



Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

Ana Cristina da Costa Ribeiro Rama



Diminuição de Toxicidade Gástrica da Indometacina
por Complexação com Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

Coimbra 2003



F a c u l d a d e d e F a r m á c i a
U n i v e r s i d a d e d e C o i m b r a

A n a C r i s t i n a d a C o s t a R i b e i r o R a m a

Diminuição de Toxicidade Gástrica da Indometacina
por Complexação com Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

Preparação e caracterização dos complexos de inclusão.
Ensaio de segurança em modelo animal.



F a c u l d a d e d e F a r m á c i a
U n i v e r s i d a d e d e C o i m b r a

A n a C r i s t i n a d a C o s t a R i b e i r o R a m a

Diminuição de Toxicidade Gástrica da Indometacina por Complexação com Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

Preparação e caracterização dos complexos de inclusão.

Ensaios de segurança em modelo animal.

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de:

Tecnologia Farmacêutica e Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Em colaboração com:

Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Unidade de Química Física Molecular da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

**Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias do Medicamento,
especialidade em Tecnologia Farmacêutica e Farmacologia.**

Dedico este trabalho

ao meu Pai
à minha Mãe

ao Jó e ao Pê
ao Jorge

aos que eu amo

...O importante é fazer as coisas *com gosto*.

...A tese deve ser vivida como um jogo, como uma aposta, como uma caça ao tesouro.
... Há uma satisfação de desportista em andar à caça de um texto que não se encontra,
há uma satisfação de charadista em encontrar, depois de se ter reflectido muito,
a solução de um problema que parecia insolúvel.

...Normalmente, depois da tese,
verificar-se-á a irrupção de um grande frenesim de trabalho.
Deseja-se aprofundar todos os pontos que foram negligenciados,
perseguir ideias que nos vieram ao espírito mas que tivemos de suprimir,
ler outros livros,
escrever ensaios.

...E isto é sinal de que a tese vos activou o metabolismo intelectual,
que foi uma experiência positiva.
É ainda sinal de que são agora vítimas de uma coacção para investigar,
um pouco como o Chaplin dos Tempos Modernos,
que continuava a apertar parafusos mesmo depois do trabalho:
e terão de fazer um esforço para parar.

UMBERTO ECO

In "Como se faz uma tese em ciências humanas"
7.ª edição, Lisboa, Janeiro, 1998

Os meus agradecimentos

Pela orientação científica e pela disponibilidade,
Pela opinião e pela revisão crítica,
Pela amizade e pela dedicação,
Pela compreensão e pela tolerância,
Pela consideração e pela confiança,
Pelo incentivo e pelo apoio,

Professor Doutor Pinho Brojo

Professora Doutora Maria Margarida Caramona
Professor Doutor Adriano Barbosa de Sousa

Professor Doutor Francisco Veiga
Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo
Professor Doutor Silvério Cabrita

Professora Doutora Maria José Marques de Almeida
Professor Doutor João Poiares da Silva
Dra. Teresa Salsa
Dra. Noémia Canas
Dra. Lídia Martins
Dra. Carla Lourenço
Dra. Conceição Matias
Vasco da Graça

Agradeço todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho,

Às Técnicas do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica,
Joaquina Crisóstomo e Luísa Bronze;

Às Técnicas do Laboratório de Farmacologia,
Almerinda Loureiro, Marina Alvim Pinho e Odete Direitinho;

À Investigadora e às Técnicas do Instituto de Patologia Experimental,
Dra. Maria Beatriz França, Margarida Menezes e Elisa Patrício.

Agradeço a constante disponibilidade manifestada,

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Farmácia,
Ana Maria Letra, António Rosa, Eduarda Botte, Lurdes Fortunato, Maria Alice Rodrigues
e ainda à Dra. Lucília Paiva.

À MERCK SHARP & DOHME agradeço a cedência da matéria-prima de Indometacina.

À ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE FARMACÊUTICOS HOSPITALARES agradeço o apoio facultado
através do Prémio APFH/NOVARTIS.

E a todos os FAMILIARES, AMIGOS e COLEGAS, que de algum modo contribuíram para que este
TRABALHO chegasse ao fim, os meus agradecimentos.

Resumo

A indometacina, anti-inflamatório não esteróide praticamente insolúvel em água, tem capacidade de induzir toxicidade gástrica, renal e hepática.

Os sistemas de transporte, de que são exemplo os complexos de inclusão com ciclodextrinas, abrem novas perspectivas à utilização terapêutica de fármacos. A 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina representa um dos mais úteis derivados, devido às características de solubilidade que confere aos fármacos incluídos e à baixa capacidade de induzir toxicidade. A formação de complexos com indometacina protege a toxicidade gástrica induzida por contacto tópico, direccionando o fármaco para o local de absorção no intestino. A hidroxipropil- β -ciclodextrina atravessa a membrana biológica numa baixa percentagem e é excretada nas fezes.

O objectivo principal deste trabalho é a identificação de diferenças nas propriedades físico-químicas dos complexos de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina preparados por dois métodos diferentes, e avaliar a influência da complexação na redução da toxicidade gástrica, após administração oral a ratos Wistar, em comparação com a indometacina forma ácida e sal sódico. A toxicidade renal e a hepática são estudadas para avaliar a absorção da indometacina a partir das formas complexadas.

Os complexos foram preparados por liofilização e secagem por pulverização. A influência dos processos de complexação no estado físico da indometacina e identificação da formação de complexos, no estado líquido e sólido, foi efectuada por diferentes métodos: espectrofotometria ultravioleta, difractometria de raios-X, calorimetria de varrimento diferencial e espectrometria de infravermelhos. O perfil de dissolução e o coeficiente de partilha foram estudados para avaliar a influência da complexação na biodisponibilidade.

O estudo toxicológico foi efectuada em 135 animais, com peso médio de 227 g, com acesso livre à água e mantidos em jejum. Indometacina forma ácida, sal sódico tri-hidratado, complexos obtidos por liofilização e secagem por pulverização, nas doses terapêutica e tóxica, foram administrados oralmente uma vez por dia, durante três dias. Foi registada a variação de peso. Os animais foram sacrificados 72h após a primeira administração. Foi colhido o estômago, o rim e o fígado.

Foi efectuado estudo citológico do muco. Após avaliação macroscópica de lesões, o estômago foi fotografado e preparado para estudo histopatológico por técnica de hematoxilina-eosina, assim como o fígado e o rim. Foram pesquisadas alterações morfológicas nestes órgãos. Criaram-se índices de lesão sendo os tipos de alterações indexados de acordo com a gravidade e a incidência.

Os resultados mostram que os métodos de preparação influenciam o estado físico da indometacina. A análise dos estudos de interação, sugere a formação de complexos. Os perfis de dissolução revelam um aumento da percentagem de indometacina dissolvida e da eficiência de dissolução em comparação com a forma isolada, sendo o complexo obtido por liofilização o que apresenta melhores resultados. A complexação não influencia significativamente o coeficiente de partilha.

Durante o estudo toxicológico não se observou mortalidade. Os animais tratados com indometacina forma ácida e sal sódico nas doses terapêutica e tóxica, evidenciaram focos de necrose gástrica, úlceras e exulcerações na observação macroscópica. No mesmo grupo, o estudo citológico revelou a presença de leucócitos e eritrócitos.

No estudo histopatológico, o grupo da indometacina complexada através de secagem por pulverização evidenciou uma redução de risco absoluto de toxicidade gástrica em relação à forma ácida, de 75% (IC 95% -0,95 a 0,55; $p=0,000$) para a dose terapêutica. O grupo da indometacina complexada através de liofilização evidenciou uma redução de risco absoluto de toxicidade gástrica em relação à forma ácida, de 60% (IC 95% -0,85 a -0,35; $p=0,000$) para a dose terapêutica.

Em todos os grupos de indometacina isolada ou complexada, nas doses terapêutica e tóxica, o fígado apresentava em muitos animais pequenos focos de esteatose, focos de necrose e estase. O rim destes mesmos grupos apresentou pequenas áreas de hemorragia, vacuolização das células tubulares e alterações da densidade celular dos glomérulos.

