito foi introduzido (WEITSCHIES *et al.*, 2010; CORÁ *et al.*, 2010). Assim, a farmacomagnetografia, em analogia a farmacocintilografia, tem o desafio de investigar as complexas interações entre a fisiologia do TGI, mecanismos de liberação de fármacos e sua biodisponibilidade.

Diante do exposto, a proposta desse trabalho consistiu em empregar a técnica de Biosusceptometria AC associada à farmacocinética para avaliar a influência da motilidade do TGI do homem, bem como das alterações induzidas pela administração prévia de fármacos capazes de modular a atividade de contração do TGI: um antagonista dopaminérgico (procinético, Domperidona) e um antimuscarínico (Butilbrometo de Escopolamina), no processo de liberação e biodisponibilidade de um fármaco modelo (diclofenaco sódico) adicionado a comprimidos revestidos.

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2 - Objetivos

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biomagnetismo, Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu e incluiu o seguinte escopo:

- empregar a técnica de Biosusceptometria AC para avaliar a motilidade do TGI do homem na presença de procinético (domperidona) e antimuscarínico (butilbrometo de escopolamina) e as influências das alterações do trânsito gastrintestinal sobre a biodisponibilidade de um fármaco-modelo adicionado a comprimidos revestidos.

Objetivos específicos:

- Desenvolver comprimidos revestidos contendo marcador magnético (ferrita) e fármaco modelo (diclofenaco sódico) para liberação colônica;
- Avaliar os seguintes parâmetros:
 - Atividade de Contração:
 - Gástrica;
 - Colônica.
 - Trânsito gastrintestinal:
 - Tempo de Retenção Gástrica;
 - Tempo de Trânsito Intestinal;
 - Tempo de Chegada ao Cólon.
- Caracterizar o processo de desintegração dos comprimidos por meio do processamento dos sinais e imagens magnéticas e calcular o tempo de desintegração;

- Determinar a biodisponibilidade do fármaco modelo nas condições controle, procinético e antimuscarínico e obter os parâmetros:
 - Tempo de Concentração Máxima do fármaco (T_{max});
 - Concentração Máxima do fármaco (C_{max});
 - Área sob a Curva de concentração (AUC_{0-t}).
- Obter a correlação entre monitoramento magnético e farmacocinética, denominada Farmacomagnetografia.

Capítulo 3

Material e Métodos

Capítulo 3 - Material e Métodos

3.1. BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA - BAC

O Biosusceptômetro é um sensor magnético capaz de rastrear pequenas quantidades de um material adicionado a uma refeição teste ou forma farmacêutica. Um dos materiais magnéticos mais utilizados é a ferrita em pó (Fe_2MnO_4), um material insolúvel e que, portanto, não é absorvido pela mucosa do TGI, sendo desprovido de qualquer efeito adverso ao organismo (BELIKOV and KUREGYAN, 2001). A ferrita quando dispersa em uma refeição teste é caracterizada como um traçador magnético e, quando compactada em uma forma farmacêutica sólida, é denominada marcador magnético. A diferença está associada à distribuição espacial do material magnético: para um marcador, o sinal registrado tem característica pontual, com elevada amplitude e intensidade; para um traçador, o sinal magnético apresenta-se distribuído em uma região, com amplitude e intensidade reduzidas (CORÁ *et al.*, 2005a).

A BAC é constituída por um conjunto de sensores que possuem 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 (CORÁ *et al.*, 2005a; 2010). 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 3.01).

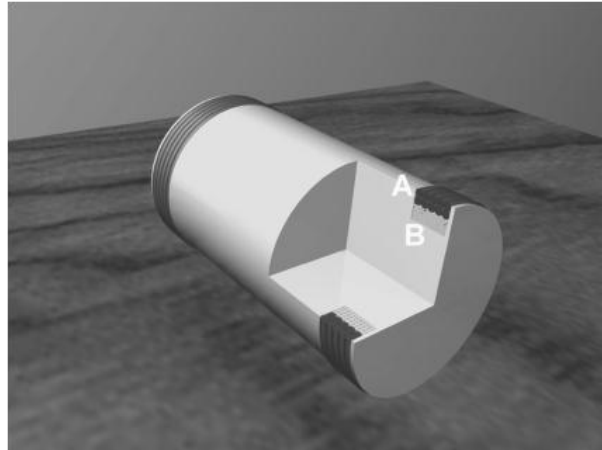


Figura 3.01: Mono-sensor BAC (A: Bobina excitadora; B: Bobina detectora).

Essa configuração consiste no uso de duas bobinas em série, enroladas em sentidos contrários, de modo que, os fluxos magnéticos concatenados em cada bobina sejam subtraídos, eliminando os ruídos ambientais e tornando-as mais sensíveis (MIRANDA *et al.*, 1992). Portanto, o sensor é montado como um transformador duplo de fluxo magnético, com núcleo de ar, sendo que o par de bobinas (excitação/ detecção) localizado mais distante do material magnético atua como transformador de referência e o par mais próximo do material como transformador de medida (figura 3.02).

Um amplificador gera o sinal para as bobinas de excitação que, por sua vez, induzem fluxo magnético nas bobinas de detecção. Ao aproximar o par de bobinas excitação/detecção do material magnético ocorre um desbalanceamento na voltagem. A diferença de fluxo magnético entre as bobinas de detecção pode ser monitorada e esse sinal detectado depende de alguns fatores, como a área das bobinas de detecção, intensidade do campo magnético aplicado e a quantidade de material magnético presente na região a ser investigada. A amplitude do sinal magnético varia, ainda, com a distância entre o sensor e o material magnético dentro do órgão durante as contrações e relaxações (MIRANDA *et al.*,

1997), tornando a BAC uma técnica muito sensível para monitorar a atividade contrátil do TGI e o trânsito de marcadores ou de traçadores magnéticos.

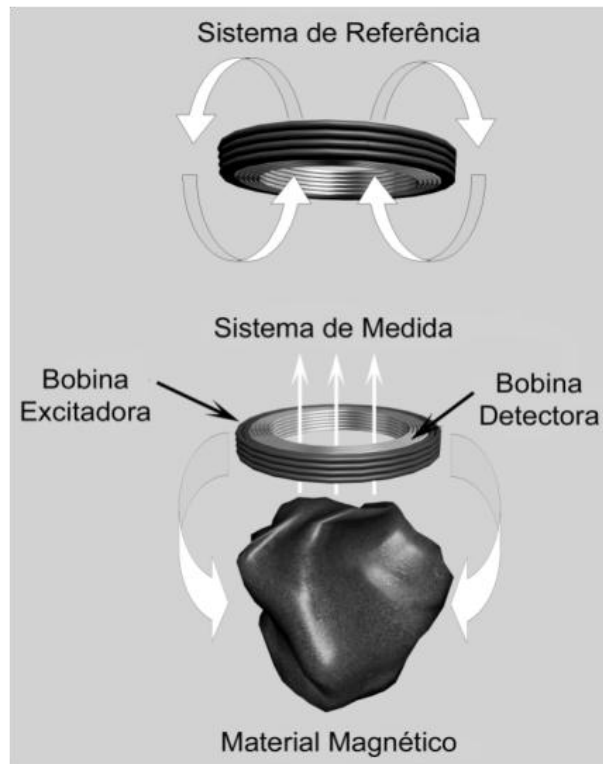


Figura 3.02: Diagrama funcional da Biosusceptometria AC. A aproximação de um material magnético no sistema de medidas causa um desbalanceamento de fluxo magnético e a resposta é monitorada.

O desenvolvimento do sistema de BAC com multi-sensores possibilitou a aquisição dos sinais magnéticos em sete pontos diferentes, proporcionando um mapeamento razoável da distribuição dos sinais nestas áreas. O sistema de BAC utilizado apresenta uma bobina de excitação e sete outras de detecção, arranjadas de forma concêntrica. Os sete sensores foram agrupados de forma tal que seis sensores ficaram dispostos nos vértices de um hexágono imaginário e um no centro deste (figura 3.03).

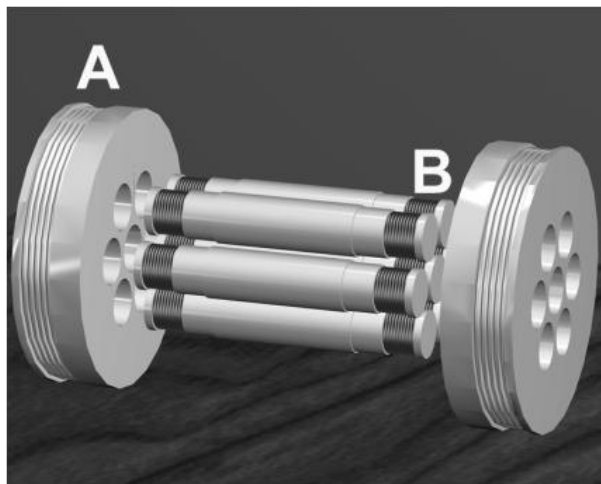


Figura 3.03: Multi-sensor BAC de 7 sensores (A: Bobina excitadora; B: Bobinas detectoras).

3.2. ELETROGASTROGRAFIA

A Eletrogastrografia cutânea (EGG) consiste no registro de frequência e amplitude da atividade mioelétrica gástrica. Células musculares lisas são capazes de gerar um potencial transmembrana entre seu interior e seu exterior. No estômago distal esse potencial transmembrana não é constante, mas flutua regularmente como resultado das variações na condutância iônica. No estômago, uma área ao longo da grande curvatura e na região do corpo apresenta uma rápida frequência de despolarização espontânea de 3 ciclos por minuto que avança pelo estômago distal e tende a despolarizá-lo espontaneamente. Essa atividade elétrica é chamada de ondas lentas (slow waves) e migra da região de marcapasso distalmente em direção ao piloro. Quando um potencial limiar é atingido, uma nova despolarização (potencial em ponta ou spike) aparece sobre o platô da onda lenta. Com a presença desse potencial em ponta, o cálcio entra na célula muscular lisa e o músculo se contrai (FELDMAN & SCHILLER, 1983). Essa relação entre potenciais em ponta e contração mecânica é amplamente aceita para o estômago da maioria das espécies.

Como os sinais registrados pelos eletrodos de superfície são de baixa amplitude, faz-se necessário o uso de amplificadores. Mesmo assim, devido à baixa relação sinal/ruído, utilizam-se filtros de sinais do tipo passa-banda, passa-baixa e passa-alta para eliminar os ruídos e minimizar efeitos gerados por artefatos como movimentos respiratórios.

3.3. COMPRIMIDOS MAGNÉTICOS

Os comprimidos eram constituídos por material magnético (ferrita – $MnFe_2O_4$; ($90 < \varnothing < 125 \mu m$), diclofenaco sódico (Sigma-Aldrich) e excipientes: dióxido de silício coloidal (Aerosil[®], Colorcon), celulose microcristalina (Microcel[®], Blanver), croscarmelose sódica (Solutab[®], Blanver) e estearato de magnésio (tabela 3.01).

Tabela 3.01: Composição dos comprimidos.

Material	Fornecedor	(%)	g/dose
Ferrita (Fe_2MnO_4)	Imag	68,97	1,000
Diclofenaco de Sódio	Sigma-Aldrich	6,90	0,100
Celulose Microcristalina	Blanver	20,69	0,300
Estearato de Magnésio	Henrifarma	0,34	0,005
Aerosil [®]	Evonik Degussa GmbH	0,34	0,005
Croscarmelose sódica	Blanver	2,76	0,040
TOTAL		100,00	1,450

Os comprimidos foram obtidos por compressão direta, em uma prensa manual (MA-098/1CPE, Marconi Ltda., Piracicaba, SP, Brasil), utilizando uma matriz e punção de 12 mm de diâmetro.

O ensaio de dureza foi feito em 10 comprimidos, empregando um durômetro modelo THB 220 (Erweka, Brasil). A friabilidade dos comprimidos foi determinada utilizando um sistema automatizado, Friabilômetro EF-2 (Electrolab, Brasil) em 25 rpm durante 4 minutos. Os comprimidos foram pesados e a perda de peso (%) foi calculada. O ensaio de dissolução foi realizado com o aparato 2 USP (pá, 50 rpm, 900 ml), utilizando solução ácida (pH=1,2; HCl 0,1 N) e solução tampão (pH=6,8), coletando amostras a cada 10 minutos para análise em um espectrofotômetro UV, ajustado para leitura de comprimento de onda em 280 nm.

Os comprimidos foram revestidos em duas etapas: uma pré-capa e um revestimento. Ambas as etapas foram realizadas utilizando uma máquina de revestimento (PCCA, Brazil) sob as seguintes condições: pressão de ar, 1,5 mg/cm²; temperatura interna do balde, 40–45 °C; velocidade de rotação, 20 rpm. A solução de revestimento foi aplicada em 72,5 g de comprimidos (50 unidades).

Revestimento:

Os comprimidos foram revestidos em três etapas: aplicação de uma pré-capa, cuja finalidade foi uniformizar a superfície dos comprimidos e aplicação de duas soluções de revestimento pH dependente, visando a liberação colônica do fármaco.

Ambas as etapas foram realizadas utilizando um sistema para revestimento constituído por compressor, secador e drageadeira de bancada (PCCA, Brazil), sob as seguintes condições: pressão de ar, 1,5 mg/cm²; temperatura interna do recipiente, 40–45 °C; velocidade de rotação, 20 rpm. As soluções foram aplicadas em 72,5 g de comprimidos (50 unidades).

Pré-capa:

Consistiu na aplicação de Acryl-EZE (Colorcon do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil), um sistema acrílico de revestimento entérico em pó, totalmente formulado e dispersível em água (Tabela 3.02). Após aplicação, foram mensurados 0,5% de ganho de peso.

Tabela 3.02: Composição e proporção da mistura para a pré-capa.

Pre-Capa	Produto	%	g
	Acryl-EZE	20,00	5,00
	Água	80,00	20,00
	Massa Total	100,00	25,00

Revestimento pH dependente:

Nessa etapa, foi utilizado o polímero Eudragit® S100 (Rohm, Pharma Polymers, Alemanha). A solução de revestimento foi preparada dissolvendo-se o polímero em álcool isopropílico e adição de pigmentos (Tabela 3.03). Após aplicação, foi calculado 3% de ganho de peso.

Tabela 3.03: Composição e proporção da mistura para o Revestimento pH dependente.

		Produto	%	g
Revestimento 1	Corante	Talco	6,06	0,30
		Dióxido de titânio	13,13	0,65
		Estearato de Magnésio	6,06	0,30
		Álcool Isopropílico	60,61	3,00
		Trietil Citrato	14,14	0,70
		Massa Total	100,00	4,95
	Revestimento	Eudragit S100	16,43	1,75
	Álcool Isopropílico	83,57	8,90	
	Massa Total	100,00	10,65	

Revestimento 2:

Após a aplicação de Eudragit®, foi utilizado novamente o polímero Acryl-EZE® (Tabela 3.02), obtendo-se 6% de ganho de peso no produto final.

3.4. ENSAIOS *IN VIVO*

Participaram do estudo 8 voluntários sadios, ou seja, aqueles que não apresentavam qualquer disfunção motora ou que não estavam utilizando medicamentos que pudessem interferir com a motilidade do TGI ou, ainda, que não tinham restrições quanto à administração dos fármacos propostos (diclofenaco sódico, domperidona e butilbrometo de escopolamina). Os voluntários 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 (OF.161/2006-CEP).

Todos os voluntários foram avaliados em 3 fases da pesquisa: Fase I: controle; Fase II: procinético; Fase III: antimuscarínico. Os voluntários permaneceram moderadamente ativos durante a realização do estudo e receberam almoço e lanche padronizados. Entre as fases desses estudos houve um período de eliminação (*wash out*) adequado, correspondente a no mínimo 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação dos fármacos.

3.4.1. Procedimento experimental

Os ensaios foram conduzidos de modo cego e randômico.

Fase I – Controle:

Os comprimidos foram administrados aos voluntários após jejum de 8 horas com auxílio de 200 mL de água. Os sinais magnéticos e elétricos foram adquiridos empregando-se

amplificadores Lock-in SR-830 (Stanford Research Systems, Inc., Sunnyvale, CA, USA) e MP100 e EGG100C (BIOPAC Systems, Inc., CA, USA), respectivamente. Os sistemas de BAC multi-sensores e de eletrogastrografia (EGG) foram posicionados na região de projeção gástrica e os sinais foram adquiridos durante 15 min (figura 3.04, painel A). Após esse período, foram realizados monitoramentos na região de projeção gástrica e em uma grade de pontos (5×5) desenhada na região de projeção colônica, empregando o mono-sensor BAC, em intervalos de 15 min durante 8 horas (figura 3.4, painel B). Esse monitoramento foi utilizado para obter a distribuição de intensidade do campo magnético e as imagens magnéticas correspondentes aos intervalos de tempo definidos. Com o comprimido detectado na região de projeção colônica, o sistema de multi-sensores BAC foi utilizado para adquirir os sinais magnéticos durante 15 min.

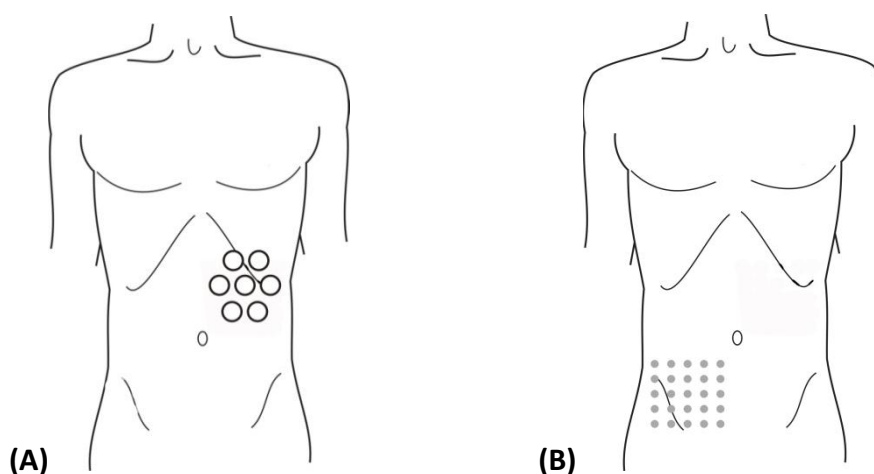


Figura 3.04: (A) Posicionamento do multi-sensor BAC sobre a região de projeção gástrica, para aquisição da Atividade de Contração Gástrica. (B) Mapa de intensidade magnética na região de projeção colônica. Sobre este mapa, o multi-sensor BAC foi posicionado para aquisição da Atividade de Contração Colônica.