Pode concluir-se que os complexos de inclusão melhoram as características físico-químicas da indometacina e que, nas condições do ensaio, reduzem a sua capacidade para induzir lesão gástrica, sendo o complexo obtido através de secagem por pulverização que apresenta melhores resultados. A partir da toxicidade renal e hepática evidenciada, poder-se-á deduzir que a indometacina foi absorvida após administração oral de formas complexadas, dado que todos os animais aos quais foi administrada indometacina sob qualquer forma, apresentam uma incidência e gravidade semelhantes.

Palavras-chave: Indometacina; Hidroxipropil- β -ciclodextrina; Liofilização; Secagem-por-pulverização; Estômago; Fígado; Rim; Toxicidade; Características-físico-químicas; Rato-Wistar; Espectrofotometria-ultravioleta; Calorimetria-varrimento-diferencial; Difracção-raios-X; Espectroscopia-infravermelhos; Perfis-dissolução; Coeficiente-partilha.

Abstract

Indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is practically water insoluble and has capacity to induce gastric, renal and hepatic injury.

Delivery systems, like cyclodextrin's inclusion complexes, open new perspectives to drug's therapeutic use. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin represents one of most useful cyclodextrin derivatives, due to aqueous solubility characteristics granted to inclusion complexes formed and very low capacity to induce toxicity. Inclusion complex with indomethacin protects gastric toxicity induced by topical contact, targeting drug to the intestine for absorption. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin crosses biologic membrane at very low percentage and is excreted on the faeces.

This work's main objective is to identify differences on physicochemical properties of indomethacin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes, prepare by two different methods and evaluate influence of complexation on gastric injury reduction, after oral administration to Wistar rats, compared with indomethacin acid and salt forms. Renal and hepatic injury is studied to evaluate if indomethacin is absorbed from complexed forms.

Complexes were prepared by freeze and spray-drying. Influence of complexation methods on indomethacin stability and identification of complex formation, on the liquid and solid state, was performed by different methods: ultraviolet spectroscopy, differential scanning calorimetry, X-ray diffractometry, infrared spectrometry. Dissolution profiles and partition coefficient were performed to study bioavailability after complexation.

Toxicological study was performed on 135 animals, medium weight 227 g, allowed free water access and kept fasted. Indomethacin acid-form, trihydrated-sodium-salt, complexes spray and freeze-drying, in therapeutic and toxic-dose, were administered orally once a day for 3 days. Weight variation was recorded. Animals were sacrificed 72h after first administration. Stomach, kidney and liver were collected.

Gastric mucous was studied by cytological technique. After macroscopic lesions evaluation, stomachs were photographed and prepared for histopathological study by haematoxylin-eosin technique. Morphologic injury search was performed on stomach, liver and kidney. Lesion indexes were developed with type of injury being scored according to severity as well as incidence.

Results show that preparation methods influence indomethacin physical state. Analysis from interaction studies suggests inclusion complex formation. Dissolution profiles revealed an increase on the percentage of dissolved indomethacin and on dissolution efficiency, compared with isolated indomethacin forms. Freeze-drying complex showed better results. Complexation had no significant influence on partition coefficient.

During toxicological study, no mortality was registered. Animals administered with indomethacin acid and salt form, in both therapeutic and toxic-dose, showed gastric necrosis foci, ulcers and exulcerations. In same groups, cytological analysis revealed presence of leukocytes and erythrocytes.

Gastric histopathological study revealed for the spray-drying complex, an absolute risk reduction of 75% (CI 95% -0,95 0,55; $p=0,000$) for therapeutic-dose. Regarding the freeze-drying complex the absolute risk reduction was 60% (CI 95% -0,85 -0,35; $p=0,000$) for therapeutic-dose.

Liver of indomethacin groups showed cases of small steatosis foci, focal necrosis and stasis, on both therapeutic and toxic-dose. Kidney of same groups, showed haemorrhage small areas, tubular cells vacuolization and glomerular cellular density change.

We can conclude that complexation methods enhance indomethacin physicochemical characteristics and that, under experience conditions, inclusion complexes showed very low capacity to induce gastric injury, with better results for spray-drying complex. Renal and liver toxicity, lead to assume that indomethacin was absorbed from complexes after oral administration, since all animals treated with any form of indomethacin showed similar incidence and severity.

Key words: Indomethacin; Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Freeze-drying; Spray-drying; Stomach; Liver; Kidney; Toxicity; Physicochemical-characteristics; Wistar-rat; Ultraviolet-spectroscopy; Differential-scanning-calorimetry; X-ray-diffractometry; Infrared-spectrometry; Dissolution-profiles; Partition-coefficient.

Prefácio



OS CUIDADOS FARMACÊUTICOS EM NEONATOLOGIA E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS

A investigação farmacêutica tem como intuito o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos direccionados à resolução de situações clínicas, integrando conhecimentos pluridisciplinares.

A prática de cuidados farmacêuticos possibilita a identificação de situações clínicas para as quais os recursos terapêuticos existentes não são os adequados. Fazer parte da equipa de saúde de uma unidade de cuidados intensivos de neonatologia é um desafio para o farmacêutico clínico, confrontado com a necessidade de dar resposta aos problemas biogalénicos decorrentes da anatomofisiologia e das patologias inerentes àquele grupo etário que abrange prematuros (indivíduo que nasce antes das 37 semanas de gestação), recém-nascidos (indivíduo com tempo de gestação de 37 a 42 semanas, com idade inferior a 28 dias) e lactentes (indivíduo com idade superior a 28 dias e inferior a 12 meses) (Richardson, 2001; Stewart e Hampton, 1987).

A terapêutica farmacológica confronta-se, por um lado, com um organismo sujeito a marcadas alterações biológicas, resultantes da composição orgânica e da maturação funcional, que decorre a diferentes graus em crianças com a mesma idade,

determinando modificações no perfil farmacocinético e farmacodinâmico e, por outro lado, com a necessidade efectiva da utilização de fármacos. Verifica-se, na prática, a falta de adequação das especialidades farmacêuticas a este grupo, quer no que respeita à formulação, dosagem, forma farmacêutica, osmolalidade, vias de administração ou excipiente utilizado, quer ainda no tocante a características biofarmacêuticas de eficácia e de segurança (Leff e Roberts, 1987; Pellegrin e Lesne, 1980).

Para dar resposta à necessidade de tratamento destes doentes, recorre-se à reformulação de medicamentos, sendo esta uma prática com um elevado risco de segurança e de eficácia, na ausência de informação acerca da estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade.

Nas formulações líquidas, para ultrapassar a fraca solubilidade aquosa de vários fármacos, são usados como agentes suspensores grandes quantidades de co-solventes orgânicos ou xaropes com alta osmolalidade. Ambas as alternativas acarretam riscos potenciais para o RN quer devido à imaturidade metabólica, quer devido aos efeitos locais no intestino (Leff e Roberts, 1987).

Na ausência de preparações líquidas adequadas, efectua-se, a partir das fórmulas sólidas orais, diluições sólidas em solventes tais como lactose ou amido. A administração de pós misturados com um pequeno volume de água (1 a 2 ml) resulta na perda de uma parte variável de dose e obstrução da sonda nasogástrica.

Os objectivos biogalénicos em neonatologia visam a obtenção de agentes adequados ao grupo etário e requerem o estudo de possíveis vias de administração alternativas e avaliação de aspectos biofarmacêuticos, de segurança e eficácia de fármacos "in vivo" e "in vitro".

Considerou-se assim que a utilização de derivados das ciclodextrinas altamente solúveis em água, seria uma alternativa para a formulação de preparações líquidas aquosas de fármacos fracamente solúveis, aliada a uma melhoria de biodisponibilidade e de segurança (Kaukonen et al., 1998; Tötterman et al., 1997).

Este estudo pretende perspectivar a possibilidade do recurso aos novos sistemas terapêuticos, dos quais é exemplo a complexação de fármacos com ciclodextrinas, no tratamento farmacológico do fecho do canal arterial (CA) em RN de termo e prematuros por via oral, como meio de optimização farmacoterapêutica e diminuição da toxicidade gastrointestinal do fármaco de primeira escolha - a **Indometacina**.

Índice de Ilustrações e Tabelas

pág.

ILUSTRAÇÕES

Introdução

- | | | |
|----|-------------------|---|
| 33 | Figura 1. | Circulação cardíaca fetal. |
| 34 | Figura 2. | Representação esquemática do fecho do canal arterial. |
| 38 | Figura 3. | Estrutura química da IM. |
| 39 | Figura 4. | Espectro UV da IM em ácido clorídrico metanólico 0,1N. |
| 42 | Figura 5. | Mecanismo de indução de toxicidade da Indometacina. |
| 46 | Figura 6. | Forma de cone truncado das CDs e localização dos grupos hidroxilo primários e secundários. |
| 47 | Figura 7. | Estrutura molecular e medida da cavidade das CDs α , β e γ . |
| 48 | Figura 8. | Modelo cinético do equilíbrio entre o complexo de inclusão da forma ionizada e o da forma não ionizada. |
| 49 | Figura 9. | Estrutura molecular da β -CD. Grupos hidroxilo onde ocorre a substituição de radicais. |
| 52 | Figura 10. | Equilíbrio estabelecido entre as formas de fármaco não complexada e complexada. |
| 57 | Figura 11. | Diagrama de solubilidade de fases. |
| 58 | Figura 12. | Modelo cinético do equilíbrio que se estabelece nos diagramas do tipo B. |

- 62 **Figura 13.** Classificação biofarmacêutica de fármacos quanto à solubilidade e permeabilidade.
- 67 **Figura 14.** Modelo de distribuição das várias entidades em solução na fase aquosa e oleosa.
- 72 **Figura 15.** Inclusão parcial de IM em CD, exemplo da inclusão da parte indol e da parte p-clorobenzeno.
- 78 **Figura 16.** Modelo cinético do processo de dissolução/absorção de um fármaco administrado por via oral.
- 79 **Figura 17.** Formas de libertação de fármacos no TGI e pH das várias áreas anatómicas.
- 80 **Figura 18.** Modelo proposto de comportamento dos complexos de ciclodextrina no intestino, após administração oral.

Parte I - Estudo Tecnológico

- 95 **Figura 19.** Desenho experimental do estudo tecnológico.
- 97 **Figura 20.** Estudo de solubilidade de fases. Desenho experimental da preparação de amostras e do doseamento espectrofotométrico.
- 101 **Figura 21.** Desenho do estudo do coeficiente de partilha.
- 104 **Figura 22.** Diagramas de solubilidade de fases da IM com HP- β -CD, a diferentes valores de pH em tampão fosfato e em água purificada.
- 105 **Figura 23.** Modelo cinético do equilíbrio que se estabelece entre as moléculas de complexo com fármaco ionizado e não ionizado.
- 106 **Figura 24.** Determinação experimental de S_0 (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em tampão fosfato a pH 7,0.
- 106 **Figura 25.** Determinação experimental de S_0 (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em tampão fosfato a pH 4,5.
- 107 **Figura 26.** Determinação experimental de S_0 (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em água purificada.
- 109 **Figura 27.** Influência dos métodos de complexação e de preparação de complexos na solubilidade máxima da IM matéria-prima em água purificada.
- 112 **Figura 28.** Espectro de absorção no ultravioleta da IM matéria-prima e após ser submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização.
- 113 **Figura 29.** Espectro de infravermelhos (FTIR) da IM matéria-prima e após ser submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização.
- 116 **Figura 30.** Termogramas de CVD da IM matéria-prima como recebida e após ser submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização.
- 117 **Figura 31.** Difractogramas de raios-X de IM matéria-prima como recebida e após ser submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização.
- 118 **Figura 32.** Espectro de absorção no ultravioleta da IM matéria-prima como recebida, dos complexos de IM:HP- β -CD, obtidos por método de liofilização e secagem por pulverização e da mistura física.
- 120 **Figura 33.** Espectro de infravermelhos (FTIR) da IM matéria-prima como recebida, dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização, da hidroxipropil-**b**-ciclodextrina e da mistura física.

- 123 **Figura 34.** Termogramas de CVD da IM matéria-prima como recebida, dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização, da hidroxipropil- β -ciclodextrina e da mistura física.
- 125 **Figura 35.** Difractogramas de raios-X da IM matéria-prima como recebida, da hidroxipropil- β -ciclodextrina, da IM mistura física e dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização.
- 127 **Figura 36.** Gráficos do tempo necessário para atingir 50 e 90% de IM dissolvida; da percentagem de IM dissolvida aos 5, 30 e 60 minutos; da eficiência de dissolução aos 5, 30 e 60 minutos.
- 128 **Figura 37.** Perfis de dissolução da IM matéria-prima, da mistura física e dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização.
- 130 **Figura 38.** Imagens de microscopia electrónica de varrimento de cristais de IM forma ácida matéria-prima e depois de submetida a processo de secagem por pulverização.
- 131 **Figura 39.** Variação da concentração molar de IM das várias amostras, antes e depois da mistura do sistema binário fase aquosa/fase oleosa.

Parte II - Estudo Toxicológico

- 141 **Figura 40.** Condições de alojamento dos animais em armários biotério.
- 144 **Figura 41.** Pesagem dos animais.
- 145 **Figura 42.** Desenho experimental do estudo toxicológico.
- 149 **Figura 43.** Rim direito, fragmento do fígado e estômago aberto ao longo da grande curvatura.
- 151 **Figura 44.** Fragmentos do rim e do fígado e das zonas de lesão do estômago, preparados para estudo histopatológico.
- 165 **Figura 45.** Representação gráfica da variação percentual de peso.
- 167 **Figura 46.** Diagrama de dispersão da correlação entre peso inicial e peso final.
- 169 **Figura 47.** Variação percentual de peso face à dose administrada.
- 170 **Figura 48.** Frequência de animais que apresentam fezes normais e alteradas.
- 172 **Figura 49.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo das fezes.
- 174 **Figura 50.** Análise macroscópica - Lesões múltiplas no estômago de um animal ao qual foi administrada IMfa, dose terapêutica.
- 174 **Figura 51.** Análise macroscópica - Lesões múltiplas no estômago de um animal ao qual foi administrada IMfa, dose tóxica.
- 175 **Figura 52.** Análise macroscópica - Mucosa edemaciada e algumas lesões no estômago de um animal ao qual foi administrada IMss, dose terapêutica.
- 175 **Figura 53.** Análise macroscópica - Mucosa edemaciada e algumas lesões no estômago de um animal ao qual foi administrada IMss, dose tóxica.
- 176 **Figura 54.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CSP, dose terapêutica.
- 176 **Figura 55.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CSP, dose tóxica.
- 176 **Figura 56.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CLio, dose terapêutica.