Fase II – Procinético:

Aos voluntários em jejum foram administrados 40 mg de Domperidona (Peridal[®], Medley) e, após um período de 30 min, receberam o comprimido revestido. As medidas

magnéticas seguiram o mesmo protocolo adotado para a fase controle, ou seja, 15 minutos de registro nos sistemas de multi-sensores BAC e EGG e 8h de monitoramento na superfície abdominal dos voluntários, nas regiões determinadas anteriormente.

Fase III – Antimuscarínico:

Aos voluntários em jejum foram administrados 40 mg de Butilbrometo de Escopolamina (Buscopan®, Boehringer-Ingelheim) e, após um período de 30 min, receberam o comprimido revestido. As medidas magnéticas e elétricas seguiram o protocolo supracitado.

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue em tubos de coleta com reagente ativador de coagulo (Serum, Clot Activator, Silicone tube, BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) em intervalos de 15 e de 30 minutos, nas 3 fases descritas acima. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas para separação do soro e este foi congelado a -20°C até a realização do ensaio para quantificação do fármaco. A figura 3.05 ilustra as etapas do procedimento experimental descrito.

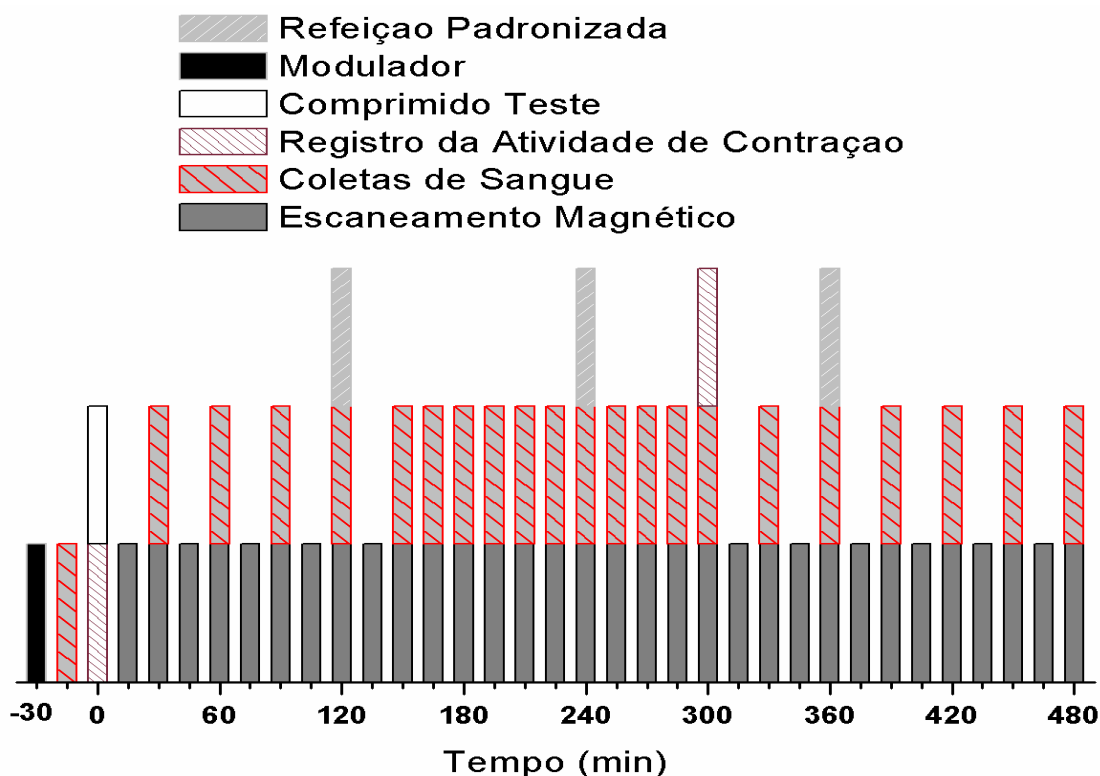


Figura 3.05: Linha temporal dos procedimentos executados durante o estudo.

3.4.2. Análise dos dados

Nas medidas in vivo, os registros magnéticos e elétricos foram adquiridos com frequência de 10 Hz/canal, armazenados em formato ASCII e processados e analisados em ambiente MatLab (Mathworks, Inc.). A análise digital de sinais para quantificar as frequências de contração gástrica e colônica foi efetuada empregando a Transformada Rápida de Fourier (FFT) utilizando filtros passa-banda tipo Butterworth. A frequência de corte foi estabelecida em dois intervalos diferentes, conforme o estudo: gástrico (1 – 6 cpm) e colônico (2 – 10 cpm). A análise de amplitude foi realizada por área sob a curva e índice de motilidade ($IM = \ln \frac{\text{número de contrações} \times \text{soma das amplitudes} \mp 1}{5 \text{ minutos}}$), (AZPIROZ & MALAGELADA, 1984; RICHARDS *et al.*, 1990; MORAES *et al.*, 2003; ANDREIS *et al.*, 2008)

O trânsito do comprimido foi determinado e os seguintes parâmetros mensurados: tempo de retenção gástrica (TRG), definido como tempo de permanência da forma farmacêutica no estômago a partir da ingestão; tempo de chegada ao cólon (TCC), definido como o intervalo de tempo entre o esvaziamento e chegada do comprimido à região colônica e o tempo de trânsito intestinal (TTI), como sendo a diferença entre TCC e TRG. Com o comprimido na região colônica foi calculado o tempo de desintegração (TD), que foi definido como o tempo necessário para obter o aumento de 50% da variação da área nas imagens, considerando o instante anterior à primeira leitura no cólon.

A amplitude das contrações, bem como os parâmetros referentes ao trânsito e ao processo de desintegração dos comprimidos, foi comparada nas três fases do estudo: controle, procinético e antimuscarínico.

As imagens magnéticas obtidas nos monitoramentos foram utilizadas para quantificar, em número de pixels, o valor da área das formas farmacêuticas em função do

tempo. As imagens foram obtidas a partir da distribuição de intensidade do campo magnético e foram processadas e quantificadas seguindo protocolos desenvolvidos previamente (Corá et al., 2005, 2008). Brevemente, as matrizes de pontos (5×5) obtidas em cada intervalo de tempo foram interpoladas (256×256) e pré-processadas para obter imagens degradadas. Essas imagens foram, então, submetidas ao processamento digital que consistiu na subtração de background, ajustes de brilho e contraste e segmentação. Foi utilizado um operador específico para detectar e delimitar as bordas das imagens. A soma dos valores dos pixels contidos na imagem delimitada, que corresponde ao valor da área das imagens magnéticas, foi utilizado para quantificar os parâmetros correspondentes aos processos analisados.

O processamento das imagens foi realizado em ambiente MatLab[®] (Mathworks Inc.) e a quantificação dos dados foi efetuada empregando-se o programa Origin[®] (OriginLab, Co).

3.4.3 Ensaio de Biodisponibilidade

O diclofenaco sódico nas amostras séricas foi quantificado após extração líquida por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregando protocolo de análise proposto por El-Sayed (1988). Os testes de validação metodológica foram reproduzidos, para a determinação dos parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade, alcance, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. De maneira sucinta, foram realizados os seguintes procedimentos:

Preparação da Fase Móvel:

- Acetonitrila / Água deionizada 50:50% v/v;
- Ajustado em pH 3,3 com ácido acético glacial;
- Filtrada em membrana 0,22 μm e degaseificada (30 minutos em vácuo e banho de ultra-som)

Extração:

- Utilizar um tubo de 15 ml (polipropileno);
- Adicionar 500 μl da amostra sérica coletada;
- Adicionar 2 ml de acetonitrila;
- Agitar vigorosamente por 2 min em um agitador de tubos;
- Centrifugar por 10 min, 3500 rpm;
- Transferir sobrenadante para outro tubo (15 ml);
- Evaporar em banho-maria (40°C) até secura, sob purga de ar comprimido;
- Reconstituir com 200 μl de fase móvel;
- Agitar vigorosamente por 2 min em um agitador de tubos;
- Transferir para tubo de 1,7 ml (polipropileno);
- Centrifugar por 10 min, 14.000 x g, 4°C;
- Transferir para outro tubo (1,7 ml);
- Analisar.

O cromatógrafo utilizado (ÄKTApurifier™, GE Healthcare, USA) consistia de um sistema de bombas quaternário, com detector UV ($\lambda = 280$ nm), loop de injeção de 100 μ l e software de aquisição UNICORN 5.11. Uma coluna analítica de 5 μ m RP-C18 (4.6 X 150 mm, Thermo) foi utilizada para separação.

A partir da curva da concentração plasmática em função do tempo obtida dos estudos de biodisponibilidade, foi determinada a absorção do fármaco em função do tempo.

Foram obtidos os parâmetros farmacocinéticos:

- **t_{lag}** : tempo em que ocorreu a primeira detecção do fármaco nas amostras coletadas;
- **C_{max}** : concentração plasmática máxima do fármaco após administração;
- **t_{max}** : tempo necessário para C_{max} ;
- **ASC_{0-t}** : área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo, calculada pelo método do trapézio, do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t}), onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação).
- **TA**: tempo de absorção. Foi definido como o tempo necessário para obter 50% de C_{max} , considerando o instante anterior à primeira mensuração do fármaco marcador.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em ambiente Origin® (Origin Lab Corp., Northampton, USA). Foi realizada estatística descritiva para obtenção dos valores médios e desvio padrão da média. As médias foram comparadas por teste t pareado, considerando como nível de significância $p < 0,05$. As comparações foram feitas entre as médias apresentadas para o mesmo parâmetro nas três fases do estudo, comparando apenas ao controle. Registros que apresentaram diferença significativa foram marcados com um asterisco.

Capítulo 4

Resultados

Capítulo 4 - Resultados

4.1. COMPRIMIDO MAGNÉTICO:

Os comprimidos magnéticos obtidos para esse estudo apresentaram perfis adequados para os processos de dissolução do revestimento, desintegração e liberação do fármaco. A dureza foi equivalente a 20,5 kP e friabilidade em torno de 0,1 %. Os ensaios *in vitro* mostraram que o revestimento aplicado aos comprimidos resistiu durante 2 horas em solução ácida (pH=1,2; HCl 0,1 N), sendo que a desintegração ocorreu após 40 minutos em solução tampão (pH=6,8). O perfil de liberação do Diclofenaco Sódico contido nos comprimidos magnéticos está ilustrado na Figura 4.01.

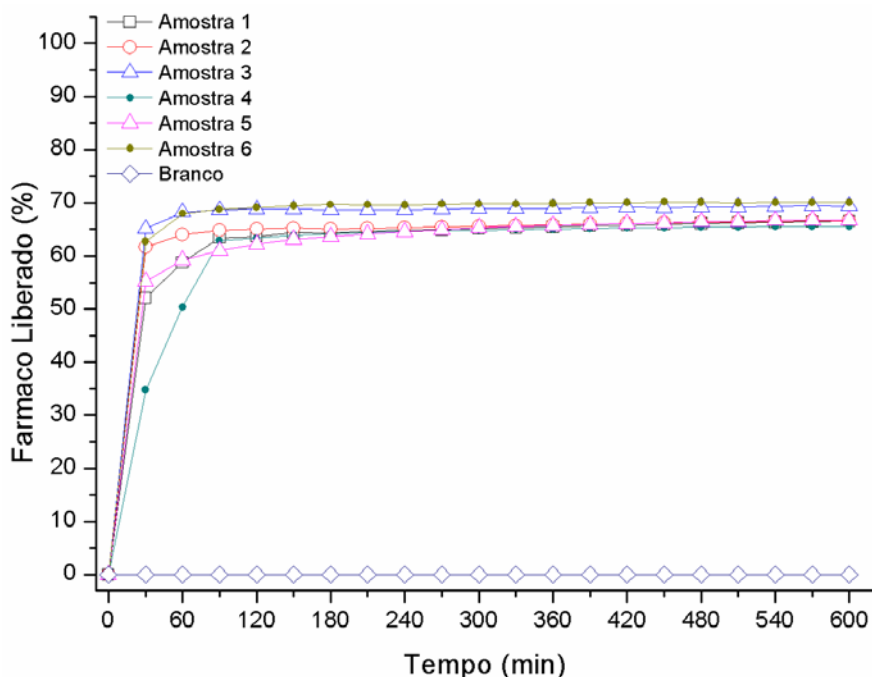


Figura 4.01: Perfil de dissolução dos comprimidos magnéticos revestidos em solução tampão.

Os comprimidos foram administrados aos voluntários em três fases distintas: controle, procinético e antimuscarínico, com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros motores do TGI na biodisponibilidade do Diclofenaco Sódico.

4.2. ATIVIDADE DE CONTRAÇÃO GÁSTRICA (ACG) E COLÔNICA (ACC):

A Figura 4.02 ilustra os sinais magnéticos (A) e elétricos (B) que registraram a ACG após administração do comprimido magnético a um voluntário avaliado na fase controle. A ACG registrada durante o jejum é caracterizada por uma atividade irregular típica e com frequência predominante em 3 ciclos por minuto (cpm).

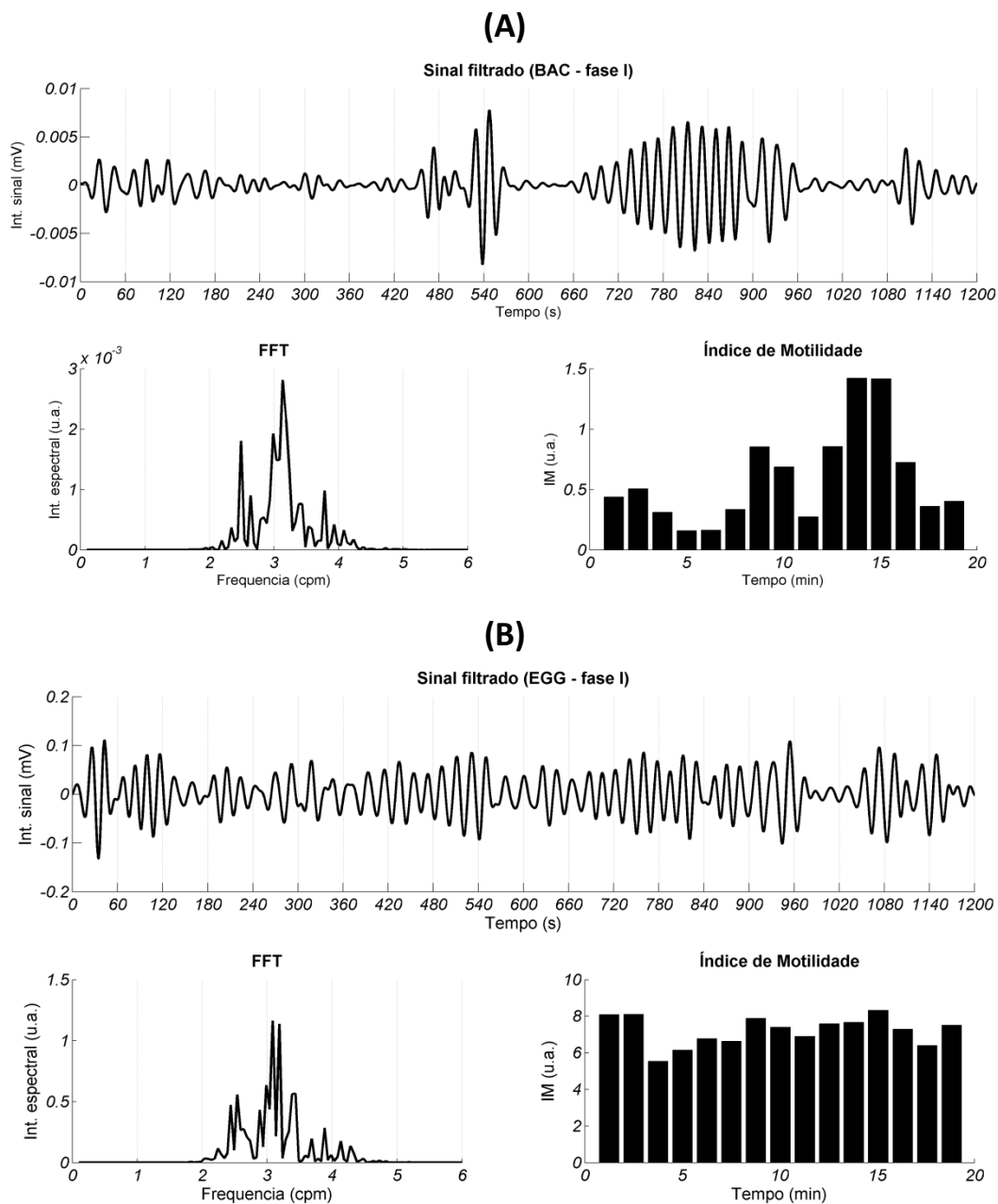


Figura 4.02: Perfil da Atividade de Contração Gástrica (ACG) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM) mensuradas por BAC (A) e por EGG (B). Sinal adquirido imediatamente após a ingestão do comprimido magnético, na fase I (controle).

Na Figura 4.03 estão representados os sinais magnéticos que registraram a ACC durante a fase controle. Foi possível registrar a atividade de contração típica, caracterizada por uma frequência dominante em torno de 5 ciclos por minuto

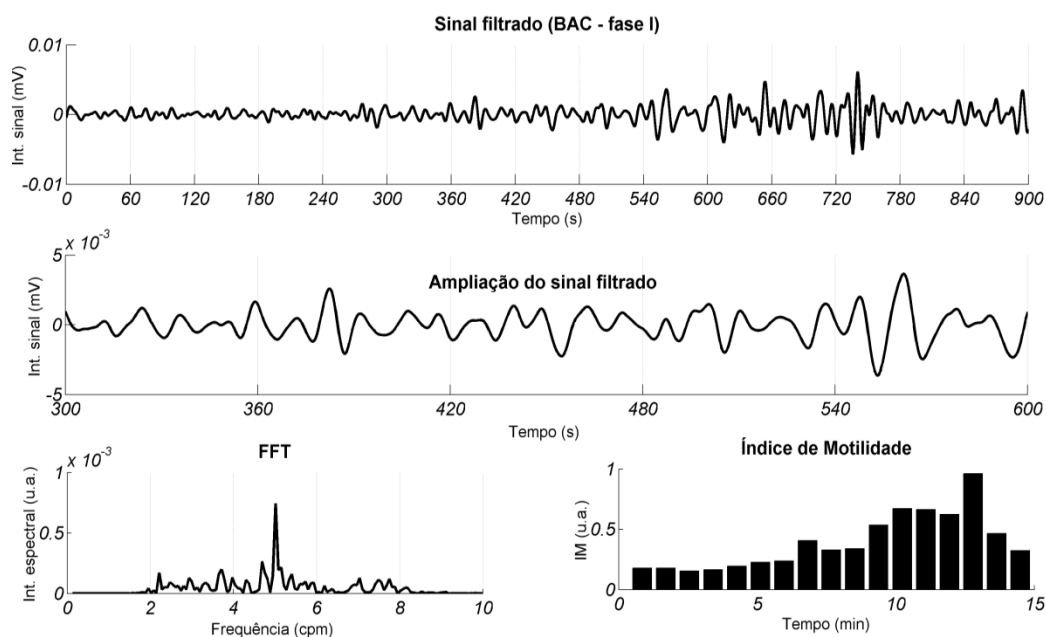


Figura 4.03: Perfil da Atividade de Contração Colônica (ACC) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM). Sinal adquirido após chegada do comprimido na região de interesse, na fase I (controle).