- 176 **Figura 57.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CLio, dose tóxica.
- 177 **Figura 58.** Análise macroscópica - Mucosa ligeiramente edemaciada e evidência de lesão no estômago de um dos dois animais do grupo da IM complexada por SP.
- 178 **Figura 59.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada água destilada.
- 178 **Figura 60.** Análise macroscópica - Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada ciclodextrina.
- 180 **Figura 61.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da alteração do aspecto da mucosa gástrica.
- 182 **Figura 62.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de sangue na mucosa gástrica.
- 184 **Figura 63.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão macroscópico da mucosa gástrica.
- 187 **Figura 64.** Análise histopatológica - Perda da camada superficial da mucosa - exulceração. IMfa dose terapêutica.
- 187 **Figura 65.** Análise histopatológica - Úlcera. IMfa dose terapêutica.
- 188 **Figura 66.** Análise histopatológica - Área extensa de necrose da mucosa. IMfa dose tóxica.
- 188 **Figura 67.** Análise histopatológica - Área extensa de necrose do corpo com infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica.
- 189 **Figura 68.** Análise histopatológica - Alterações do corpo com vacuolização, perda do epitélio malpighiano e de queratina, observando-se também infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica.
- 189 **Figura 69.** Análise histopatológica - Alterações do corpo com vacuolização, perda do epitélio malpighiano e de queratina, observando-se também infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica.
- 190 **Figura 70.** Análise histopatológica - Perda da camada superficial da mucosa - exulceração. IMss dose terapêutica.
- 190 **Figura 71.** Análise histopatológica - Úlcera. IMss dose terapêutica.
- 191 **Figura 72.** Análise histopatológica - Área extensa de necrose da mucosa com infiltrado inflamatório. IMss dose tóxica.
- 192 **Figura 73.** Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. IM CLio.
- 192 **Figura 74.** Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. IM CSP.
- 193 **Figura 75.** Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. Água destilada.
- 193 **Figura 76.** Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. HP- β -CD.
- 195 **Figura 77.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível gástrico, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica, para o estudo histopatológico.

- 196 **Figura 78.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível gástrico, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.
- 197 **Figura 79.** Análise comparativa da redução de evidência de alteração morfológica, em proporção de animais, no estudo histopatológico.
- 199 **Figura 80.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão gástrico, por análise histopatológica. Comparação entre os diferentes produtos e a IMfa DT.
- 200 **Figura 81.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão gástrico, por análise histopatológica. Comparação entre complexos.
- 201 **Figura 82.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da comparação do índice de lesão entre os produtos estudados e a água como controlo.
- 203 **Figura 83.** Diagrama de dispersão da correlação entre a variação percentual de peso e o índice de lesão morfológico do estômago.
- 206 **Figura 84.** Distribuição de frequências de presença e ausência de eritrócitos e de leucócitos.
- 210 **Figura 85.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de eritrócitos no muco gástrico.
- 213 **Figura 86.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de leucócitos no muco gástrico.
- 215 **Figura 87.** Análise histopatológica - Vacuolização dos tubulos no rim de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose tóxica.
- 215 **Figura 88.** Análise histopatológica - Vacuolização dos tubulos no rim de um animal ao qual foi administrada IMfa, na dose terapêutica.
- 216 **Figura 89.** Análise histopatológica - Estase observada no rim de um dos animais ao qual foi administrada IM complexada por processo de liofilização.
- 216 **Figura 90.** Análise histopatológica - Rim sem evidência de alteração morfológica. HP- β -CD.
- 218 **Figura 91.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível renal, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica. no estudo histopatológico.
- 219 **Figura 92.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível renal, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.
- 222 **Figura 93.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão renal. Produtos em estudo face à IMfa DT.
- 222 **Figura 94.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão renal. Comparação entre complexos.
- 224 **Figura 95.** Análise histopatológica - Fígado com uma histologia sem alterações significativas. HP- β -CD.
- 225 **Figura 96.** Análise histopatológica - Focos de necrose no fígado de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose terapêutica.
- 225 **Figura 97.** Análise histopatológica - Estase no fígado de um animal ao qual foi administrada IMfa, na dose tóxica.

- 226 **Figura 98.** Análise histopatológica - Infiltrado inflamatório e foco de necrose no fígado de um animal ao qual foi administrada IM complexada por processo de secagem por pulverização, na dose terapêutica.
- 226 **Figura 99.** Análise histopatológica - Esteatose observada no fígado de um animal ao qual foi administrada IM complexada por processo de liofilização, na dose tóxica.
- 227 **Figura 100.** Análise histopatológica - Esteatose observada no fígado de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose tóxica.
- 228 **Figura 101.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível hepático, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica, para o estudo histopatológico.
- 229 **Figura 102.** Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível hepático, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.
- 232 **Figura 103.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão hepática.
- 232 **Figura 104.** Representação gráfica do risco relativo para o estudo da comparação da lesão hepática entre complexos.

TABELAS

Introdução

- 35 **Tabela 1.** Factores fisiopatológicos associados à manutenção do CA que podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos.

Parte I - Estudo Tecnológico

- 106 **Tabela 2.** Valores de concentração molar utilizados no cálculo das constantes de estabilidade.
- 107 **Tabela 3.** Constantes de solubilidade e valores de declive.
- 109 **Tabela 4.** Solubilidade máxima em água purificada.
- 115 **Tabela 5.** Picos endotérmicos da IM matéria-prima e submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização.
- 121 **Tabela 6.** Síntese dos dados da análise por calorimetria diferencial de varrimento da IM mistura física, da hidroxipropil-**b**-ciclodextrina e dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização.
- 127 **Tabela 7.** Valores dos parâmetros de dissolução.
- 132 **Tabela 8.** Coeficiente de partilha aparente (P^*) determinado em tampão fosfato pH 7,0 e pH 5,5 (fase aquosa).

Parte II - Estudo Toxicológico

- 140 **Tabela 11.** Doses administradas dos produtos em estudo.
- 142 **Tabela 12.** Peso médio dos animais \pm desvio-padrão, número de animais por grupo e respectivas doses utilizadas.
- 156 **Tabela 13.** Estatística descritiva utilizada na caracterização das amostras.
- 159 **Tabela 14.** Tabela de contingência de 2x2 normalmente utilizada para a análise de dados de estudos prospectivos.
- 161 **Tabela 15.** Desenho da análise estatística. Comparação de variáveis.
- 162 **Tabela 16.** Desenho da análise estatística. Relação entre variáveis.
- 165 **Tabela 17.** Variação de peso por grupos. Valores médios \pm desvio-padrão e mediana. Variação percentual de perda de peso.
- 168 **Tabela 18.** Pares de grupos entre os quais se verifica diferença significativa ($p < 0,05$) de variação percentual de peso.
- 171 **Tabela 19.** Incidência de animais que apresentam aspecto alterado das fezes, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 173 **Tabela 20.** Resultados da observação macroscópica efectuada no estômago.
- 179 **Tabela 21.** Incidência de animais que apresentam alteração do aspecto da mucosa gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 181 **Tabela 22.** Incidência de animais que apresentam presença de sangue na mucosa gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 183 **Tabela 23.** Incidência de animais que apresentam lesão macroscópica do estômago, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 185 **Tabela 24.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão gástrica na avaliação macroscópica. Resultados do teste U de Mann-Whitney.
- 186 **Tabela 25.** Síntese dos resultados do índice de lesão gástrica (ILGm) do estudo histopatológico.
- 194 **Tabela 26.** Proporção de animais que evidenciam alterações morfológicas do estômago no estudo histopatológico.
- 197 **Tabela 27.** Redução de evidência de alteração morfológica, em proporção de animais, no estudo histopatológico.
- 198 **Tabela 28.** Estudo histopatológico. Incidência de animais que apresentam lesão morfológica gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 200 **Tabela 29.** Estudo histopatológico. Estudo da incidência de animais tratados com as formas de complexo face ao controlo, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 201 **Tabela 30.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão gástrica no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.
- 204 **Tabela 31.** Valor de significância da comparação da variação percentual de peso entre os diferentes índices de lesão morfológica do estômago.
- 205 **Tabela 32.** Resultados do Teste de Cochran de concordância do índice de lesão gástrica, entre os métodos de observação macroscópica e de análise histopatológica.
- 206 **Tabela 33.** Resultados do estudo efectuada no muco gástrico.

- 209 **Tabela 34.** Incidência de animais que apresentam presença de eritrócitos no muco gástrico, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 210 **Tabela 35.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da presença de eritrócitos no muco gástrico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.
- 211 **Tabela 36.** Resultados do Teste de Cochran aplicado à concordância entre a alteração do aspecto das fezes, presença de sangue na mucosa e de eritrócitos no estudo citológico.
- 212 **Tabela 37.** Incidência de animais que apresentam presença de leucócitos no muco gástrico, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 214 **Tabela 38.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da presença de leucócitos no muco gástrico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.
- 214 **Tabela 39.** Resultados do Teste de Cochran aplicado à concordância entre a alteração do aspecto da mucosa e da presença de leucócitos no estudo citológico.
- 217 **Tabela 40.** Síntese dos resultados do estudo histopatológico e do índice de lesão renal.
- 221 **Tabela 41.** Incidência de animais que apresentam lesão renal, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 223 **Tabela 42.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão renal no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.
- 227 **Tabela 43.** Síntese dos resultados do estudo histopatológico e do índice de lesão hepática.
- 231 **Tabela 44.** Incidência de animais que apresentam lesão hepática, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto.
- 233 **Tabela 45.** Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão hepática no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Índice de Abreviaturas

%PP	percentagem de perda de peso	ILGm	índice de lesão morfológica ao nível gástrico
β-CD	β-ciclodextrina	ILHm	índice de lesão morfológica ao nível hepático
AINE	anti-inflamatório não esteróide	ILRm	índice de lesão morfológica ao nível renal
AMP	monofosfato de adenosina	IM	indometacina
ATP	trifosfato de adenosina	IM:HP-β-CD	complexos de indometacina com hidroxipropil-β-ciclodextrina
CA	canal arterial	IMfa	indometacina forma ácida
CD	ciclodextrina	IMss	indometacina sal sódico
CDV	calorimetria de varrimento diferencial	IV	intravenosa
CLio	complexo de inclusão obtido pelo método de liofilização	Lio	liofilização
COX	ciclooxigenase	MF	mistura física
CP	coeficiente de partilha	MP	matéria-prima
CSP	complexo de inclusão obtido pelo método de secagem por pulverização	P	coeficiente de partilha verdadeiro
Dm	dose no homem	P*	coeficiente de partilha aparente
Dr	dose a administrar no rato	PGE₂	prostaglandina E ₂
DT	dose terapêutica	PGI₂	prostaciclina I ₂
DTx	dose tóxica	PGs	prostaglandinas
ED	eficiência de dissolução	PR	proporção
F	molécula de fármaco hóspede	RN	recém-nascido
F:CD	complexos de fármaco com ciclodextrina	SM	substituição molar
FP V	Farmacopeia Portuguesa V edição	SP	secagem por pulverização
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>	Tf	tampão fosfato
GC	grupo controlo	TGI	tracto gastrointestinal
GI	grupo intervenção	USP XX	<i>United States Pharmacopeia XX edition.</i>
gl	graus de liberdade (estatística)	UV	ultravioleta
HP-β-CD	hidroxipropil-β-ciclodextrina		
ILGM	índice macroscópico de lesão gástrica		

Introdução

Introdução

33

87

93

139

237

247

1. O CANAL ARTERIAL EM RECÉM-NASCIDOS

Na circulação fetal, o canal arterial (CA) é um canal vascular normal que liga a artéria pulmonar esquerda, com a aorta descendente (Figura 1). A função do CA é a de permitir que a maior parte do fluxo sanguíneo (90%), que sai do ventrículo direito, flua directamente para a aorta descendente, evitando a circulação pulmonar altamente resistente. Esta circulação direcciona o fluxo de sangue não oxigenado para a placenta, a qual é a fonte fetal de reoxigenação (Bhatt e Nahata, 1989; Gal e Gilman, 1993; Hammerman e Kaplan, 2001; Yeh e Carr, 1991).



Figura 1. Circulação cardíaca fetal. Adaptado de *American Heart Association - "If your child has a congenital heart defect"* (acessível em: <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1672#>).

Durante os primeiros minutos após o nascimento, a constrição do CA e o seu fecho funcional inicia-se normalmente de modo espontâneo, redireccionando o fluxo sanguíneo para os pulmões, que assumem a função de oxigenação. A evolução do fecho funcional do CA em recém-nascidos de termo ocorre durante as primeiras horas de vida: 20% encontra-se fechado às 24h, 82% às 48h e 100% às 96h. O potencial risco de reabertura do CA mantém-se até ocorrer o fecho completo.

Os factores determinantes do fecho desta veia, representado esquematicamente na Figura 2, são a tensão de oxigénio, as características específicas da massa muscular disponível no CA e a concentração de prostaglandinas (PGs) vasodilatadoras circulantes, principalmente a PGE_2 , a prostaciclina PGI_2 e, segundo alguns autores, também o tromboxano A_2 (Baptista et al., 1999; Barst e Gersony, 1989; Gal e Gilman, 1993; Hammerman, 1995; Hammerman e Kaplan, 2001).

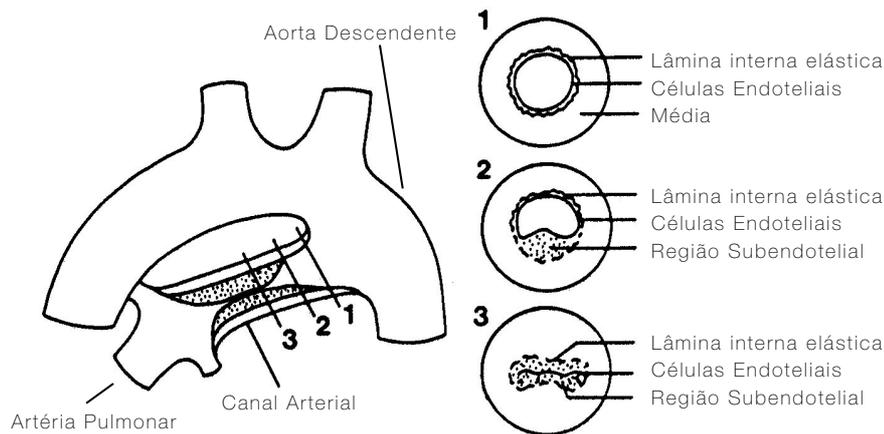


Figura 2. Representação esquemática do fecho do canal arterial. **1.** A aorta não apresenta espessamento; **2.** Início do espessamento a partir da base do CA, com a migração das células do músculo liso para a região subendotelial, levando ao desaparecimento do lúmen do canal; **3.** O processo inicia-se na parte terminal do canal do lado da artéria pulmonar e progride para o lado da aorta (Hammerman, 1995).

1.1. A manutenção do Canal Arterial e implicações na biodisponibilidade de fármacos

A incidência da manutenção do CA de acordo com a bibliografia é aproximadamente de 20 a 25% em RN de baixo peso (1500 a 2500 g), podendo atingir 70% nos de muito baixo peso (inferior a 1500 g), ou valores ainda superiores naqueles que são tratados com surfactante exógeno. O não encerramento tem implicações hemodinâmicas clinicamente significativas (Hammerman, 1995; Hammerman e Kaplan, 2001; Richardson, 2001; Romagnoli, 1997; Yeh e Carr, 1991) e que se reflectem na biodisponibilidade dos fármacos (Tabela 1).

Tabela 1. Factores fisiopatológicos associados à manutenção do CA que podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos (Gal e Gilman, 1993).

Situação Clínica	Alteração Fisiopatológica	Impacto na Biodisponibilidade
Hipóxia	Hipóxia gastrointestinal ou hipoperfusão.	Absorção ♦ Diminuição da biodisponibilidade.
Malnutrição	Diminuição proteica/albumina.	Ligação às proteínas ♦ Aumento de fármaco livre.
Acidose	Diminuição ligação proteica; Aumento de fármaco não ionizado (para ácidos fracos): ♦ Maior distribuição nos tecidos	Distribuição ♦ Aumento do volume de distribuição.
Retenção de fluidos / Edema	Aumento da água intra e extracelular.	
"Bypass" sanguíneo da esquerda para a direita através do CA (para os pulmões)	Criação de um terceiro compartimento na vasculatura pulmonar.	
"Bypass" sanguíneo através do CA	Diminuição do "output" cardíaco.	Eliminação
Hipóxia	Diminuição do fluxo sanguíneo hepático.	♦ Aumento da semi-vida plasmática dos fármacos;
Falha cardíaca congestiva	Diminuição do fluxo sanguíneo renal.	♦ Diminuição da depuração renal.
Edema pulmonar		
Suporte respiratório (ventilação)		
Terapêutica com indometacina		

O facto do CA não fechar após o nascimento, leva a que o sangue oxigenado e não oxigenado se misturem, conduzindo frequentemente a uma síndrome de insuficiência respiratória (Bhatt e Nahata, 1989; Yeh e Carr, 1991).