Na Figura 4.04, estão representados os sinais magnéticos (A) e elétricos (B) que registraram a ACG após administração do comprimido magnético a um voluntário avaliado na fase procinético. Observa-se que a ACG registrada pela BAC, sob efeito de Domperidona, apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) em frequência e amplitude quando comparada ao controle, sendo a frequência predominante obtida em torno de 3,2 ciclos por minuto (cpm).

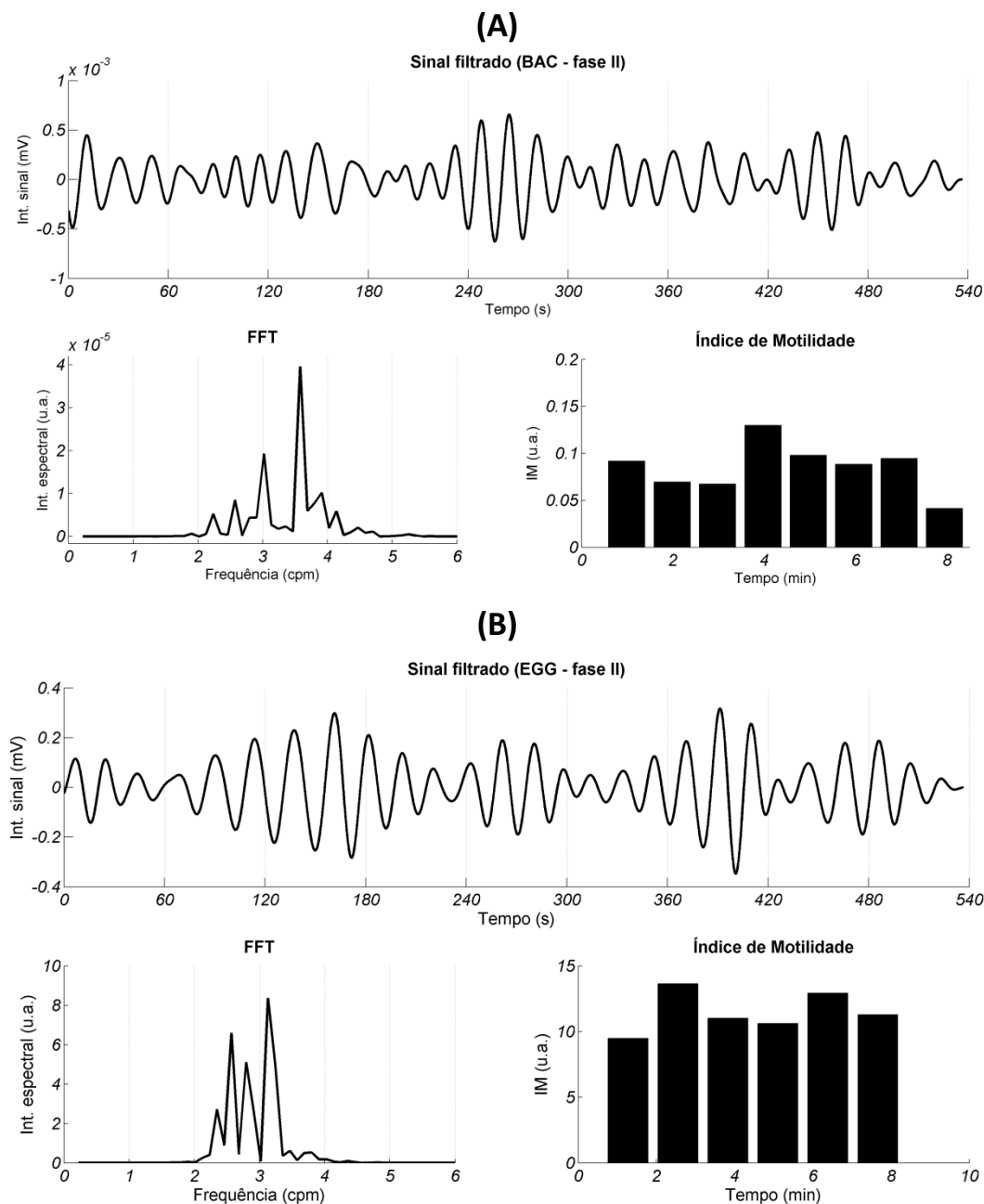


Figura 4.04: Perfil da Atividade de Contração Gástrica (ACG) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM), mensuradas por BAC **(A)** e por EGG **(B)**. Sinal adquirido imediatamente após a ingestão do comprimido magnético, durante a fase II (Domperidona).

A atividade de contração colônica registrada pelos sensores magnéticos não apresentou modificação nos padrões de frequência e amplitude dos sinais adquiridos, sob efeito de Domperidona (Figura 4.05).

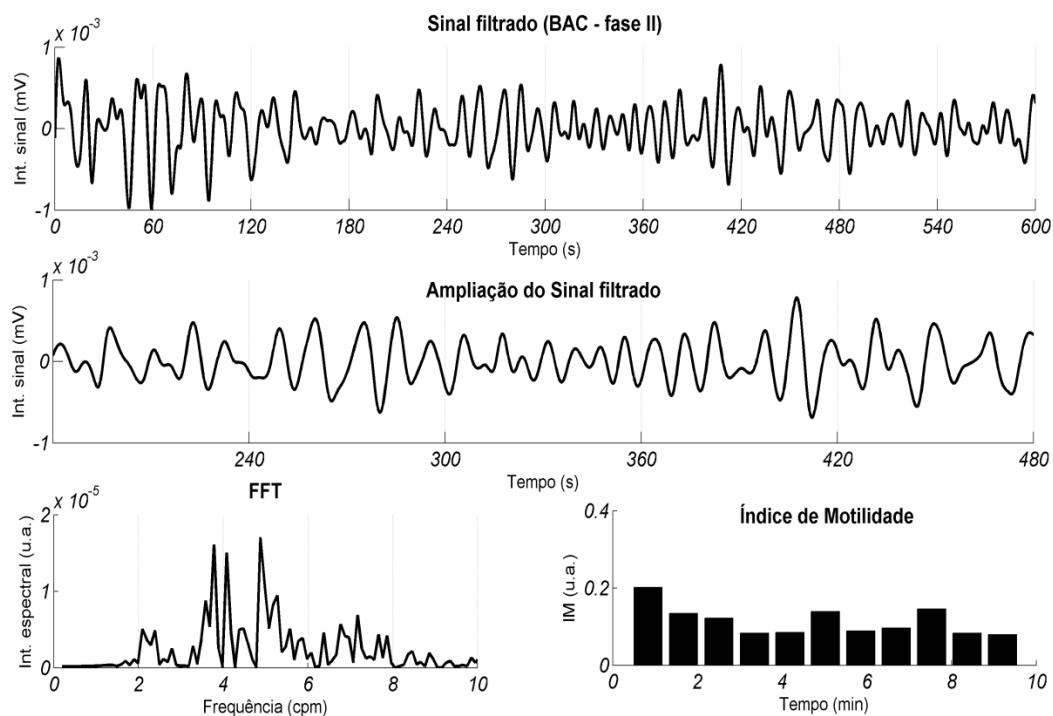


Figura 4.05: Perfil da Atividade de Contração Colônica (ACC) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM). Sinal adquirido após chegada do comprimido na região de interesse, na fase II (Domperidona).

A Figura 4.06 mostra os sinais magnéticos e elétricos que registraram a ACG sob influência do antimuscarínico Butilbrometo de Escopolamina. Não houve diferença significativa na frequência registrada quando comparado ao controle, tanto no registro magnético (A), quanto no elétrico (B). No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na amplitude das contrações obtidas pelos registros magnéticos.

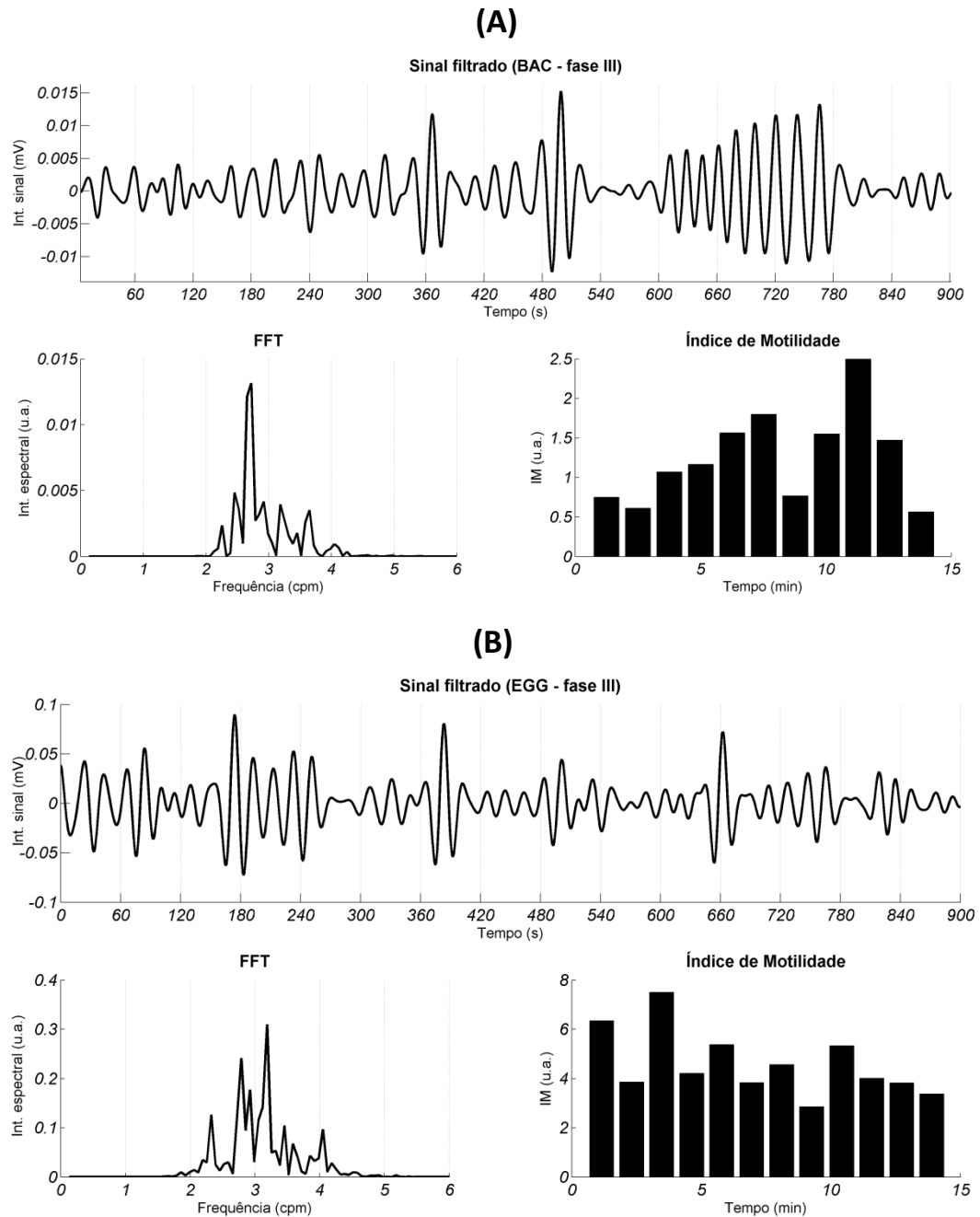


Figura 4.06 Perfil da Atividade de Contração Gástrica (ACG) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM), mensuradas por BAC **(A)** e por EGG **(B)**. Sinal adquirido imediatamente após a ingestão do comprimido magnético, na fase III (Butilbrometo de escopolamina).

A atividade de contração colônica também foi registrada nessa condição, ou seja, sob influência de antimuscarínico, sendo os sinais adquiridos representados na Figura 4.07. Não foi observada diferença significativa entre a frequência e o índice de motilidade em comparação ao controle.

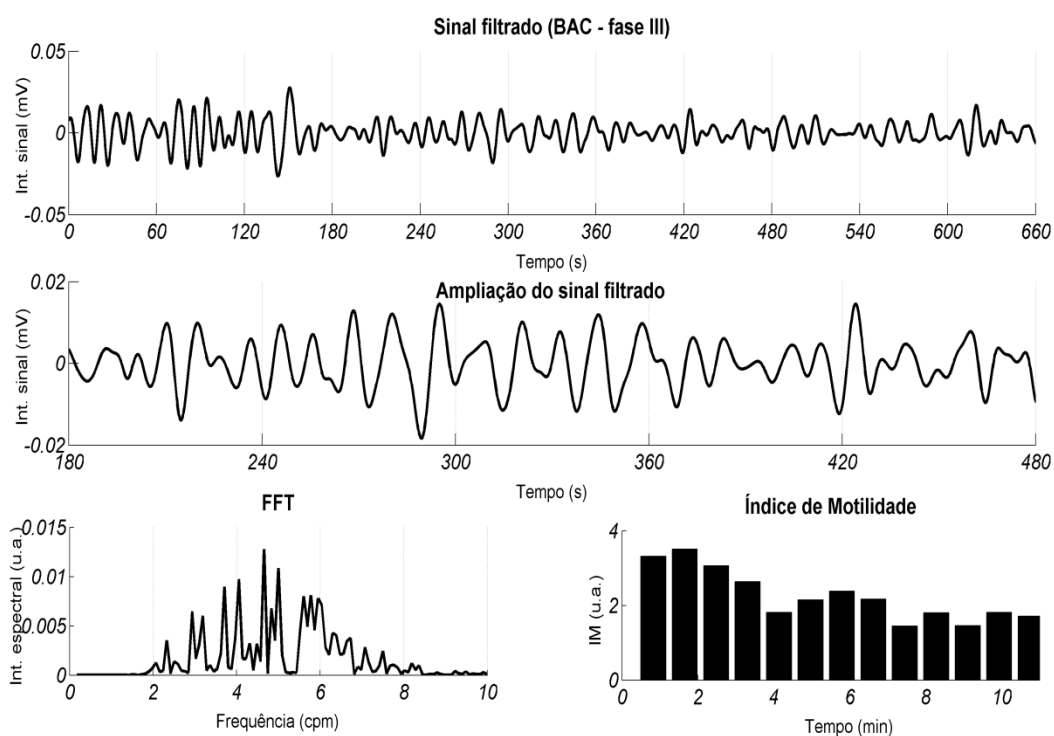


Figura 4.07: Perfil da Atividade de Contração Colônica (ACC) e respectivas Transformada Rápida de Fourier (FFT) e Índice de Motilidade (IM). Sinal adquirido após chegada do comprimido na região de interesse, na fase III (Butilbrometo de escopolamina).

A tabela 4.01 sumariza as frequências de contração gástrica e colônica obtidas em cada uma das fases do estudo. As médias foram comparadas com o controle e apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) quando estão identificadas com um asterisco.

Tabela 4.01: Distribuição dos dados de atividade de contração gástrica e colônica em termos de frequência e índice de motilidade, utilizando a técnica de BAC e de EGG. As médias foram comparadas com o controle. O asterisco simboliza diferença significativa, ($p < 0,05$).

Voluntários		Atividade de Contração Gástrica e Colônica					
		BAC - Estômago		EGG		BAC - Cólon	
		Freq (cpm)	IM	Freq (cpm)	IM	Freq (cpm)	IM
Fase I - Controle	1	3	0,9	3	6	5,1	0,8
	2	3	0,5	3	7,5	6,1	0,7
	3	2,9	1,6	2,9	8	4,9	0,7
	4	3	1,2	3	9	4,4	1,1
	5	3,2	1,6	3,2	8	5,1	0,8
	6	3,1	1,5	3,1	7	5,5	1,5
	7	3,05	1,3	3,05	10	5,9	1,3
	8	2,6	1,5	2,75	9	5	0,5
Média ± DP		2,98±0,17*	1,26±0,38*	3,00±0,13	8,06±1,26	5,25±0,55	0,92±0,34
Fase II - Domperidona	1	3	1,8	3	10	5	1
	2	3,5	1,2	3,35	5,5	5,4	0,8
	3	3,3	2,4	3,1	9	5,5	1,3
	4	3,4	1,9	3,4	9	5,3	1
	5	3,2	1,7	3,2	10	5	1
	6	3	2	2,9	7	6,4	1,1
	7	3,2	2,1	3,1	7	5,3	1
	8	3,5	2,9	3,1	11	5	0,6
Média ± DP		3,20±0,19*	2,00±0,50*	3,14±0,16	8,56±1,88	5,36±0,46	0,97±0,20
Fase III - Butilbrometo de Escopolamina	1	3,1	0,8	3	5	4	0,5
	2	2,9	0,3	2,8	7	5,5	0,7
	3	2,6	1,1	2,7	8	6	0,8
	4	2,7	0,9	2,7	9,2	5,2	0,9
	5	3	0,5	3	7,7	4,4	0,9
	6	3,1	1,1	3	7,3	4,6	1,3
	7	3	0,5	2,9	9	5	1
	8	2,7	0,8	3,1	8,5	5	0,6
Média ± DP		2,88±0,19	0,75±0,29*	2,90±0,15	7,71±1,34	4,96±0,63	0,83±0,25

4.3. TRÂNSITO DO COMPRIMIDO E IMAGENS MAGNÉTICAS

A Figura 4.08 é a representação gráfica do perfil do trânsito gastrintestinal obtido para os comprimidos magnéticos nas fases controle (A), procinético (B) e antimuscarínico (C), segundo a mensuração da área magnética na região de projeção colônica. TRG (Tempo de Retenção Gástrico: tempo entre a ingestão do comprimido e a última mensuração na região gástrica) e TCC (Tempo de Chegada ao Cólon: tempo decorrido da ingestão até a chegada ao cólon) estão indicados nos gráficos. O TTI (Tempo de Trânsito Intestinal: tempo em que o comprimido transitou o intestino delgado) pode ser calculado segundo a expressão: $TTI = TCC - TRG$. A medida de TRG foi obtida através do monitoramento da região de projeção gástrica desde o início do estudo.