Estudos clínicos provam que os níveis elevados de prostaglandinas vasodilatadoras no CA, principalmente da PGE₂ e da prostaciclina PGI₂, são os principais responsáveis pela manutenção da abertura do CA no recém-nascido, justificando-se assim o tratamento farmacológico com inibidores da síntese das PGs (Bhatt e Nahata, 1989; Hammerman, 1995; Hammerman e Kaplan, 2001; Yeh e Carr, 1991).

A indometacina (IM) administrada por via intravenosa (IV) é um dos fármacos de eleição para o tratamento farmacológico do fecho do CA. As características de solubilidade e hidrólise da IM, a reduzida absorção gastrointestinal e potencial toxicidade gástrica em RN, são factores que condicionam a elaboração de uma forma farmacêutica líquida para administração oral.

Neste contexto e tendo em consideração as vantagens da complexação de fármacos com ciclodextrinas, surge a ideia deste trabalho, com o objectivo de complexar a IM com ciclodextrina, conseguindo-se a modificação das características físico-químicas e de toxicidade, que até agora impediram a utilização de uma solução para administração por via oral ao RN.

1.2. Absorção gastrointestinal em recém-nascidos

A absorção gastrointestinal é regulada fundamentalmente por um processo de difusão dependente do pH, pelo tempo de esvaziamento gástrico, pelo peristaltismo, pelas condições de desenvolvimento e maturação da membrana intestinal, pelo estado da função biliar e pela flora bacteriana. Há estudos que indicam que o pH gástrico alcalino à nascença, se deve à presença de líquido amniótico, e que no recém-nascido de termo a secreção basal de ácido no conteúdo gástrico se inicia alguns minutos após o nascimento, aumentando gradualmente ao longo de algumas horas, sendo no entanto inferior ao do adulto (Hyman et al., 1985; Stewart e Hampton, 1987). O pH do conteúdo gástrico é o resultado de vários factores, os quais incluem, sob condições fisiológicas, a libertação de ácido clorídrico, comida ingerida, saliva engolida e regurgitação do conteúdo duodenal (Hyman et al., 1985; Mason, 1962).

No momento do nascimento, o pH gástrico situa-se entre 1 e 3, passando para 6 a 8, nas primeiras 24 horas e alcançando o do adulto aos 3 anos de idade. A relativa acloridria no RN, juntamente com o retardar do esvaziamento gástrico, o qual permanece até aos 6 meses, dá lugar a diferenças de biodisponibilidade dos fármacos, dependentes das características físico-químicas destes (Besunder, 1988; Kadima e Lesne, 1980). O RN tem um pH no intestino delgado mais elevado do que o do adulto, o que permite à flora bacteriana, normalmente restrita ao intestino grosso, colonizar aí. As alterações da colonização do tracto gastrointestinal pela flora bacteriana são dependentes da idade gestacional, do tipo de parto e de alimentação, modificando a hidrólise de fármacos conjugados que são excretados na biliar (Besunder, 1988; Yoshioka, et al., 1983).

Uma vez que a maior parte dos fármacos administrados oralmente são absorvidos no intestino delgado, a rapidez de esvaziamento gástrico é um factor importante na velocidade e extensão de absorção, sendo afectado pela maturidade gestacional, idade

pós-natal, efeito da postura, volume, osmolalidade e composição da alimentação. A velocidade de esvaziamento durante o período neonatal é menor do que a do adulto, com valores de 6 a 8 horas. Há autores que defendem uma ausência de peristaltismo gástrico durante os primeiros 2 a 4 dias de vida, atribuindo o esvaziamento gástrico ao aumento combinado do tónus, da contracção do antrum e da pressão hidrostática (Stewart e Hampton, 1987).

No que respeita à actividade enzimática gastrointestinal, o recém-nascido tem baixas concentrações de lipases, as quais, em conjugação com baixas concentrações intraluminais de ácidos biliares, levam a que fármacos lipófilos sejam insolúveis no estômago, e portanto com absorção reduzida. A baixa concentração intraluminal de ácido biliar (50% da do adulto) é consequência da reabsorção ineficaz de ácidos biliares no ileon, menor velocidade de síntese, tamanho da “pool” de ácidos biliares e maior permeabilidade destes no jejuno. Por outro lado, a actividade da α -glucoronidase no intestino, pode ser sete vezes superior à do adulto, o que tem consequências sobre os medicamentos submetidos a circulação enterohepática (Besunder, 1988; Kadima e Lesne, 1980; Stewart e Hampton, 1987; Watkins, 1973).

Pelo que foi exposto e ainda cientes dos riscos de aspiração e refluxo que apresenta a via oral ou entérica, devido à imaturidade do tracto gastrointestinal, à toxicidade associada a alguns medicamentos e aos múltiplos factores que imprimem uma grande variabilidade no comportamento das formas farmacêuticas orais ou entéricas, esta via será, mesmo assim, a que apresenta um melhor balanço benefício/risco para a administração de medicamentos em RN.

2. INDOMETACINA

2.1. Indometacina como fármaco de escolha no tratamento farmacológico do fecho do Canal Arterial

A Indometacina (IM), é um anti-inflamatório não esteróide (AINE), derivado do ácido indol-acético. O mecanismo de acção pelo qual actua abrange a inibição da síntese de todas as PGs, por bloqueio reversível da via mediada pelas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) (Barst e Gersony, 1989).

Caracterização físico-química da IM

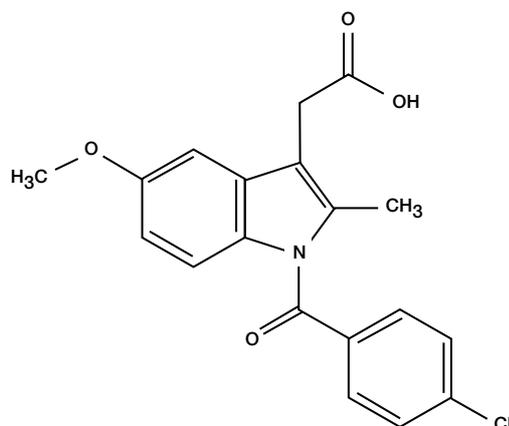


Figura 3. Estrutura química da IM - Ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-3-indolil] acético.

- ❖ A IM apresenta-se no estado sólido como um pó cristalino de cor amarela pálida e sem odor.
- ❖ É praticamente insolúvel em água (Forma I - 0,40mg/100ml a 25 °C) (O'Brien et al., 1984). É solúvel em etanol, éter, acetona e óleo de castor (O'Neil et al., 2001).
- ❖ Fórmula molecular - C₁₉H₁₆ClNO₄ (FP V).
- ❖ A pH alcalino ocorre decomposição da IM por hidrólise do grupo N-acil presente na molécula, passando a ácido 5-metoxi-2-metil-3-indol acético e ácido p-clorobenzóico com uma cinética de 1.^a ordem (Bakensfeld et al., 1990; Cipiciani et al., 1985; Krasowska, 1974; Li Wan Po et al., 1983; Tomida et al., 1988).
- ❖ Os cristais exibem polimorfismo (Borka, 1974; Borka e Haleblan, 1990; Lin, 1992; O'Brien et al., 1984).
- ❖ Os picos endotérmicos correspondentes ao ponto de fusão variam consoante o polimorfo (Borka, 1974; O'Brien et al., 1984):
 - Forma I (γ) com pontos de fusão descritos por vários autores a 160-161,5 °C e 158 °C;
 - Forma II (α) com pontos de fusão descritos por vários autores a 152 °C; 154 °C e 154,5-155,5 °C.
- ❖ Constante de ionização - pKa = 4,5 em solução aquosa (O'Brien et al., 1984).
- ❖ Absorvância máxima no UV (USP XX) por volta dos 319 nm em ácido clorídrico metanólico 0,1N (Figura 4). Este comprimento de onda foi utilizado para o doseamento espectrofotométrico (O'Brien et al., 1984).