Na tabela 4.02 estão representados os parâmetros referentes ao trânsito gastrintestinal dos comprimidos obtidos nas medidas com os voluntários nas fases controle, procinético e antimuscarínico. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os registros de TRG, em comparação com o controle, tanto sob efeito de Domperidona, quanto de Butilbrometo de Escopolamina. Também houve diferença significativa entre TCC sob efeito de Butilbrometo de Escopolamina. TCC sob efeito de Domperidona e o TTI não tiveram diferença significativa em comparação ao controle.

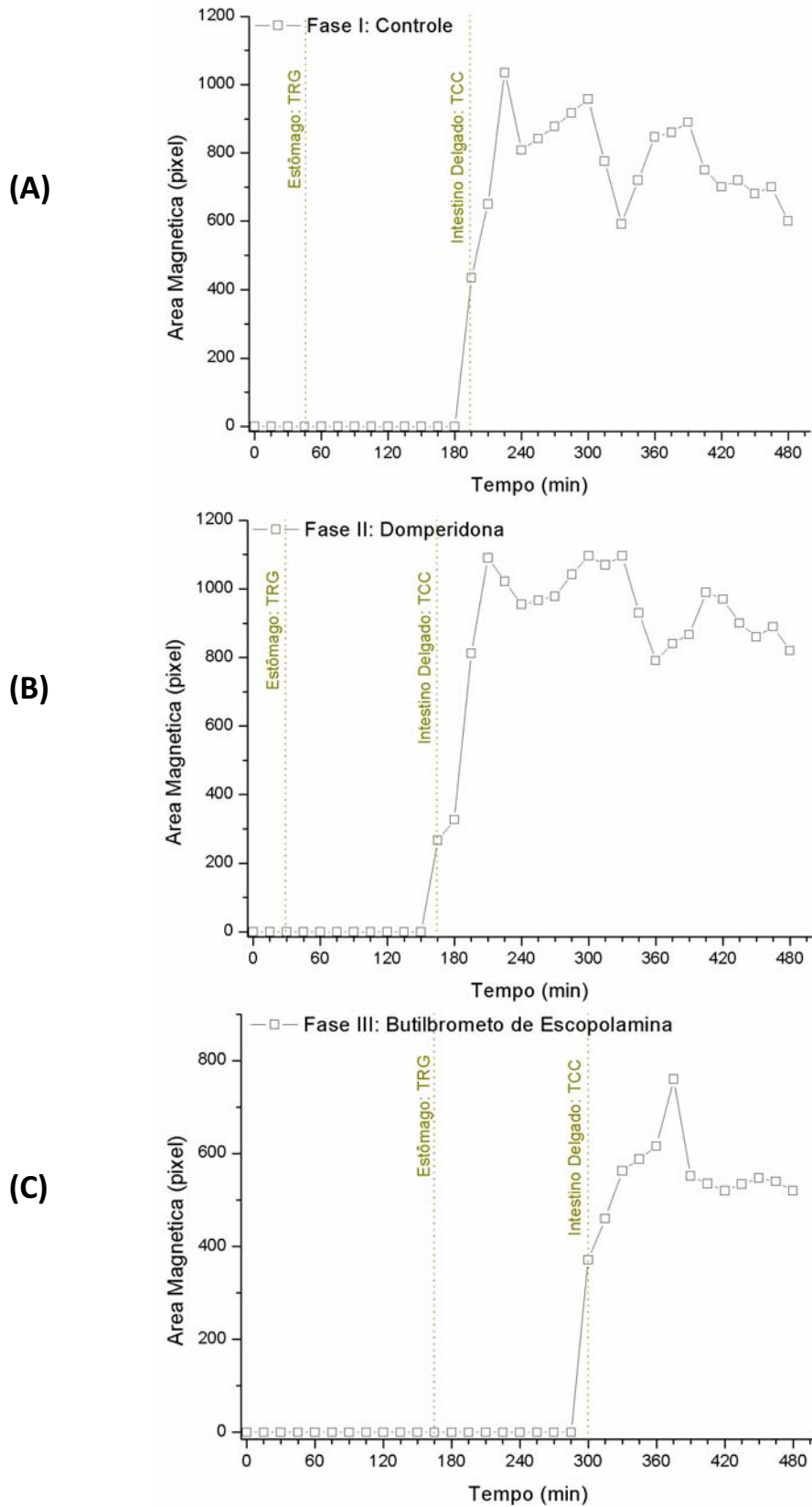


Figura 4.08: Perfil do trânsito gastrointestinal de um comprimido magnético, mensurado segundo a área magnética colônica. O painel (A) apresenta o perfil de Fase I – Controle; o painel (B) apresenta o perfil de Fase II: Domperidona; o painel (C) apresenta o perfil de Fase III - Butilbrometo de Escopolamina, para um mesmo voluntário.

Tabela 4.02: Tempo de trânsito do comprimido magnético no trato gastrointestinal, quantificado na fase controle e sob efeito de Domperidona e de Butilbrometo de Escopolamina. As médias foram comparadas com o controle. O asterisco simboliza diferença significativa, ($p < 0,05$).

Voluntários		Parâmetros do Trânsito Gastrointestinal (min)		
		TRG	TCC	TTI
Fase I - Controle	1	75	150	75
	2	120	210	90
	3	120	210	90
	4	90	225	135
	5	135	300	165
	6	90	210	120
	7	45	225	180
	8	45	195	150
Média ± DP		90,00 ± 34,02*	215,63 ± 41,61*	125,63 ± 38,40
Fase II - Domperidona	1	45	210	165
	2	90	180	90
	3	45	195	150
	4	60	240	180
	5	90	180	90
	6	90	165	75
	7	30	270	240
	8	30	165	135
Média ± DP		60,00 ± 26,59*	200,63 ± 37,55	140,63 ± 55,51
Fase III – Butilbrometo de Escopolamina	1	120	255	135
	2	165	300	135
	3	180	300	120
	4	150	255	105
	5	195	315	120
	6	150	270	120
	7	120	225	105
	8	165	300	135
Média ± DP		155,63 ± 26,51*	277,50 ± 31,06*	121,88 ± 12,52

Os mapeamentos magnéticos realizados na região colônica demonstram a chegada do comprimido no cólon. Esse monitoramento, após tratamento digital, possibilita a análise de evolução da área magnética no local, demonstrando a ocorrência e o tempo necessário para o processo de desintegração. Abaixo, estão apresentadas sequências de imagens do comprimido na região, em que $t=0$ representa a chegada do comprimido no cólon, $t=15$ demonstra a evolução da área após 15 minutos e $t=60$ após 60 minutos. As figuras 4.09, 4.10 e 4.11 apresentam as imagens do comprimido para um mesmo voluntário, respectivamente para fase I, fase II e fase III do estudo.

O tempo de desintegração (TD) foi calculado como sendo o aumento de 50% na área das imagens magnéticas. TD não apresentou diferença significativa entre as fases do estudo, ou seja, controle, Domperidona e Butilbrometo de Escopolamina.

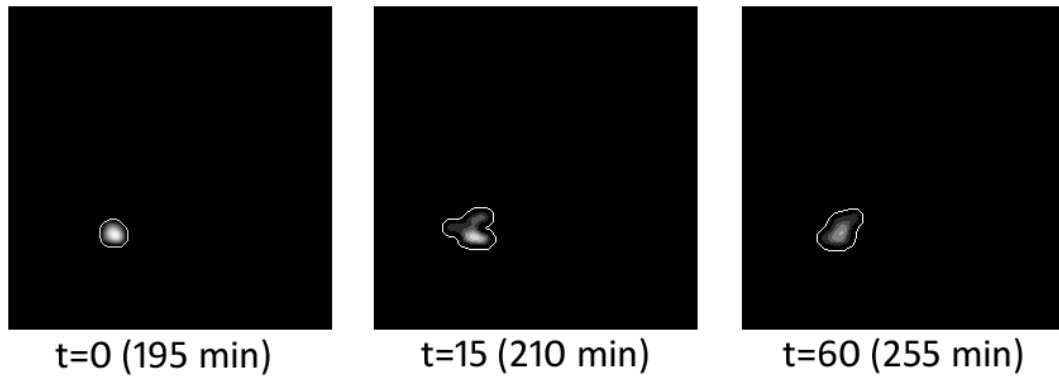


Figura 4.09: Sequência de imagens magnéticas realizadas através do processamento digital dos mapeamentos colônicos na **fase I** do estudo. O painel A (t=0) demonstra a chegada do comprimido ao cólon; B (t=15) 15 minutos após a chegada; C (t=60) 60 minutos após a chegada.

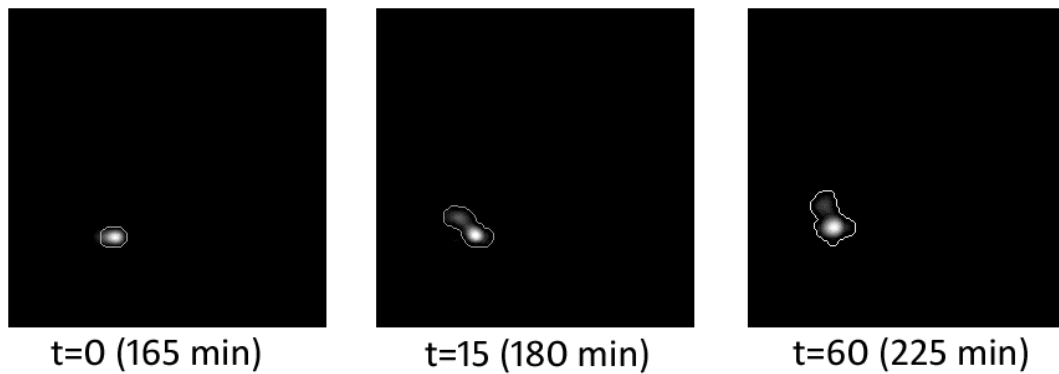


Figura 4.10: Sequência de imagens magnéticas realizadas através do processamento digital dos mapeamentos colônicos na **fase II** do estudo. O painel A (t=0) demonstra a chegada do comprimido ao cólon; B (t=15) 15 minutos após a chegada; C (t=60) 60 minutos após a chegada.

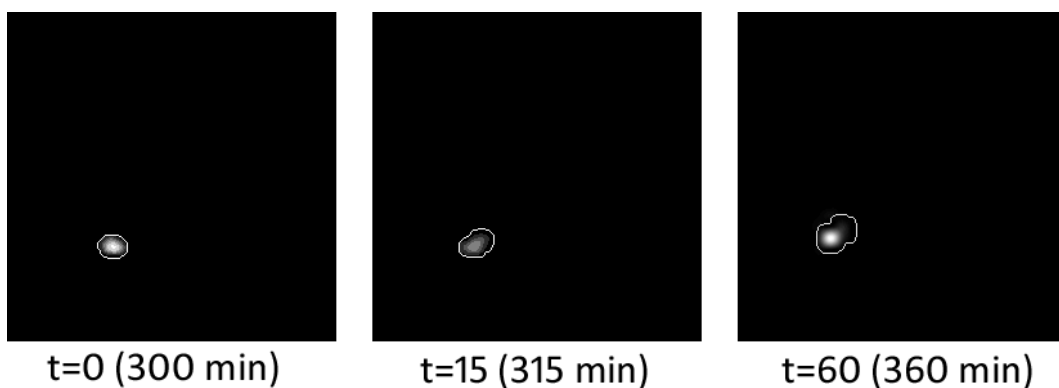


Figura 4.11: Sequência de imagens magnéticas realizadas através do processamento digital dos mapeamentos colônicos na **fase III** do estudo. O painel A (t=0) demonstra a chegada do comprimido ao cólon; B (t=15) 15 minutos após a chegada; C (t=60) 60 minutos após a chegada.

4.4. FARMACOCINÉTICA

Os perfis de concentração sérica obtidos para as três fases do estudo estão ilustrados na Figura 4.12.

Os parâmetros farmacocinéticos T_{lag} , C_{max} , T_{max} e ASC_{0-t} estão representados na Tabela 4.03. Não foi registrada diferença significativa na biodisponibilidade do fármaco, quando comparado ao controle, nos voluntários sob tratamento com Domperidona. No entanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre o controle e os tratados com Butilbrometo de Escopolamina, quanto ao T_{lag} .

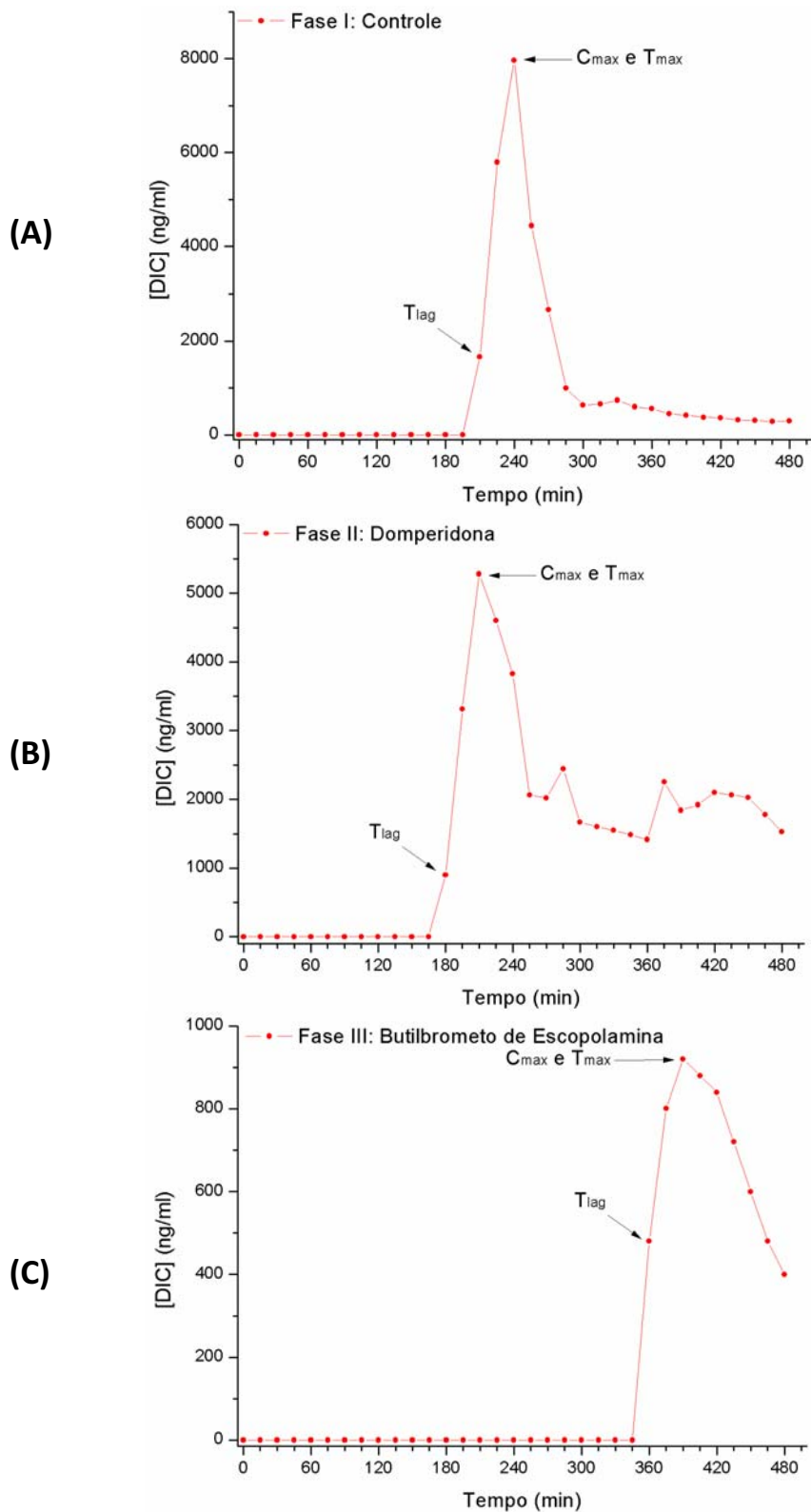


Figura 4.12: Perfil da concentração sérica de Diclofenaco Sódico. O painel (A) apresenta o perfil de Fase I – Controle; o painel (B) apresenta o perfil de Fase II: Domperidona; o painel (C) apresenta o perfil de Fase III - Butilbrometo de Escopolamina, para um mesmo voluntário.

Tabela 4.03: Parâmetros farmacocinéticos para as fases I, II e III do estudo, em que T_{lag} é o tempo de primeira mensuração de Diclofenaco; C_{max} é a máxima concentração mensurada; T_{max} é o tempo para C_{max} ; e AUC_{0-t} é a quantificação da área sob a curva do tempo 0 até 8 horas. As médias foram comparadas com o controle. O asterisco simboliza diferença significativa, ($p < 0,05$).

Voluntários		Parâmetros Farmacocinéticos			
		T_{lag} (min)	T_{max} (min)	C_{max} (ng.ml ⁻¹)	ASC_{0-t} (ng.h.ml ⁻¹)
Fase I - Controle	1	165	300	8.270	484.019
	2	195	360	2.181	316.311
	3	210	210	586	74.379
	4	225	225	4.753	270.538
	5	315	315	14.507	918.479
	6	210	240	502	55.611
	7	225	240	427	637.350
	8	210	240	7.962	735.419
Média ± DP		219,37±43,13*	266,25±52,42	3.273±3.304	436.513±312.238
Fase II - Domperidona	1	195	255	3.532	398.180
	2	195	270	2.781	202.590
	3	210	225	4.524	489.123
	4	225	225	5.912	671.556
	5	165	180	1.835	69.358
	6	180	270	7.962	735.419
	7	255	285	4.225	574.478
	8	180	210	5.280	705.835
Média ± DP		200,62±28,83	240,00±35,86	4.506±1.914	480.817±243.256
Fase III – Butilbrometo de Escopolamina	1	270	300	6.490	933.028
	2	315	330	5.991	801.935
	3	330	285	4.540	700.354
	4	270	270	1.820	370.045
	5	330	300	5.664	807.935
	6	285	285	9.312	220.004
	7	240	255	2.423	359.098
	8	360	390	5.115	129.229
Média ± DP		300,00±40,09*	301,87±41,99	5.169±2.359	540.203±305.502

4.5. FARMACOMAGNETOGRAFIA:

A Figura 4.13 mostra a relação entre o trânsito gastrointestinal avaliado pelo método magnético e o perfil farmacocinético obtido em cada uma das fases propostas para o estudo: controle (A), procinético (B) e antimuscarínico (C), processo denominado Farmacomagnetografia. Os perfis apresentados demonstram as alterações de trânsito do comprimido magnético e das curvas de concentração sérica de Diclofenaco Sódico.

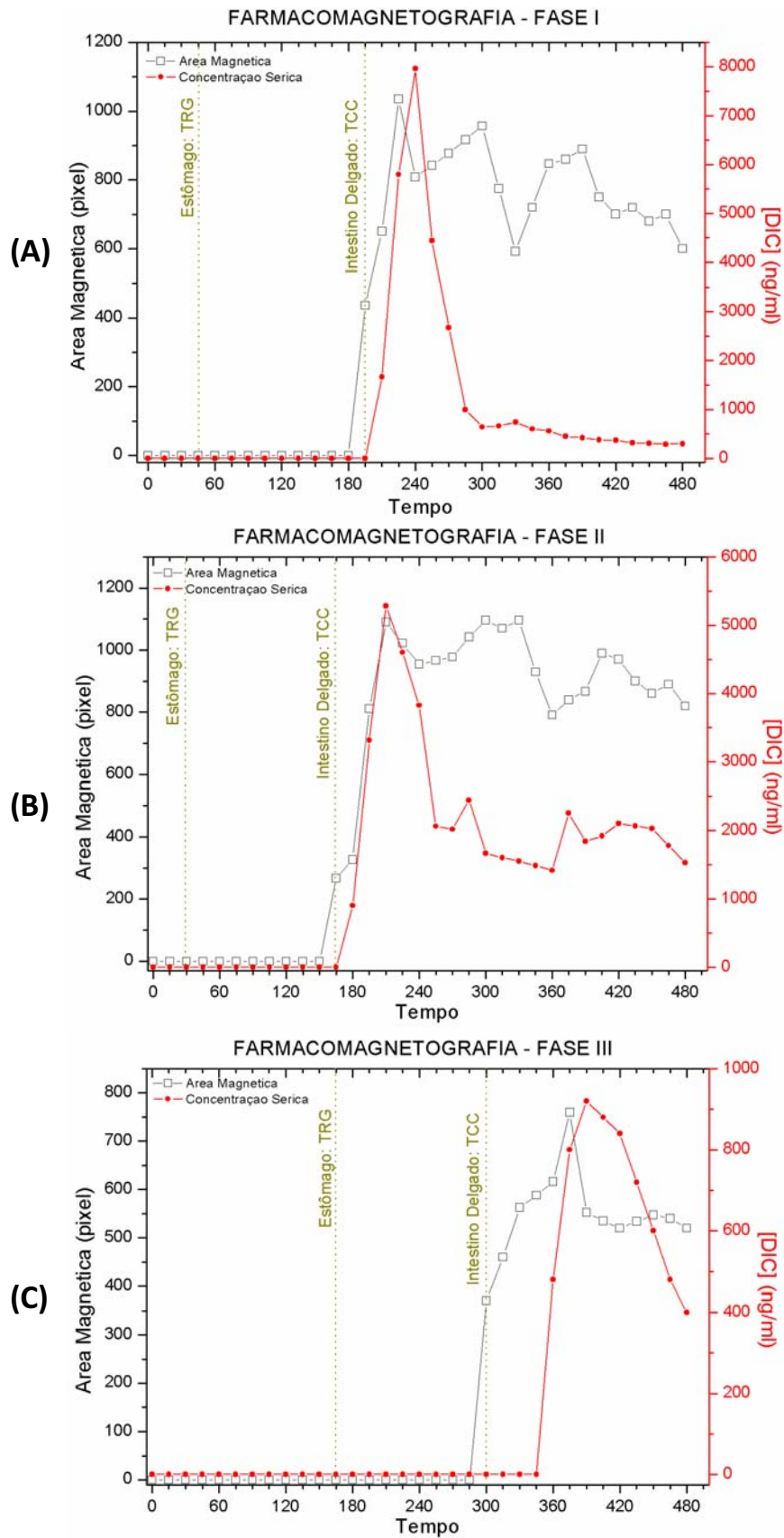


Figura 4.13: Farmacomagnetografia para um mesmo voluntário nas fases I (A), II (B) e III (C) do estudo. As linhas pontilhadas marcam o TRG e TCC em cada estudo.

A tabela 4.04 apresenta a quantificação dos parâmetros TD, relativo ao processo de desintegração do comprimido, e TA, relativo ao processo de absorção do fármaco. Não foi observada diferença significativa entre a comparação das fases II e III com o controle.

Tabela 4.04: Quantificação dos parâmetros de tempo de desintegração (TD) e de absorção (TA), para os comprimidos magnéticos revestidos nas 3 fases do estudo. Não há diferença significativa entre as médias, quando comparadas com o controle, para $p < 0,05$.

Voluntários		Desintegração do Comprimido e Absorção do Fármaco	
		TD (min)	TA (min)
Fase I - Controle	1	45	75
	2	41	90
	3	18	8
	4	38	8
	5	23	8
	6	23	23
	7	15	15
	8	23	23
Média ± DP		28,25±11,35	30,94±32,68
Fase II - Domperidona	1	21	40
	2	30	45
	3	25	15
	4	38	9
	5	15	15
	6	23	53
	7	15	25
	8	30	20
Média ± DP		24,63±7,90	27,19±16,00
Fase III – Butilbrometo de Escopolamina	1	25	23
	2	18	15
	3	15	15
	4	15	8
	5	20	9
	6	18	8
	7	25	15
	8	45	21
Média ± DP		22,63±9,84	14,06±6,26

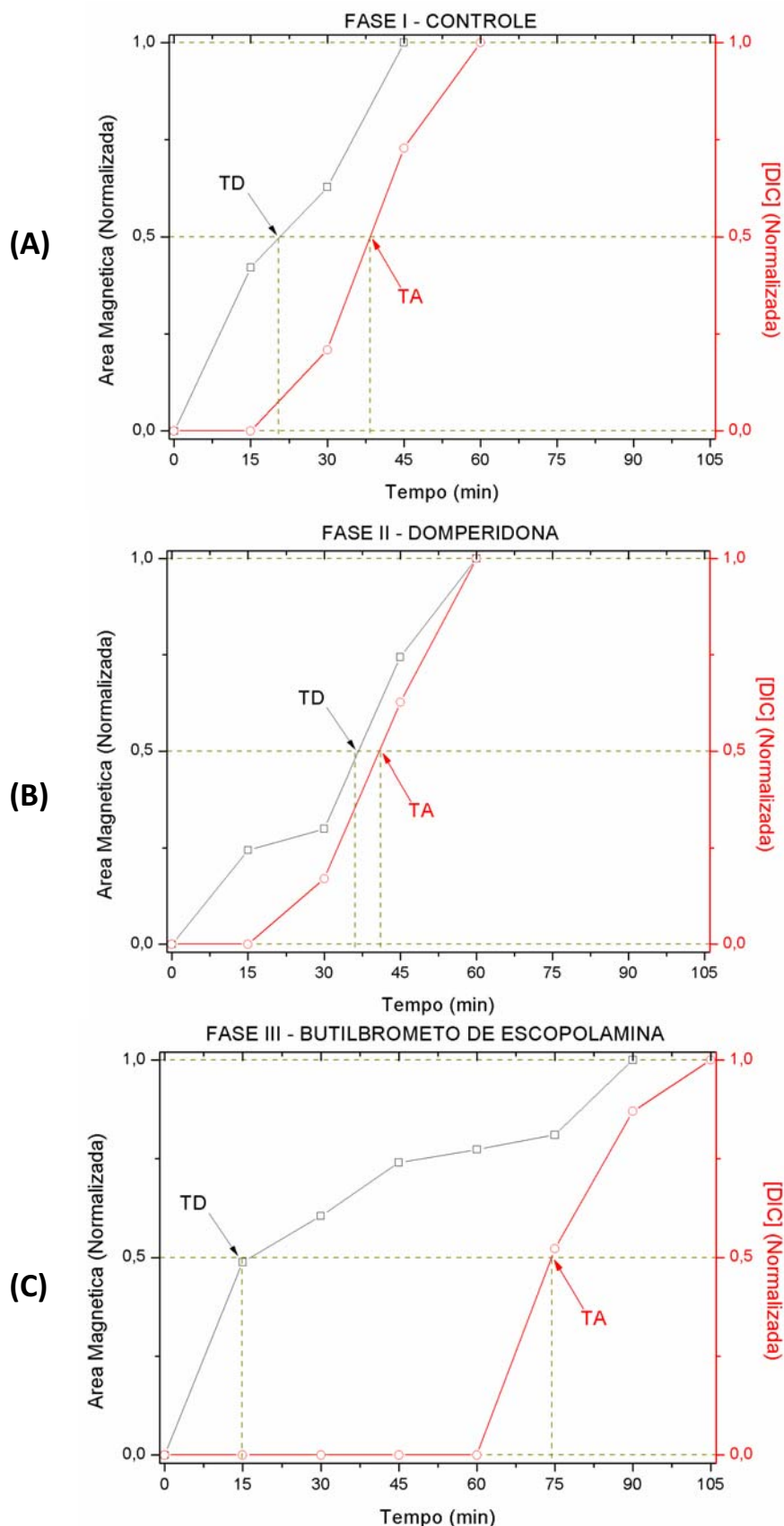


Figura 4.14: Evolução da área magnética e concentração sérica de Diclofenaco Sódico, de $t=0$ (15 minutos antes do primeiro registro) até o registro de intensidade máxima. TD representa o tempo de desintegração do comprimido e TA o tempo de absorção do fármaco, nas fases I (A), II (B) e III (C).

A figura 4.14, acima, apresenta os parâmetros de área magnética e concentração sérica de Diclofenaco Sódico normalizados. Essa construção considerou os parâmetros do tempo $t=0$ (15 minutos antes de ocorrer a primeira leitura para ambos os parâmetros) até o registro de máxima intensidade. TD representa o tempo correspondente ao t_{50} , ponto em que foi atingido metade da área máxima registrada. Analogamente, TA corresponde ao t_{50} para C_{max} .

A figura 4.15, abaixo, apresenta as correlações entre os parâmetros TCC e T_{lag} , para as três fases do estudo. O painel A apresenta a correlação para a fase controle ($r^2=0,93$), o painel (B) a correlação para a fase Domperidona ($r^2=0,82$) e o painel (C) a correlação para a fase Butilbrometo de Escopolamina ($r^2=0,84$).

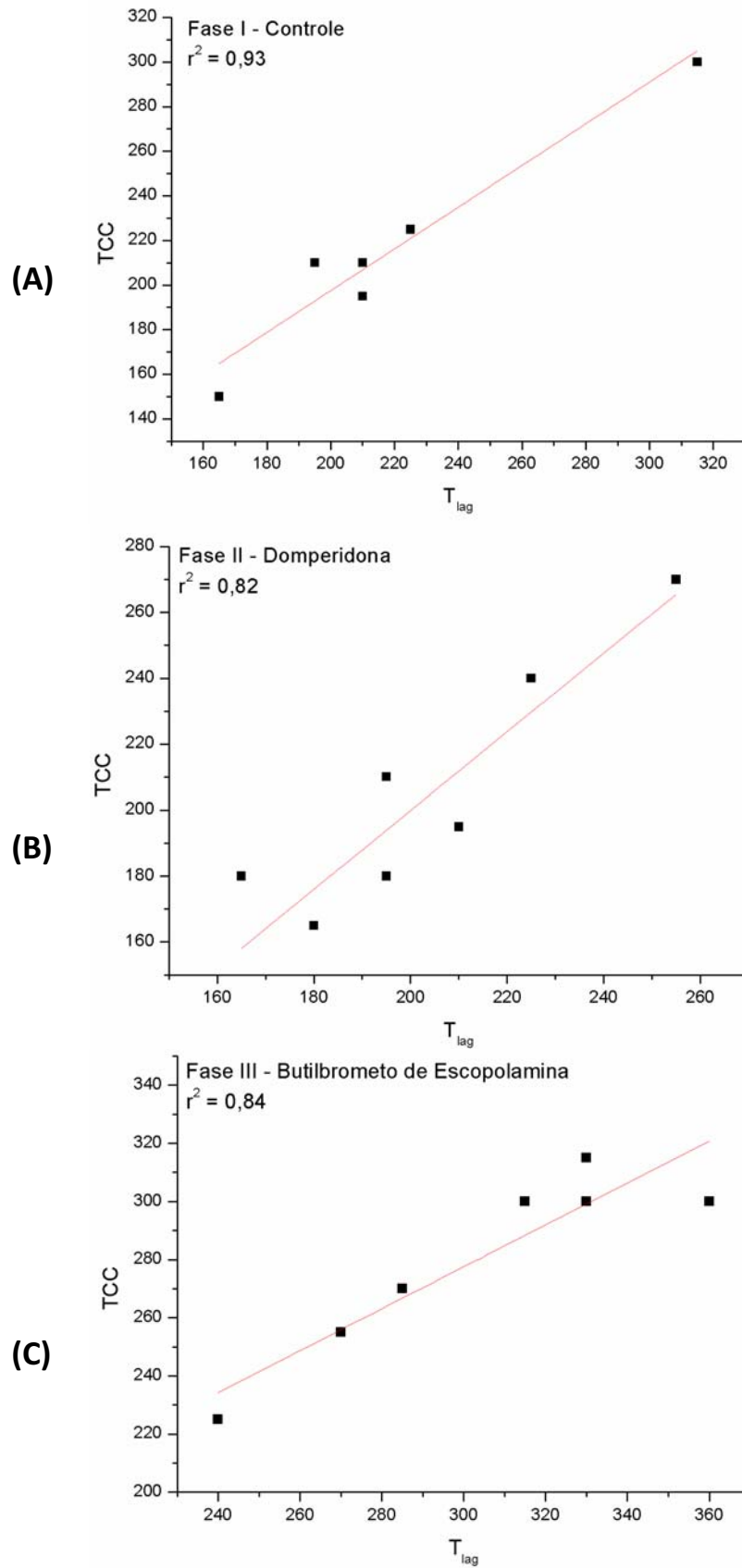


Figura 4.15: Correlação entre TCC e T_{lag} , nas fases I (A), II (B) e III (C).

Capítulo 5

**Discussão e
Conclusão**

Capítulo 5 – Discussão e Conclusão

Sendo a via oral uma rota importante para administração de fármacos, é plausível supor que o desenvolvimento de novos produtos requeira o conhecimento da fisiologia normal do trato gastrointestinal (TGI) bem como de suas alterações. Isso porque a absorção do fármaco é um processo influenciado não apenas por parâmetros biofarmacêuticos, mas, principalmente, pelas variáveis fisiológicas do TGI (McCONNELlet *al.*, 2008). Assim, o esvaziamento gástrico, a motilidade gastrointestinal, as variações de pH ao longo do TGI e o trânsito gastrointestinal são alguns dos fatores que influenciam diretamente a biodisponibilidade do fármaco, podendo limitar a fração da dose absorvida (MARTINEZ & AMIDON, 2002; McCONNELlet *al.*, 2008; VARUM *et al.*, 2010). Ademais, esses parâmetros podem ser modificados em detrimento de doenças, interações com medicamentos ou por intervenções cirúrgicas.

Considerando essas propriedades, a indústria farmacêutica investe continuamente na pesquisa e desenvolvimento de produtos que atuem com maior eficácia, visando a liberação em regiões alvo-específicas no TGI. Nesse contexto, o cólon tem sido explorado como local para liberação de fármacos tanto para ação local quanto sistêmica. Essa região é, ainda, afetada por doenças inflamatórias como a colite ulcerativa, fato que despertou interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação específicos (CHOURASIA & JAIN, 2003; FREIRE *et al.*, 2006).

A liberação colônica de fármacos é possível por meio de duas estratégias farmacêuticas: uma envolve a utilização de sistemas ativados ou degradados pelas bactérias presentes na região e a outra, a utilização de sistemas pH-dependentes (SHAREEF *et al.*, 2003; McCONNELlet *al.*, 2008).

Sistemas pH-dependentes visando a liberação colônica de fármacos foram desenvolvidos utilizando-se polímeros específicos que atuam prevenindo ou evitando a liberação

de fármacos no TGI superior. Sua principal característica é a dissolução na faixa de pH compreendida entre 6,8 e 7,4, encontrada na região ileocolônica (DITZGEN *et al.*, 1997). Os polímeros do ácido metacrílico, comercializados como Eudragit® são amplamente utilizados para essa finalidade.

Os comprimidos revestidos obtidos para esse estudo foram caracterizados quanto ao perfil de dissolução do fármaco, demonstrando que o revestimento proposto foi efetivo para promover a liberação na faixa de pH encontrada no cólon do homem (Figura 4.01).

Apesar dos ensaios *in vitro* fornecerem importantes informações sobre o desempenho das formas farmacêuticas em condições que simulam o ambiente gastrointestinal, não permitem estimar com precisão todos os parâmetros fisiológicos que podem influenciar os diferentes processos envolvidos na liberação de um fármaco. Por essa razão, os ensaios *in vivo* que permitem monitorar simultaneamente os parâmetros motores do TGI e o comportamento de uma forma farmacêutica sólida são oportunos, visto que proporcionam uma avaliação mais precisa da liberação alvo-específica e biodisponibilidade do fármaco.

Para uma análise acurada envolvendo sistemas de liberação de fármacos e parâmetros fisiológicos, os ensaios *in vivo* devem ser realizados por meio de técnicas não invasivas e, preferencialmente, que não envolvam riscos aos pacientes e/ou voluntários. Nesse contexto, as técnicas biomagnéticas vem se destacando em relação aos métodos tradicionalmente empregados nesse tipo de análise (WEITSCHIES *et al.*, 2005; 2008; CORA *et al.*, 2010a,b).

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica que, atualmente, se estabeleceu como uma ferramenta importante na pesquisa farmacêutica. Na última década, foi aplicada em diversos estudos para avaliar processos farmacêuticos *in vitro* bem como no TGI do homem (CORÁ *et al.*, 2003, 2005a, 2005b, 2006, 2009, 2010). Diante dos bons resultados apresentados, foi possível associá-la a análise farmacocinética e introduzir um novo conceito em

estudos que investigam a influência dos parâmetros motores do TGI na biodisponibilidade de fármacos: a farmacomagnetografia.

Nesse trabalho, a BAC foi utilizada para avaliar a motilidade gástrica e colônica, bem como o trânsito gastrointestinal de comprimidos revestidos em voluntários saudáveis em três condições distintas: controle, sob influência de procinético (Domperidona) e antimuscarínico (Butilbrometo de Escopolamina). Além disso, permitiu caracterizar o processo de desintegração dos comprimidos na região colônica por meio de imagens magnéticas.