- ❖ Peso molecular - 357,8 (FP v).
- ❖ Espectro de absorção no infravermelho - principais frequências vibracionais (O'Brien et al., 1984):
 - Elongação C-H (aromático) e O-H (ácido carboxílico) - 3400-2500 cm^{-1}
 - Elongação C=O - 1715 cm^{-1} ; 1695 cm^{-1}
 - Elongação C=C aromático - 1600 cm^{-1}
 - Deformação O-CH₃ - 1450 cm^{-1}
 - Elongação (C-O) e Deformação O-H - 1230 cm^{-1}
 - Deformação do O-H carboxílico fora do plano - 925 cm^{-1}
 - Deformação de vários C-H fora do plano por aromáticos substituídos - 900-600 cm^{-1}
 - C-Cl - 750 cm^{-1}
- ❖ Os difractogramas variam com o polimorfo (O'Brien et al., 1984) ocorrendo os maiores picos a diferentes valores de 2θ (THETA):
 - Forma I (γ) - 10,2; 11,6; 12,8; 16,7; 17,0; 17,3; 18,6; 19,3; 19,6; 20,3; 20,9; 21,8; 22,9; 23,2; 24,0; 25,5; 26,6; 27,5; 28,3; 28,9; 29,4; 30,4; 33,6; 34,2; 34,8; 37,5°.
 - Forma II (α) - 4,9; 6,9; 8,8; 10,2; 11,4; 11,9; 13,9; 14,2; 14,5; 14,7; 14,9; 16,1; 17,5; 18,0; 18,9; 19,0; 19,7; 20,2; 20,6; 21,1; 22,0; 22,6; 23,4; 24,0; 24,5; 24,9; 25,3; 26,3; 27,2; 28,4; 31,0°.

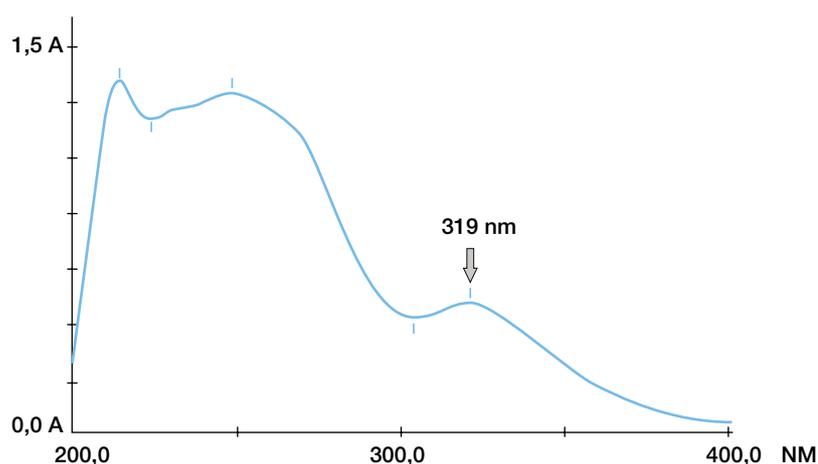


Figura 4. Espectro UV da IM em ácido clorídrico metanólico 0,1N, absorvância máxima a 319 nm (obtido experimentalmente).

Muitos compostos sólidos existem em diferentes modificações cristalinas chamados polimorfos. São compostos cristalinos com a mesma estrutura molecular que têm um arranjo diferente das moléculas, apresentam a mesma composição química, podem ter diferentes temperaturas de fusão, densidade, solubilidade, estabilidade química e física, velocidade de dissolução e biodisponibilidade (Bettinetti, 1988; Brittain, 1997 e 2002; Lin, 1992). O polimorfismo da IM tem sido muito investigado nos últimos anos. Foram primeiro descritas três formas polimórficas α (Forma I), β , e γ (Forma II), tendo posteriormente sido identificados outros polimorfos, a Forma III e IV entre outras, não havendo contudo consenso quanto à existência de todos os polimorfos descritos. No que respeita aos polimorfos Forma I e II, há dados consistentes de ponto de fusão, difractometria de raios-x e de infravermelhos que confirmam a sua existência (Borka, 1974; Lin, 1992; O'Brien et al., 1984).

As tentativas para aumentar a solubilidade da IM através da elevação do pH para valores alcalinos, têm sido infrutíferas, pois pode ocorrer decomposição do composto por hidrólise (Bakensfeld et al., 1990; Krasowska, 1974).

Tratamento farmacológico do fecho do canal arterial

A utilização da IM para o tratamento farmacológico do fecho do CA em RN foi descrita pela primeira vez em 1976 (Vert et al., 1980; Wiest et al., 1991). É hoje um dos fármacos de eleição aceite como efectivo e apropriado, induzindo o fecho do CA em mais de 80% dos RN prematuros, quando administrado por via intravenosa (IV) (Angerio e Kot, 1998; Archer, 1993; Baptista et al., 1999; Bhatt e Nahata, 1989; Grosfeld et al., 1996; Hammerman, 1995).

É controversa a relação entre a concentração sérica e o fecho do CA, devido à extrema variabilidade que se observa entre RN e ao facto da fisiopatologia desta situação clínica ter reflexos na biodisponibilidade dos fármacos (Gal e Gilman, 1993).

A biodisponibilidade da IM administrada por via oral em RN prematuros com CA, numa dose de 0,2 mg/kg, é caracterizada da seguinte forma:

- ❖ absorção oral - inferior de 15 a 20% da dose administrada;
- ❖ pico sérico - aproximadamente 400 ng/ml, 1 a 6 h após a primeira dose;
- ❖ volume de distribuição - 0,36 litros/kg;

- ❖ ligação às proteínas - 95 a 98%;
- ❖ depuração plasmática:
 - metabolismo hepático - a limitada actividade enzimática contribui para o aumento percentual de fármaco livre;
 - semi-vida plasmática - entre 11 a 20 horas;
 - excreção renal - diminuída.

A administração de 0,2 mg/kg por via oral, repetida até 3 administrações de 24 em 24h, contribuiu para o fecho do CA na proporção de 57%, nos grupos de doentes estudados (Habib, 1995; Vert et al., 1980; Yeh e Carr, 1991).

O protocolo terapêutico utilizado na prática clínica para o fecho farmacológico do CA em recém-nascidos, tendo em consideração a variabilidade referida, é de 0,2 mg de IM por quilograma de peso, administrada de 24 em 24h durante três dias consecutivos por via intravenosa, para alcançar a concentração sérica de 0,37 µg/ml, que permite o fecho do CA (Renfro et al., 1993; Romagnoli, 1997 ; Yeh e Carr, 1991).

2.2. Toxicidade da Indometacina

2.2.1. Gastrointestinal

2.2.1.1. Mecanismo de ulceração gástrica dos Anti-inflamatórios

não Esteróides

Existem duas características fundamentais que determinam a ulcerogenicidade dos AINEs:

- ❖ A cinética de absorção gastrointestinal dos fármacos
- ❖ O facto de exibirem um ataque múltiplo a alguns ou a todos os mecanismos de defesa da mucosa.

O grau de ulcerogenicidade depende destes mecanismos de defesa da mucosa celular ou dos processos bioquímicos afectados e da potência do efeito dos fármacos nesses processos. Para que um fármaco exerça efeito ulcerogénico, deve estar presente nas células da mucosa em concentração e tempo de permanência suficientes para desencadear os mecanismos de toxicidade (Erden e Çelebi, 1988; Liversidge et al., 1989; Menguy e Desbaillets, 1967; Rainsford, 1990; Somasundaram et al., 1997). Em geral, quando

os AINEs são administrados por via oral são atingidas grandes concentrações nas células da mucosa gástrica. Quando a administração é parentérica, alguns AINEs que sofrem recirculação entero-hepática, podem produzir lesões da mucosa ou úlceras.