Em termos de motilidade, as figuras 4.02, 4.04 e 4.06 retratam os sinais magnéticos e elétricos da atividade de contração gástrica (ACG), respectivamente para fase I, II e III do estudo. A ACG apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) frente à intervenção de uma dose única de Domperidona (40 mg), 30 minutos previamente ao início do experimento, bem como a análise por índice de motilidade (IM), que mede a intensidade da atividade de contração, corroborando a atividade procinética desse fármaco. Frente à administração do antimuscarínico Butilbrometo de Escopolamina (40 mg), também 30 minutos previamente ao início do estudo, não houve diferença significativa em termos de frequência da ACG, no entanto foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, corroborando, também, o efeito esperado desse fármaco e de acordo com os resultados demonstrados por Américo *et al.*, 2009. Nenhuma diferença significativa foi registrada em termos de frequência e IM para as aquisições de sinal elétrico (EGG).

A atividade de Contração Colônica (ACC) está representada nas figuras 4.03, 4.05 e 4.07, respectivamente para fase I, II e III do estudo. Nenhuma alteração significativa foi registrada em termos de frequência e IM nas três fases do estudo.

Em se tratando do trânsito gastrointestinal, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de retenção gástrica (TRG), sob efeito da Domperidona, quando comparado com o controle. Não houve diferença quanto ao tempo de chegada ao cólon (TCC) e tempo de

trânsito intestinal (TTI). Sob efeito de Butilbrometo de Escopolamina, foi registrado significativo aumento no TRG e no TCC, porém não quanto ao TTI.

O processo de desintegração dos comprimidos magnéticos foi caracterizado por imagens temporais obtidas a partir dos monitoramentos em intervalos pré-determinados (figura 3.05). A evolução da área das imagens, caracterizadas por um espalhamento do material magnético na extensão do cólon, foi determinada para mensurar o tempo de desintegração (TD) (CORÁ *et al.*, 2005b). Não foi observada diferença significativa no TD dos comprimidos ($p < 0,05$), frente a administração dos fármacos propostos no estudo (tabela 4.04).

Esse fato, aliado aos resultados de trânsito gastrointestinal, retrata que esses fármacos possuem ação mais pronunciada na motilidade do TGI superior. Os picos de concentração plasmática ocorrem em torno de 60 minutos e a meia vida é superior a 6 horas para os dois fármacos (Domperidona e Butilbrometo de Escopolamina) (RAMNARACE & DALTON, 2010). Dessa forma, ainda considerando o metabolismo de primeira passagem, há ação farmacológica em torno de 4 a 5 horas após a ingestão, tempo em que ocorreram os registros colônicos.

A figura 4.12 apresenta os perfis farmacocinéticos obtidos nas medidas em um voluntário nas fases controle (painel A), procinético (painel B) e antimuscarínico (painel C). A liberação do fármaco ocorreu rapidamente na região colônica. Note que o perfil de liberação e absorção do fármaco é bastante semelhante, sendo registrada uma visível variação no tempo de primeira quantificação (T_{lag}), em virtude da alteração de trânsito da forma farmacêutica, provocada pela administração dos fármacos. Houve diferença significativa no T_{lag} apenas em relação à administração do antimuscarínico. Concentração máxima (C_{max}), T_{max} (tempo de C_{max}) e área sob a curva (AUC_{0-t}) não apresentaram diferença significativa nas três fases do estudo. Esse fato está associado a duas circunstâncias: variabilidade na aplicação do revestimento e, mais relevante no processo, a variabilidade biológica encontrada.

O estudo apresentou uma boa validação técnica entre BAC e farmacocinética, verificada pela boa correlação entre os parâmetros TCC e T_{lag} , uma referência entre a chegada do comprimido ao cólon e a biodisponibilidade do fármaco marcador, registrando um coeficiente de 0,93 (figura 4.15 (A)) para o controle, 0,82 para Domperidona e 0,84 para Butilbrometo de Escopolamina.

Isso posto, é possível inferir que apenas os testes *in vitro* indicados não simulam adequadamente a condição *in vivo* ou não são absolutamente precisos. Portanto, uma avaliação fisiológica realizada simultaneamente pode contribuir com a análise dos processos envolvidos na liberação e biodisponibilidade do fármaco *in vivo*.

Assim, demonstrou-se que os fármacos empregados no estudo são capazes de modular a motilidade do TGI, de forma mais significativa naquilo que concerne o trânsito gastrointestinal. Na situação proposta, a motilidade colônica sofreu alterações menos significativas e não promoveu nenhuma alteração no processo de desintegração do comprimido magnético. Contudo, em virtude das modificações no trânsito gastrointestinal, é correto associar que a motilidade influenciou o T_{lag} do fármaco, alterando sua biodisponibilidade, o que pode influenciar o planejamento terapêutico.

Ao associar os registros magnéticos e farmacocinéticos, constatou-se uma correspondência entre os tempos de chegada ao colón e de liberação do fármaco marcador. Demonstrou-se que o método BAC garante não apenas a caracterização fisiológica do trânsito e da motilidade gastrointestinal, mas também a observação direta do local da liberação.

Esse estudo apresenta, portanto, uma nova proposta denominada Farmacomagnetografia: uma associação entre a BAC e farmacocinética com o objetivo de mensurar simultaneamente parâmetros do TGI, localização da forma farmacêutica e biodisponibilidade. Separadamente, as técnicas não garantem precisão alvo-específica, no

entanto, associadas podemos observar claramente se o fármaco é apresentado no local desejado (figura 4.13).

Concluindo, com estes resultados convalidados para o cólon, a farmacomagnetografia pode ser aplicada a diversos estudos futuros, possibilitando determinar a integridade de uma forma farmacêutica sólida, eficiência de revestimento e liberação alvo-específica do fármaco, sendo uma nova ferramenta disponível para utilização no controle da qualidade de formas farmacêuticas sólidas, além de contribuir para determinação de possíveis efeitos de outros fármacos sobre a biodisponibilidade e absorção.

Referências

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.

ANDRÄ, W., DANAN, H., KIRMSSE, W., KRAMER, H.H., SAUPE, P., SCHMIEG, R., BELLEMANN, M.E. A novel method for real-time magnetic marker monitoring in the gastrointestinal tract. *Phys. Med. Biol.*, v.45, p.3081-3093, 2000.

AZPIROZ, F., MALAGELADA, J.R. Pressure activity patterns in the canine proximal stomach: response to distension. *Am. J. Physiol.*, v.247, p.G265–272, 1984.

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.

BARONE, J.A. Domperidone: a peripherally acting dopamine 2-receptor antagonist. *Ann. Pharmacother.*, v.33, p.429–40, 1999.

BELIKOV, V.G., KUREGYAN, A.G. Generation and medicobiological application of magnetic fields and carriers (review). *Pharm. Chem. J.*, v.35, p.88-95, 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. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.86, p.77-83, 2009.

BRAUN, M., CAWELLO, W., BOEKENS, H., HORSTMANN, R. Influence of domperidone on pharmacokinetics, safety and tolerability of the dopamine agonist rotigotine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v.67, p.209–215, 2009.

CAMILLERI, M. Integrated upper gastrointestinal response to food intake. *Gastroenterology*, v.131, p.640-658, 2006.

CHAMPION, M.C. Domperidone. *Gen. Pharmac.*, v.19, p.499-505, 1988.

CHAMPION, M.C., HARTNETT, M., YEN, M. Domperidone, a new dopamine antagonist. *Can. Med. Assoc. J.*, v.135, p.457-461, 1986.

CHAWLA, G., GUPTA, P., KORADIA, V., BANSAL, A.K. A means to address regional variability in intestinal drug absorption. *Pharm. Technol.*, v.27, p.50-68, 2003.

CHOURASIA, MK; JAIN, SK. Pharmaceutical approaches to colon target drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, v.6, p.33-66, 2003.

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, 2006a.

CORÁ, L.A., ROMEIRO, F.G., PAIXÃO, F.C., AMÉRICO, M.F., OLIVEIRA, R.B., BAFFA, O., MIRANDA, J.R.A. Enteric coated magnetic HPMC capsules evaluated in human gastrointestinal tract by AC Biosusceptometry. *Pharm. Res.*, v.23, p.1809-1816, 2006b.

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, 2010a.

CORÁ, L.A., AMÉRICO, M.F., OLIVEIRA, R.B., SERRA, C.H.R., BAFFA, O., EVANGELISTA, R.C., OLIVEIRA, G.F., MIRANDA, J.R.A. Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research. *Pharm. Res.* (2010), no prelo. DOI 10.1007/s11095-010-0285-5

COUPE, A.J., DAVIS, S.S., WILDING, I.R. Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharm. Res.*, v.8, p.360-364, 1991.

DAVIS, S.S., HARDY, J.G., FARA, J.W. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut.*, v.27, p.886-892, 1986.

DAVIS, S.S. Formulation strategies for absorption windows. *Drug Discov. Today.*, v.10, p. 249–257, 2005.

DIGENIS, G.A., SANDEFER, E.P., PAGE, R.C., DOLL, W.J. Gamma scintigraphy: an evolving technology in pharmaceutical formulation development: part 1. *Pharm. Sci. Tech. Today*, v.1, p.100-107, 1998a.

DIGENIS, G.A., SANDEFER, E.P., PAGE, R.C., DOLL, W.J. Gamma scintigraphy: an evolving technology in pharmaceutical formulation development: part 2. *Pharm. Sci. Tech. Today*, v.1, p.160-165, 1998b.

DITTMER, M., DURRANI, M., LEHMANN, K. Acrylic polymers: a review of pharmaceutical applications. *STP Pharm. Sci.*, v.7, p.406-437, 1997.

DRESSMAN, J.B., BASS, P., RITSCHER, W.A., FRIEND, D.R., RUBINSTEIN, A., ZIV, E. Gastrointestinal parameters that influence oral medications. *J. Pharm. Sci.*, v.82, p. 857-872, 1993.

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. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.59, p.591–602, 2007.

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.

FELDMAN, M., SCHILLER, L.R. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, v.98, p.378–384, 1983.

FRANZESE, A., BORRELLI, O., CORRADO, G., REA, P., DI NARDO, G., GRANDINETTI, A.L., DITO, L., CUCCHIARA, S. Domperidone is more effective than cisapride in children with diabetic gastroparesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.16, p.951–957, 2002.

FREIRE, A.C., PODCZECK, F., SOUSA, J., VEIGA, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I- O cólon humano como local de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.42, p.319-335, 2006.

GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.

HELLSTRÖM, P.M., GRYBÄCK, P., JACOBSSON, H. The physiology of gastric emptying. *Best Pract. Res. Clin. Anaesth.*, v.20, p.397-407, 2006.

HODGES, L.A., CONNOLLY, S.M., BAND, J., O'MAHONY, B., UGURLU, T., TURKOGLU, M, WILSON, C.G., STEVENS, H.N.E. Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin-HPMC tablets in healthy volunteers. *Int. J. Pharm.*, v.370, p.144-150, 2009.

JAIN, S., DANI, P., SHARMA, R.K. Pharmacoscintigraphy: a blazing trail for the evaluation of new drugs and delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v.26, p.373-426, 2009.

KARALIS, V., MACHERAS, P., PEER, A., SHAH, V. Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. *Pharm. Res.*, v. 25, p.1956-1962, 2008.

KIMURA, T., HIGAKI, K. Gastrointestinal transit and drug absorption. *Biol. Pharm. Bull.*, v.25, p.149-164, 2002.

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.

KUO, B., McCALLUM, R.W., KOCH, K.L., SITRIN, M.D., WO, J.M., CHEY, W.D., HASLER, W.L., LACKNER, J.M., KATZ, L.A., SEMLER, J.R., WILDING, G.E., PARKMAN, H.P. Comparison of gastric emptying of a nondigestible capsule to a radio-labelled meal in healthy and gastroparetic subjects. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 27, p.186-196, 2008.

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.

McCONNELL, E.L, SHORT, M.D., BASIT, A.W. An in vivo comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *J. Control. Release*, v.130, p.154-160, 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., SOUSA, 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., 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.

MOCHIKI, E., SUZUKI, H., TAKENOSHITA, S., NAGAMACHI, Y., KUWANO, H., MIZUMOTO, A., ITOH, Z. Mechanism of inhibitory effect of glucagon on gastrointestinal motility and cause of side effects of glucagons. *J. Gastroenterol.*, v.33, p.835-841, 1998.

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.

MÜLLER-LISSNER, S., TYTGAT, G.N., PAULO, L.G., QUIGLEY, E.M.M, BUBECK, J., PEIL, H., SCHAEFER, E. Placebo- and paracetamol-controlled study on the efficacy and tolerability of hyoscine butylbromide in the treatment of patients with recurrent crampy abdominal pain. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.23, p.1741–1748, 2006.

PATEL, M., SHAH, T., AMIN, A. Therapeutic opportunities in colon-specific drug-delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, v. 24, p.147-202, 2007.

QUIGLEY, E.M.M. Gastric and small intestinal motility in health and disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, v.25, p.113-145, 1996.

RAMNARACE, R; DALTON, H.R. Side Effects of Drugs. *Gastrointestinal drugs. Annual 32*, cap.36. p.665-674, 2010. (DOI: 10.1016/S0378-6080(10)32036-8)

RAO, S.S.C., SINGH, S., MUDIPALLI, R. Day-to-day reproducibility of prolonged ambulatory colonic manometry in healthy subjects. *Neurogastroenterol. Motil.*, v.22, p. 640–648, 2010.

REDDYMASU, S.C., SOYKAN, I., McCALLUM, R.W. Domperidone: Review of pharmacology and clinical applications in gastroenterology. *Am. J. Gastroenterol.*, v.2, p.2036–2045, 2007.

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, 2010, acessado em 20/09/2010. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1337

RICHARDS, W., PARISH, K., WILLIAMS, L.F. The usefulness of small-bowel manometry in the diagnosis of gastrointestinal motility disorders. *Am. Surgeon.*, v.56 p.238–44, 1990.

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.

ROUGE, N., BURI, P., DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, v.136, p.117-139, 1996.

SASTRY, S.V., NYSHADHAM, J.R., FIX, J.A. Recent technological advances in oral drug delivery. *Pharm. Sci. Tech. Today*, v.3, p.138-145, 2000.

SHAREEF, M.A., KHAR, R.K., AHUJA, A., AHMAD, F.J., RAGHAVA, S. Colonic Drug Delivery: an updated review. *AAPS Pharm. Sci.*, v.5, p.1-25, 2003.

SHARGEL, L., YU, A.B.C., PONG, S.W. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. New York: MacGraw-Hill; 2005.

STREUBEL, A., SIEPMANN, J., BODMEIER, R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.6, p.501-508, 2006.

TONINI, M. Recent advances in the pharmacology of gastrointestinal prokinetics. *Pharmacol. Res.*, v.33, p.217-226, 1996.

TONINI, M., CIPOLLINA, L., POLUZZI, E., CREMA, F., CORAZZA, G.R., De PONTI, F. Review article: clinical implications of enteric and central D2 receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.19, p.379–390, 2004.

TYTGAT, G.N. Hyoscine butylbromide—a review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain. *Drugs*, v.67, p.1343–1357, 2007.

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., FRIEDRICH, C., WEDEMEYER, R.S., SCHMIDTMANN, M., KOSCH, O., KINZIG, M., TRAHMS, L., SÖRGEL, F., SIEGMUND, W., HORKOVICS--KOVATS, S., SSCWARZ, F., RANEBURGER, J., MÖNNIKES, H. Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.70, p.641-648, 2008.

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.

WILDING, I.R., COUPE, A.J., DAVIS, S.S. The role of γ -scintigraphy in oral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.46, p.103-124, 2001.

WILLIAMSON, S.J., KAUFMAN, L. Biomagnetism. *J. Magn. Magn. Mater.*, v.22, p. 129-201, 1981.

WILSON, C.G. Gastrointestinal transit and drug absorption. In: DRESSMAN, J.B., LENNERNÄS, H., editors. *Oral Drug Absorption, Prediction and Assessment*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 1-10.

YOSHIKAWA, I., YAMASAKI M., TAGUCHI M., KANDA, K., TASHIRO, M., KUME, K., TABARU, A., OTSUKI, M. Comparison of glucagons and scopolamine butylbromide as premedications for colonoscopy in unsedated patients *Dis. Colon Rectum*, v.49, p.1393–1398, 2006.

Anexo

**Pharmacomagnetography: *in vivo* study of enteric
tablets disintegration**

European Journal of Pharmaceutics
and Biopharmaceutics

Pharmacomagnetography: *in vivo* study of enteric tablets disintegration.

ABSTRACT

Enteric coated tablets, nowadays, are important approaches for colonic drug delivery. Drug absorption from the gastrointestinal tract can be regarded as a part of a serial process which includes the drug release from the disintegration of the dosage form. Experimental determination of tablet disintegration uses a standard *in vitro* apparatus, however it does not describe satisfactorily the *in vivo* disintegration properties. AC Biosusceptometry (ACB) has become an alternative method for pharmaceutical research as a tool for *in vivo* studies. The aim of this study was to employ the ACB to investigate the behavior of magnetic enteric coated tablets as well as the *in vivo* determination of their drug release in combination with pharmacokinetic outcome. The study was carried out in eight healthy volunteers (age: 20-40; 3 male, 5 female). Tablets were obtained by direct compression of 1 g ferrite (magnetic marker), 100 mg of diclofenac sodium (model drug), excipients and coated with a pH-responsive polymer. Enteric coated tablets were tested under requirements of pharmacopeia. Drug levels were measured in the plasma, and the transit of the enteric coated tablets was followed by AC Biosusceptometry. Measurements consisted of magnetic monitoring of the abdominal surface to determine the gastric residence time (GRT), the small intestinal transit time (SITT), the colonic arrival time (CAT) and the disintegration time (DT). Each monitoring was recorded at 15 min intervals up to 8 h. From this monitoring, it was obtained magnetic field distribution to generate the magnetic images. Afterwards digital image processing, magnetic images were segmented to calculate the pixels' area. Blood samples were collected simultaneously at pre-defined time intervals and analyzed in HPLC. Gastric activity and colonic activity contraction were analyzed and the mean frequencies obtained

were 2.98 ± 0.17 cpm (cycles per minute) and 5.25 ± 0.55 cpm, respectively. Gastrointestinal transit parameters were also analyzed and the values obtained for GRT were 90.00 ± 34.02 min, CAT 215.63 ± 41.61 min, SITT 125.63 ± 38.40 min. DT for enteric coated tablets were 28.25 ± 11.35 min. The tablets had variable in vivo performance (T_{max} ranging from 266.5 ± 52.42 min; AUC $436,513 \pm 312,238$ ng.h.ml⁻¹). The tablets were colon-specific since drug was detected in the blood only when the dosage forms had reached the region. From the results presented, we conclude that ACB associated with pharmacokinetic data, a method termed pharmacomagnetography, was reliable into provide valuable data concerning drug release processes from magnetic enteric coated tablets.

1. INTRODUCTION

Gastrointestinal (GI) tract is an important site for drug absorption. Drug absorption from the GI tract can be regarded as a part of a serial process which includes the drug release from the disintegration of the dosage form, its dissolution on the gastrointestinal fluids, its solubility as well as the physicochemical properties and its effective permeability coefficient [1]. Product bioavailability can be markedly influenced by GI environment, whose regional differences must be fully investigated to provide more reliable dosage form design as well as more predictable in vitro-in vivo correlations (2-4). Concerning these physiological conditions, it may be supposed that in vivo behavior of solid dosage forms cannot simply be predicted from commonly used in vitro testing methods. This is particularly important for pharmacokinetics of a drug which is influenced by interplay of parameters such as gastrointestinal physiology, drug solubility, dissolution, permeability, distribution and elimination (5,6). Even before drug absorption, the release mechanisms should be considered since it reflects the dynamics of rate and extent of drug absorption.

Colonic drug delivery has gained increase importance for the delivery of drugs for treatment of local diseases as well as for systemic delivery of proteins and therapeutic peptides (7). Specific drug delivery systems to the colonic region should prevent drug release in the stomach and small intestine (8).

In terms of drug delivery research, there are still gaps in our knowledge of GI physiology to move forward effectively in development of more reliable therapeutic systems [9-12]. Non-invasive techniques are responding to the demands to improve our fundamental understanding towards providing information on drug delivery and its interplays at specific organs. Biomagnetic techniques are employed nowadays to investigate the performance of solid dosage forms in human gastrointestinal tract [13-15]. Such techniques have a number of advantages over classical methods towards elucidating how physiological variables can influence the drug release processes by employing sensitive magnetic sensors.

AC Biosusceptometry (ACB) embraces a class of magnetic sensors that employs induction coils to measure biomagnetic fields resulting from ferromagnetic sources in response to an applied magnetic field [16-18]. Currently, this method has been recognised as an alternative tool for pharmaceutical research due to its ability into evaluating conventional solid dosage forms and modified release systems *in vitro* or under influence of GI physiological parameters [19-23]. The aim of this study was to employ the ACB to investigate the behaviour of magnetic enteric coated tablets as well as the *in vivo* determination of their drug release in combination with pharmacokinetic outcome.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. ACB sensors

ACB sensors are composed of pairs of induction coils separated by a fixed baseline (Fig. 1). Each pair of coils consists of excitation (outer) and detection (inner) coils in a first-order gradiometric configuration which provides good signal-to-noise properties. Basically, the excitation coil induces equal magnetic flux in the detection coils, hence when the ferromagnetic sample is nearest to the sensor an imbalance in the voltage occurs, due to the changes in the differential flux between the detection coils. Therefore, the ACB sensor can measure the magnetic signals generated by the magnetic flux variation between these coils.

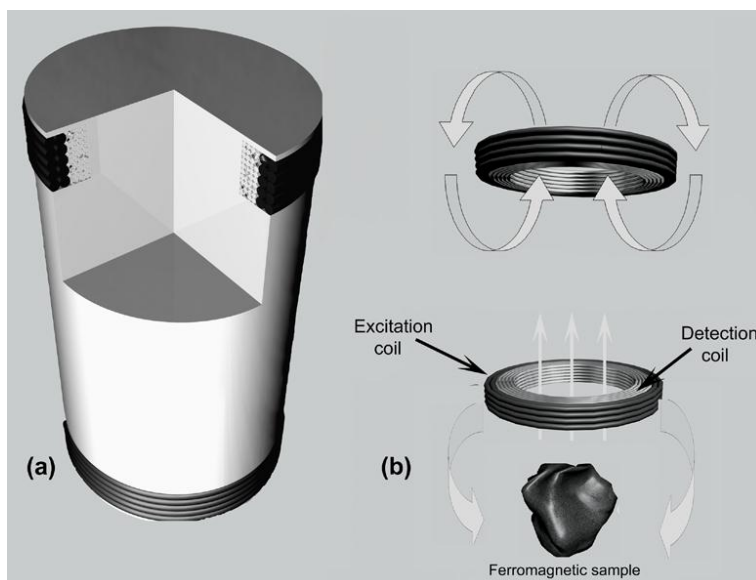


Fig. 1: Representation of ACB sensor. (A) ACB single-sensor. (B) ACB diagram in coaxial arrangement.

The measurement device also includes seven ACB sensors and a data acquisition system, recording the magnetic field distribution at multiple locations with reasonable temporal resolution (Fig. 2). A more detailed description of the physical principles of ACB sensors can be found in recent publications (24-26).

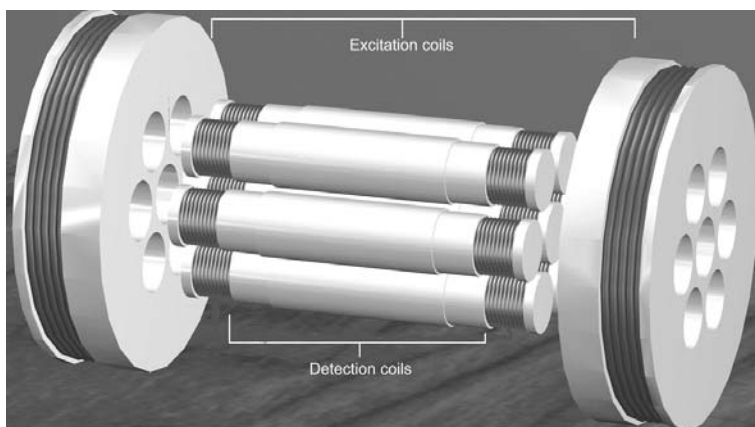


Fig. 2: ACB multi-sensor system showing the individual arrangement of excitation coils and seven pairs of detection coils.

2.2. Magnetic tablets

Magnetic tablets (12 mm) were obtained by direct compression on a single punch tablet machine (Marconi, MA-098/1CPE, Brazil) and had the following composition: 68.97% ferrite (1,000 mg), 20.69% microcrystalline cellulose (300 mg), 2.76% croscarmellose sodium (40 mg), 0.34% magnesium stearate (5 mg), 0.34% Aerosil® (5 mg), 6.9% diclofenac sodium (100 mg). Sample tablets were submitted to hardness and friability testing.

A sub-coat was applied using Acryl-EZE® to a 0.5% weight gain to ensure a reproducible substrate for tablets. Enteric coating was applied using Eudragit® S100 (Rohm, Pharma Polymers, German) to a 3% weight gain and Acryl-EZE® to a 6% weight gain. These procedures were performed in the coating machine under the following conditions: spray air pressure, 1.50 mg/cm²; inlet temperature, 40–45°C; rotating speed, 20 rpm. The enteric-soluble coating dispersion was applied to each 72,5 g of tablets.

The dissolution procedure (paddle method, 50 rpm, 900 mL) was used to evaluate the release profile of diclofenac sodium (DIC) from the enteric coated tablet. One tablet was

placed in a vessel. Simulated gastric fluid (USP dissolution medium of pH 1.2, without pepsin) and simulated intestinal fluid (USP dissolution medium of pH 6.8, without pancreatin) were used as dissolution media. Sampling of dissolution media was carried out every 10 min. Drug concentration in the dissolution media was analyzed by UV spectrophotometer, wavelength adjusted at 280 nm.

2.3. Subjects and study protocol

Eight healthy volunteers (3 male, 5 female; age, 20-35 years; weight, 50-80 kg) participated in the study. The study was approved by the Ethical Committee of Medical School (OF.195/2007) - Univ Estadual Paulista - UNESP, and trials were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964) and its revisions. Each subject provided written informed consent to participate in the study.

Magnetic tablets were administered to the volunteers who fasted for at least 8 h before dosing. Venous blood samples (4 ml) were collected before dosing and every 15 min up to 8 h. Blood was centrifuged at 3000g for 10 min. The serum was transferred into polypropylene tubes and stored below 20 °C until quantitative drug assay.

Intake of food and beverages was standardized during in-house confinement. Standardized meals were served at defined intervals after administration of the study medication (Fig. 3).

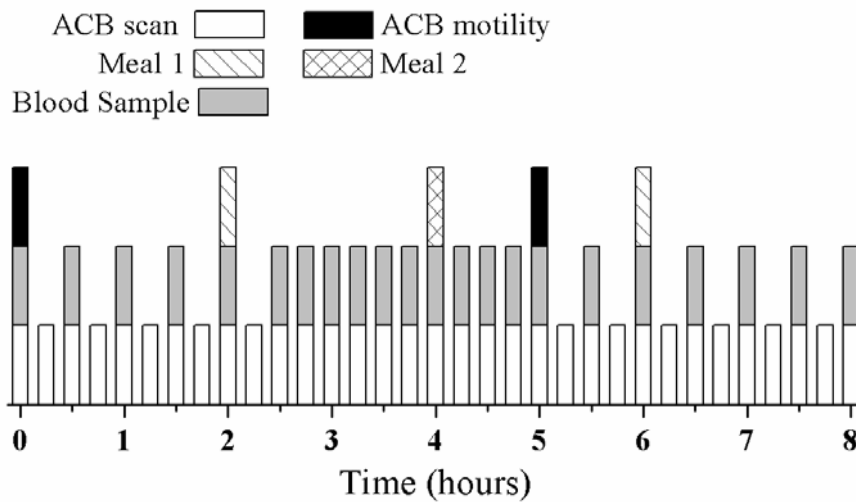


Fig. 3: Representative diagram of study protocol.

2.4. Data acquisition

Subjects were requested to remain in upright position. Magnetic (multisensor ACB) and electrogastrography (Biopac®) systems were positioned on the abdominal surface with lower tip of the sternum and the umbilicus as anatomic references (Fig. 4A). Magnetic and electrical signals were acquired for at least 15 min. A square point matrix (5×5) was drawn around the and colonic (McBurney's point and iliac right crest as anatomical references) regions (Fig. 4B). The single sensor ACB was employed towards monitoring the abdominal surface in order to determine the gastric residence time (GRT), the small intestinal transit time (SITT) and the colonic arrival time (CAT). Each magnetic monitoring had 120 s duration and was recorded at 15 min intervals over 8 h. It allowed generating magnetic field maps to obtain the magnetic images. When locating the tablet in colonic region, the multisensor ACB was positioned and the signals were acquired for at least 15 min.

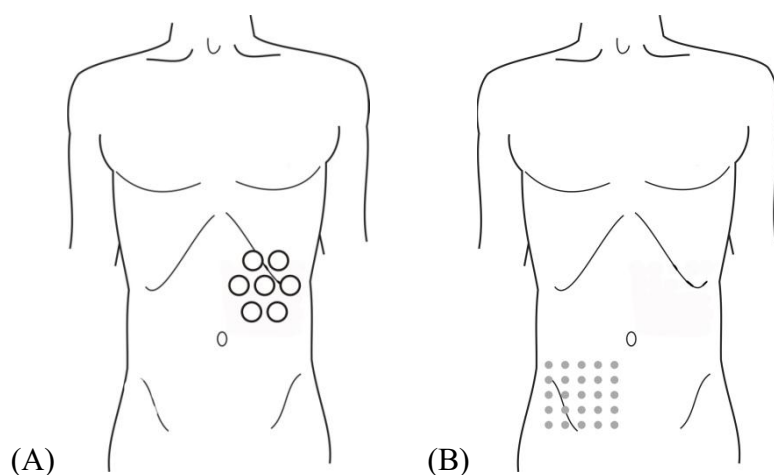


Fig. 4: (A) ACB multi-sensor positioning in gastric area. (B) Draw of scan matrix (5X5) in ileo-caecum region.

2.5. Magnetic data analysis

Acquisition of the magnetic signals was carried out through lock-in amplifiers (Stanford Research Systems, Inc., USA), at sample rate of 10 Hz/channel and the signal processing was performed using MatLab® (Mathworks, Inc., Natick, MA, USA). Gastric and colonic motility signals were analyzed employing bi-directional Butterworth low-pass filter with cutoff frequency between 1 cpm and 6 cpm.

Gastric residence time (GRT) was defined as the time interval between the ingestion of magnetic tablet and the first time point when the tablet was observed in the small intestine. Colonic arrival time (CAT) was the time between the gastric emptying and the first time point when the tablet was localized in the colon. Small intestinal transit time (SITT) was quantified as the difference between CAT and GRT.

Magnetic images were obtained and processed as reported by previous study performed by our group (27). Briefly, square point matrices (25 points) which were derivative

of the magnetic field maps were initially interpolated and processed to obtain the degraded images (256×256). Thereafter, the images were submitted to the digital image processing for background subtraction, brightness and contrast adjustments and to be segmented. The segmentation was the procedure used to find edges in the magnetic images and to estimate the area of all pixels in the delimited area. The sum of the internal pixels corresponds to the magnetic image area employed in the quantifications described below.

Disintegration of enteric coated magnetic tablets was characterized by the transition between a magnetic marker – MM (non-disintegrated tablet) to a magnetic tracer – MT (spreading of the magnetic material). Hence, when the tablet was ingested by the volunteer until its location in the colonic region, the magnetic signals were detected with high and located intensity values (MM). As soon as the disintegration occurred, the magnetic signals could be detected as a distribution on the intensity values (MT). The disintegration time (DT) was the time needed to calculate 50% increase variation of pixels in the imaging area.

2.6. Serum samples analysis

Diclofenac in serum was quantified after liquid extraction using a HPLC method with UV-detection at 280 nm as proposed by El-Sayed and cols, 1988 (28). Briefly, 500 μ l of serum sample and 2 ml of acetonitrile was mixed and the supernatant was transferred to 15 ml centrifuge tube and evaporated to dryness at 40°C in a water bath in a stream of dry air. Residue was reconstituted in 200 μ l of mobile phase of which 1.7 ml were injected for chromatography analysis. The HPLC system consisted of the quaternary pump system, UV detector, 100 μ l loop size and software UNICORN 5.11, equipped with the analytical column 5 μ m RP-C18 (4.6 X 150 mm, Thermo). The mobile phase consisted of acetonitrile/water, 50:50 % v/v, pH=3.3.

2.7. Pharmacokinetic evaluation

Pharmacokinetic and statistical evaluation was performed with Origin® (Origin Lab Corp., Northampton, USA). Serum concentrations were used to determine the following pharmacokinetic parameters: maximum serum concentration (C_{max}), time of maximum serum concentration (T_{max}) and area under curve (AUC). C_{max} and T_{max} were observed directly from the serum concentration-time profiles and C_{max} was calculated by application of the linear trapezoidal rule.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Enteric coated tablets were tested under requirements of pharmacopeia. Breaking force were 20.5 kp and 0.1% friability. Disintegration test showed that the tablets remained intact for 2 hours in acid solution and had disintegrated completely into 40 minutes in buffer solution. The dissolution profile of the enteric coated tablet obtained using USP apparatus 2 (paddle) is shown in Fig. 5. Due to very poor solubility of diclofenac in the acidic media, the dissolution is pH-dependent with minimal sodium diclofenac dissolved in 0.1 N hydrochloric acid, however, at pH 6.8, the enteric coated tablets provided regular dissolution profile with approximately 65% drug dissolved after 40 min. In the simulated gastric fluid was lower than 1% after 2 h test.

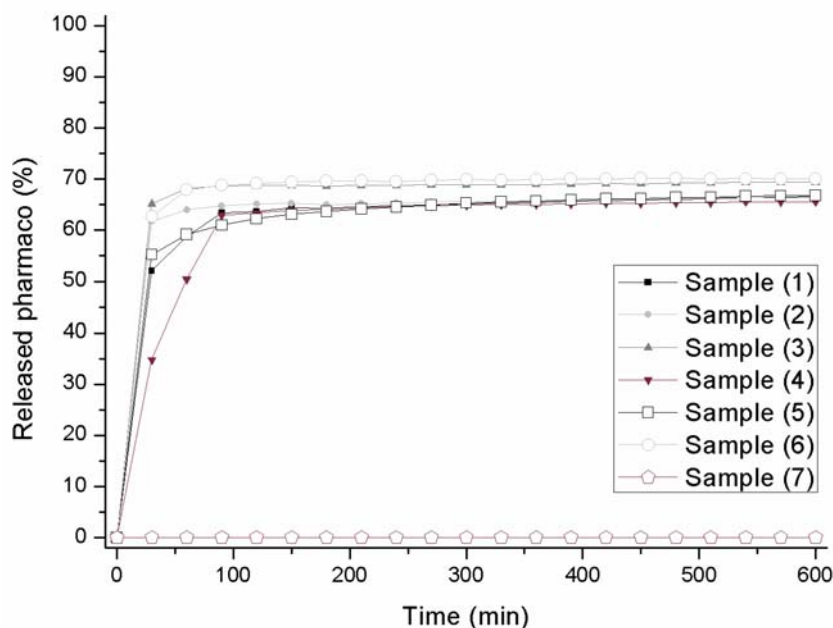


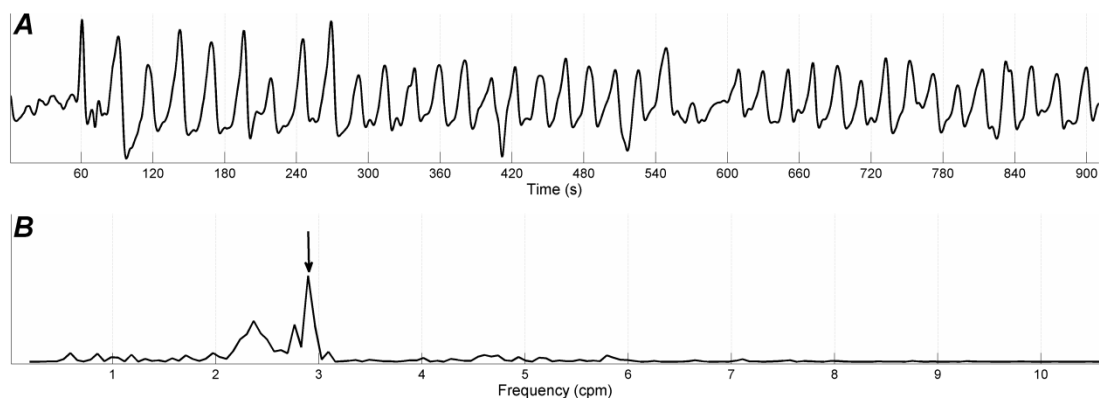
Fig. 5: Dissolution test perform of enteric simulation.

Concerning the retention time in the stomach and the transit through the small intestine, it is interesting that the start of drug release could be controlled by pH-dependent polymer dissolution (29). An essential prerequisite for a delivery system for colon targeting it is to prevent the drug release until the dosage form reaches the colon. Hence, the polymer used in this study has been sufficiently able into assure the magnetic material release solely after arrival in the colon since none magnetic material was released during the dissolution test performed at simulated gastric fluid.

Regarding the importance of physiological parameters on the fate of dosage forms in humans, it is essential the development of noninvasive methods towards characterizing such delivery systems. Methods such as ACB sensors have gained increased importance to evaluate pharmaceutical dosage forms in human GI tract (26).

After oral administration of tablets, Gastric Activity Contraction (GAC) was recorded by employing multisensor ACB and EGG systems, simultaneously. Fig. 6 displays GAC and EGG profiles and the respective Fast Fourier Transform (FFT). The gastric activity contraction frequencies obtained by employing multisensor ACB were 2.98 ± 0.17 cpm (mean \pm SD) and using EGG were 3.00 ± 0.13 cpm (mean \pm SD).

(I)



(II)

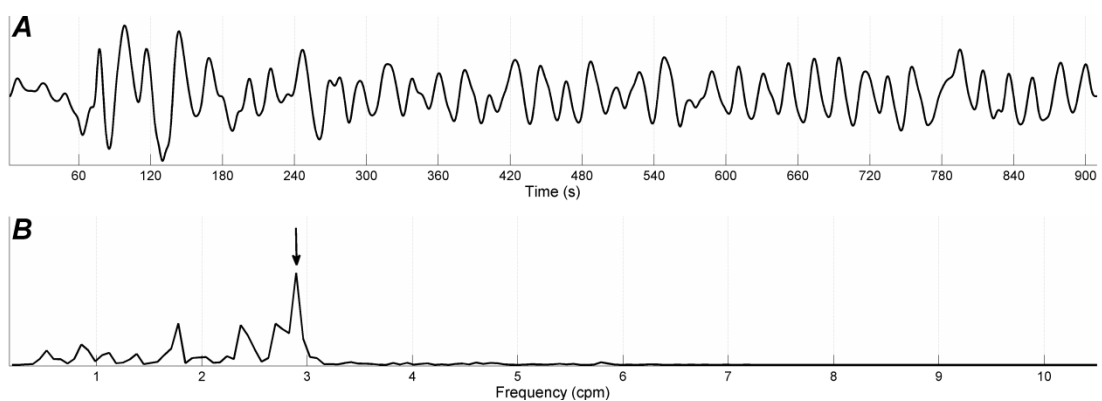


Fig. 6: Perform of gastric activity contraction (GAC). Panel (I), (A) GAC performed by ACB and (B) respective FFT. Arrow indicates dominant frequency of GAC. Panel (II), (A) elettrogastrogram performed by EGG100 Biopac and (B) respective FFT. Arrow indicates dominant frequency of elettrogastrogram.

For pharmaceutical purposes, the transit of a dosage form through the GI tract determines how long a compound remains in contact with its absorptive site. The bioavailability of a drug can be affected by factors that change GI transit parameters. The gastrointestinal transit times of the coated tablets are summarized in Table 1. GRT values were 90.00 ± 34.02 min, CAT 215.63 ± 41.61 min and SITT 125.63 ± 38.40 min (mean \pm SD). In the fasted state, solid dosage forms are typically retained in the stomach until they are emptied by the phase III contractions of the migrating myoelectric complex (MMC) (30,31).

Table 1: Gastrointestinal transit parameters and pharmacokinetics analysis. GRT (Gastric Residence Time), CAT (Colon Arrival Time), SITT (Small Intestine Transit Time), DT (Disintegration Time), Tmax (Time of maximum serum concentration) and Cmax (maximum serum Concentration).

Volunteer	GRT	CAT	SITT	DT	T_{max}	C_{max}	AUC
<i>Units</i>	<i>Minutes</i>					<i>ng/ml</i>	<i>ng.h.ml⁻¹</i>
1	75	150	75	45	300	8.270	484,019
2	120	210	90	41	360	2.181	316,311
3	120	210	90	18	210	586	74,379
4	90	225	135	38	225	4.753	270,538
5	135	300	165	23	315	14.507	918,479
6	90	210	120	23	240	502	55,611
7	45	225	180	15	240	427	637,350
8	45	195	150	23	240	7.962	735,419
Mean	90.00	215.63	125.63	28.25	266.25	3.273	436,513
SD	34.02	41.61	38.4	11.35	52.42	3.304	312,238

As reported by others, although small intestinal transit time of pharmaceutical dosage forms in humans seems to be relatively constant and appears to be independent of both the type of dosage form and prandial state, it can be observed a considerable intra-subjects variability (30-32). On the other hand, colon arrival may be notably influenced by the gastric retention of the dosage form.

Colonic activity contraction (CAC) could be recorded when the enteric coated tablet have reached that region. By employing the multisensor ACB, it was possible to characterize a dominant frequency around 5.25 ± 0.55 cpm (mean \pm SD), as shown in Fig. 7.

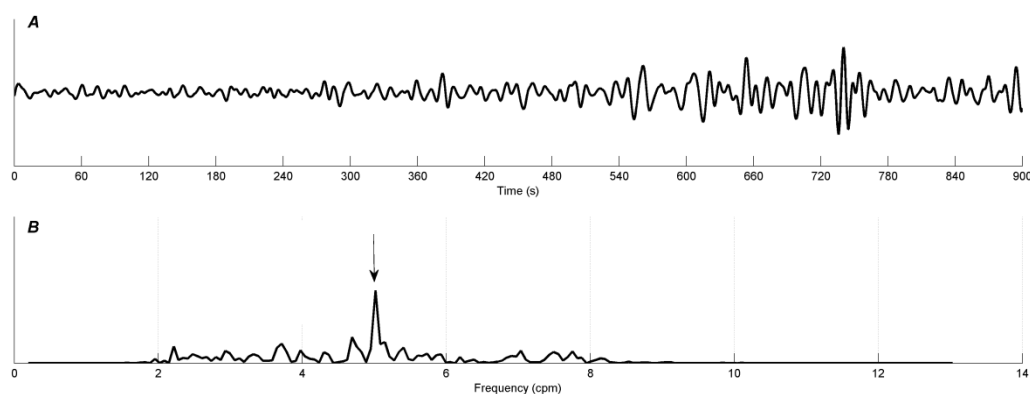


Fig. 7: (A) Colon activity contraction profile performed by ACB and (B) respective FFT. Arrow indicates dominant frequency of contraction.

Fig. 8 is the representative magnetic images of the enteric coated tablet and was taken from different time intervals, illustrating key stages of the gastrointestinal transit for a fasted subject and the disintegration of the dosage form in the colonic region.

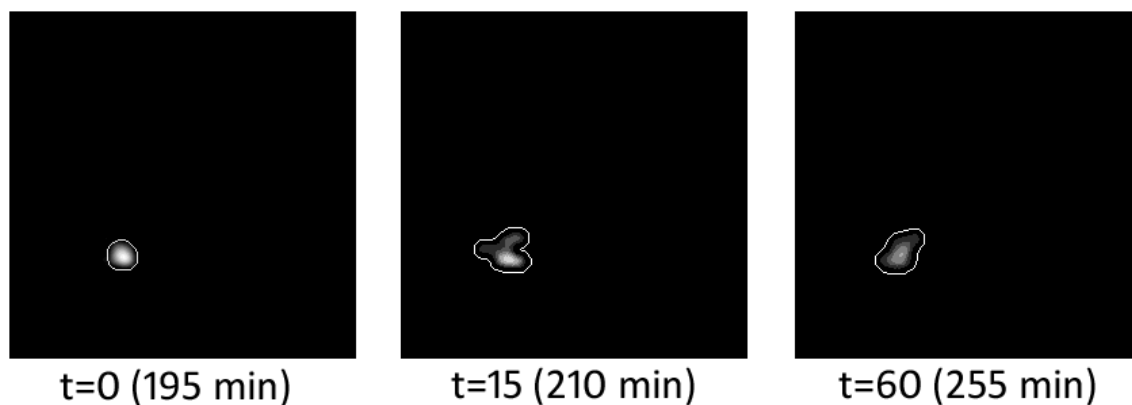


Fig. 8: Magnetic images of tablets at different time intervals. (A) Entire tablet in colon region. (B) Disintegration in process. (C) Complete disintegration.

Imaging techniques could provide more reliable *in vivo* data since they are able to demonstrate how solid dosage forms behave in human GI tract. These techniques are especially interesting into demonstrate whether the dosage form is delivering the drug to the target region at the expected time.

Thereby, the ability to visualize the delivery process in a noninvasive manner in association with pharmacokinetic data has becoming the ACB an innovative method to study a variety of pharmaceutical processes. Fig. 9 shows a typical pharmacomagnetography data obtained for a representative subject. In our study, it was possible to observe that none drug release had occurred for at least 2 hours, since the dosage form remained intact in the upper GI tract.

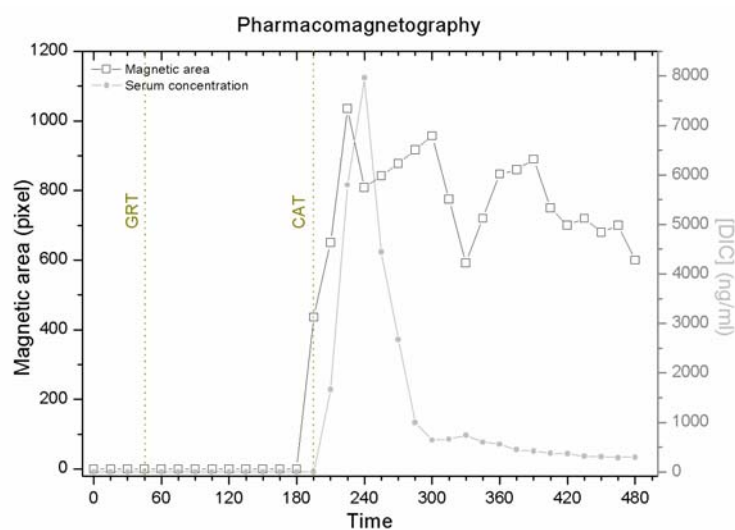


Fig. 9: Pharmacomagnetography of magnetic tablets of sodium diclofenac. Solid line shows variation of magnetic area in ileo-caecum region. Arrows indicate GRT at 45 minutes and CAT at 195 minutes. Dot line shows pharmacokinetic analysis.

As sodium diclofenac is often administered as enteric coated tablets, the individual plasma profile is usually characterized by one single peak concentration (33,34). However, the time of appearance of the peak is variable and can be attributed to high variability of GI transit parameters until disintegration of enteric coated tablets (35).

Tablet disintegration occurred, on average, 3.5 h post-dose in the colonic region. The principle of successful colonic drug delivery with enteric coated tablets is that they should disintegrate when their coatings dissolve after exposure to high pH at ileocolonic region. After disintegration, mean maximum serum concentration (C_{max}) and time values (T_{max}) were determined (Table 1).

Another interesting finding in our study was the irregular absorption profiles observed in some subjects. It could be attributed to a failure in the coating process, which resulted in poor specificity of coated product. ACB associated with pharmacokinetic data was able to

identify failures in the integrity of coating layer, since early serum concentration peaks have been observed.

4. CONCLUSION

From the results presented, we conclude that ACB associated with pharmacokinetic data, a method termed pharmacomagnetography, was reliable into provide valuable data concerning drug release processes from magnetic enteric coated tablets. Pharmaceutical development is a field that requires further research towards providing new insights in the development of more effective drug delivery systems, especially colonic delivery systems. Hence, better understanding of physiological parameters and their interactions with such delivery systems could provide valuable information on bioavailability of the drugs administered. It is an important feature of pharmacomagnetography, since it is possible to evaluate drug delivery processes and gastrointestinal motility parameters simultaneously.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Brazilian agencies FAPESP, CNPq and CAPES for financial support and Colorcon Inc. to provide samples and technical support.

REFERENCES

- [1] M.N. Martinez and G.L. Amidon, A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals, *J. Clin. Pharmacol.* 42 (2002), pp. 620–643
- [2] J.B. Dressman, P. Bass, W.A. Ritschel, D.R. Friend, A. Rubinstein, E. Ziv, Gastrointestinal parameters that influence oral medications, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 857–872.
- [3] W. Weitschies, C. Friedrich, R.S. Wedemeyer, M. Schmidtman, O. Kosch, M. Kinzig, L. Trahms, F. Sörgel, W. Siegmund, S. Horkovics-Kovats, F. Schwarz, J. Raneburger, H. Mönnikes. Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70 (2008) 641–648
- [4] L.A. Corá, M.F. Américo, F.G. Romeiro, R.B. Oliveira, J.R.A. Miranda. Pharmaceutical applications of AC Biosusceptometry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74 (2010) 67–77.
- [5] T. Kimura, K. Higaki, Gastrointestinal transit and drug absorption, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 149-164;
- [6] J.B. Dressman, M. Vertzoni, K. Goumas, C. Reppas, Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 591–602.
- [7] M.A. Shareef, R.K. Khar, A. Ahuja, F.J. Ahmad, S. Raghava, Colonic Drug Delivery: an updated review, *AAPS Pharm. Sci.* 5 (2003) 1-25
- [8] M.K. Chourasia, S.K. Jain, Pharmaceutical approaches to colon target drug delivery systems, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6 (2003) 33-66.
- [9] H. Lennernäs, B. Abrahamsson, The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 273–285.
- [10] R. Gandhi, C.L. Kaul, R. Panchagnula, Extrusion and spheronization in the development of oral controlled-release dosage forms, *Pharm. Sci. Technol. Today* 2 (1999) 160–170.
- [11] S.V. Sastry, J.R. Nyshadham, J.A. Fix, Recent technological advances in oral drug delivery, *Pharm. Sci. Tech. Today* 3 (2000) 138–145.

- [12] N.B. Modi, A. Lam, E. Lindemulder, B. Wang, S.K. Gupta, Application of in vitro in vivo correlations (IVIVC) in setting formulation release specifications, *Biopharm. Drug Dispos.* 21 (2000) 321–326.
- [13] L.A. Corá, J.R.A. Miranda, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, Biomagnetic approaches applied to drug delivery studies, in: A.O. Hartmann, L.K. Neumann (Eds.), *Drugs: Approval and Evaluation, Delivery and Control*, Nova Science Publishers Inc., New York, United States of America, 2008, pp. 1–33.
- [14] W. Weitschies, O. Kosch, H. Mönnikes, L. Trahms, Magnetic marker monitoring: an application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1210–1222.
- [15] W. Weitschies, C. Friedrich, R.S. Wedemeyera, M. Schmidtman, O. Kosch, M. Kinzig, L. Trahms, F. Sörgel, W. Siegmund, S. Horkovics-Kovats, F. Schwarz, J. Raneburger, H. Mönnikes, Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 641–648.
- [16] J.R.A. Miranda, O. Baffa, R.B. Oliveira, N.M. Matsuda, An AC Biosusceptometer to study gastric emptying, *Med. Phys.* 19 (1992) 445–448.
- [17] J.R. A Miranda, R.B. Oliveira, P.L. Sousa, F.J.H. Braga, O. Baffa, A novel biomagnetic method to study antral contractions, *Phys. Med. Biol.* 42 (1997) 1791–1799.
- [18] L.A. Corá, F.G. Romeiro, M. Stelzer, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, J.R.A. Miranda, AC Biosusceptometry in the study of drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1223–1241.
- [19] L.A. Corá, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, R. Moraes, F.G. Romeiro, J.R.A. Miranda, Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 413–420.
- [20] L.A. Corá, U. Andreis, F.G. Romeiro, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, J.R.A. Miranda, Magnetic images of the disintegration process of tablets in the human stomach by AC Biosusceptometry, *Phys. Med. Biol.* 50 (2005) 5523–5534.
- [21] L.A. Corá, F.G. Romeiro, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, M. Stelzer, J.R.A. Miranda, Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by AC Biosusceptometry, *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 1–8.

- [22] L.A. Corá, F.G. Romeiro, F.C. Paixão, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. BAFFA, J.R.A. Miranda, Enteric coated magnetic HPMC capsules evaluated in human gastrointestinal tract by AC Biosusceptometry, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1809–1816.
- [23] L.A. Corá, P.R. Fonseca, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, J.R.A. Miranda, Influence of compression forces on tablets disintegration by AC Biosusceptometry, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 372–379.
- [24] O. Baffa, R.B. Oliveira, J.R.A. Miranda, L.E.A. Troncon, Analysis and development of an AC Biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements, *Med. Biol. Eng. Comput.* 33 (1995) 353-357;
- [25] L.A. Corá, F.G. Romeiro, M. Stelzer, M.F. Américo, R.B. Oliveira, O. Baffa, J.R.A. Miranda, AC biosusceptometry in the study of drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1223-1241;
- [26] L.A. Corá, M.F. Américo; F.G. Romeiro, R.B. Oliveira, J.R.A. Miranda, Pharmaceutical applications of AC Biosusceptometry, *Eur. J. Pharm., Biopharm.*, 74 (2010) 67-77
- [27] Corá, L.A; Andreis, U; Romeiro, F.G; Américo, M.F; Oliveira, R.B; Baffa, O. and 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, 2005
- [28] Y.M. El-Sayed, M.E. Abdel-Hameed, M.S. Suleiman, N.M. Najib. 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.* 1988 Oct;40(10):727-9
- [29] I.R. Wilding, S.S. Davis, D.T. O'Hagan, Optimizing gastrointestinal delivery of drugs, *Baillière's Clin. Gastroenterol.* 8 (1994) 255–270.
- [30] S.S. Davis, J.G. Hardy, J.W. Fara, Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine, *Gut* 27 (1986) 886–892.
- [31] A.J. Coupe, S.S. Davis, I.R. Wilding, Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects, *Pharm. Res.* 8 (1991) 360–364.
- [32] B. Kuo, R.W. McCallum, K.L. Koch, M.D. Sitrin, J.M. Wo, W.D. Chey, W.L. Hasler, J.M. Lackner, L.A. Katz, J.R. Semler, G.E. Wilding, H.P. Parkman, Comparison of gastric emptying of a nondigestible capsule to a radio-labelled meal in healthy and gastroparetic subjects, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27 (2008) 186–196.

- [33] J. Lotsch, B. Kettenmann, B. Renner, D. Drover, K. Brune, G. Geisslinger, G. Kobal, Population pharmacokinetics of fast release oral diclofenac in healthy volunteers: relation to pharmacodynamics in an experimental pain model, *Pharm. Res.* 17 (2000) 77–84.
- [34] B. Terhaag, A. Hoffmann, M. Barkworth, B. Vens-Cappell, Bioavailability of a new effervescent tablet of diclofenac, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38 (2000) 546–551.
- [35] I.R. Wilding, J.G. Hardy, R.A. Sparrow, S.S. Davis, P.B. Daly, J.R. English, In vivo evaluation of enteric-coated naproxen tablets using gamma scintigraphy, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1436–1441.