A IM, sendo um AINE, tem capacidade de induzir toxicidade gastrointestinal. O mecanismo responsável pela ulceração induzida pela IM não é claro (Bulbena et al., 1993; Lugea et al., 1993; Mahmud et al., 1998; Parent, 1991; Rainsford, 1990; Somasundaram et al., 1997), contudo, várias têm sido as explicações propostas.

Na Figura 5 apresenta-se um esquema dos mecanismos que poderão estar envolvidos no processo de lesão gastrointestinal, com base nas teorias maioritariamente aceites pelos autores referenciados.

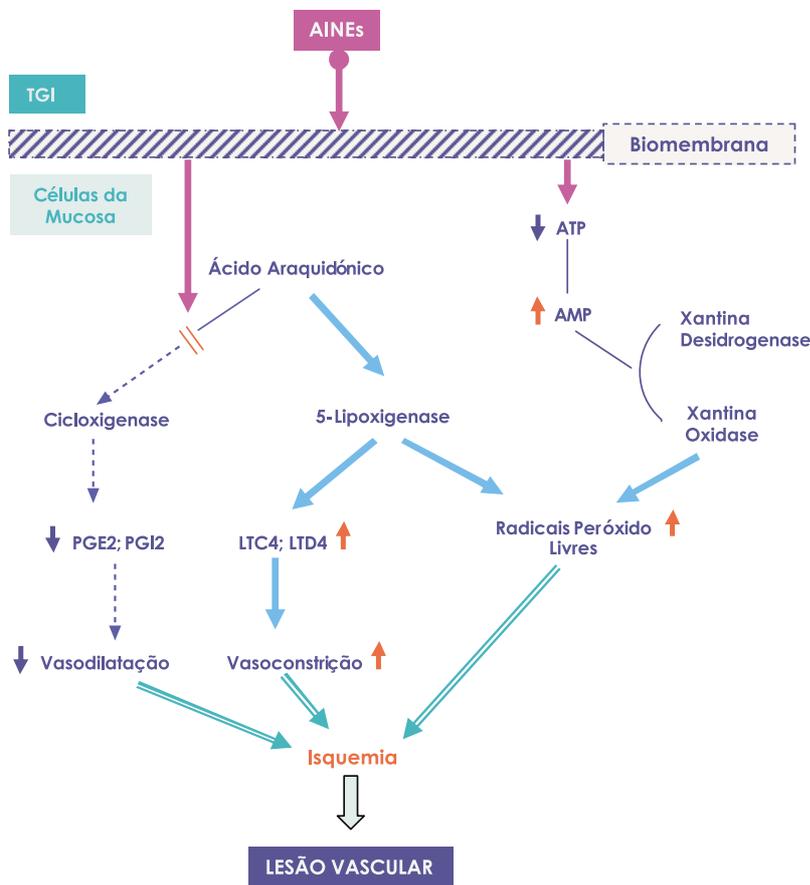


Figura 5. Mecanismo de indução de toxicidade da Indometacina. **AINEs** = anti-inflamatório não esteróide. **LTC4, LTD4** - peptidoleucotrienos. (Adaptado de Rainsford, 1990).

Os primeiros episódios conducentes à indução da lesão incluem uma fase de contacto concomitante com a inibição das cicloxigenases (COX-1 e COX-2) nas células da mucosa, causando uma redução das PGs vasodilatadoras (PGE₂ e PGI₂) e induzindo

o ácido araquidónico a produzir, por um lado, através da via da lipoxigenase, excesso de peptidoleucotrienos (LTC₄ e LTD₄), que são potentes vasoconstritores e, por outro lado, a gerar radicais peróxido livres, resultantes da clivagem peroxidativa de ácidos hidroxieicosatetranóicos.

Os AINEs também inibem a produção de trifosfato de adenosina (ATP) nas células da mucosa, elevando assim o monofosfato de adenosina (AMP) que activa a forma desidrogenase da xantina, passando esta à forma oxidase e gerando mais radicais superóxido. Este processo conduz também à inibição ou diminuição da produção de muco e a alterações da sua composição em hidratos de carbono.

A diminuição da vasodilatação, o aumento da vasoconstrição e da quantidade de radicais livres de oxigénio, promove o desenvolvimento de isquemia e consequente lesão vascular.

A fase seguinte é constituída por episódios resultantes da conjugação de vários factores, que contribuem para o desenvolvimento da inflamação e da ulceração. O condicionamento destes factores, que são parte integrante dos mecanismos de protecção da mucosa, tais como a permeabilidade intestinal, o conteúdo luminal, os neutrófilos e a microcirculação, poderão estar igualmente na origem da lesão gastrointestinal (Rainsford, 1990; Somasundaram et al., 1997).

O comportamento farmacocinético da IM possibilita a existência de três vias possíveis pelas quais pode entrar em contacto com a mucosa do tracto gastrointestinal (TGI) (Mahmud et al., 1998; Somasundaram et al., 1997):

- ❖ *Fase tópica*: após ingestão ao nível gástrico e durante a absorção no intestino delgado e no intestino grosso;
- ❖ *Via sistémica*: ocorre à medida que o fármaco entra no compartimento vascular e se distribui pelo organismo, podendo atingir as células apicais da mucosa gástrica;
- ❖ *Excreção através da via biliar*: torna a expor o intestino delgado e o estômago a uma fase de contacto, por refluxo do conteúdo duodenal (Somasundaram et al., 1997).

2.2.1.2. Toxicidade gastrointestinal em Recém-nascidos

As características físico-químicas da IM, a reduzida absorção oral e a toxicidade gastrointestinal, fazem com que a forma farmacêutica injectável seja a única disponível para esta finalidade terapêutica com acção farmacológica efectiva (Coombs et al., 1990; Habib, 1995).

A toxicidade gastrointestinal observada com a via intravenosa, intramuscular, oral e rectal, inclui, entre as situações mais graves, a ocorrência de ulceração, hemorragia intestinal, perfuração e enterocolite necrosante. Em todo este complexo processo que leva ao aparecimento de toxicidade, deve ainda considerar-se que os efeitos vasculares sistémicos da IM poderão causar vasoconstrição das veias intestinais, originando uma situação de isquemia com evidência de desenvolvimento de enterocolite necrosante, a qual é um factor de risco adicional em RN cujo CA não fechou (Coombs et al., 1990; Grosfeld et al., 1996; Krasna e Lee, 1993).

2.2.2. Hematológica

Estudos em modelos animais com ratos Wistar e em modelos humanos evidenciam que a IM, em concentrações atingidas com uma única dose terapêutica, tem capacidade de alterar a função dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) por inibição da motilidade e da actividade quimiotáctica nos exsudatos inflamatórios, possivelmente devido à diminuição dos níveis de PGs (Kamran, 1993).

A IM pode também interferir com a agregação plaquetária alterando a hemostase, podendo induzir hemorragias gástricas, estando descritos efeitos graves de coagulação em RN prematuros (Biscarini, 2000a; Fowlie, 1996).

2.2.3. Renal

O fluxo sanguíneo renal é regulado por processos que envolvem PGs, substâncias vasodilatadoras e agentes protectores do fluxo sanguíneo renal e da velocidade de filtração glomerular, que funcionam em oposição aos vasoconstritores, tais como catecolaminas, angiotensina II, vasopressina e endotelina.

A inibição das PGs pelos AINEs pode provocar lesão renal, originando insuficiência aguda (com ou sem oligúria), insuficiência crónica, proteinúria clinicamente relevante, alterações do metabolismo dos fluidos ou hipercaliemia. Observa-se um aumento da resistência vascular, uma redução do fluxo sanguíneo e da velocidade de filtração glomerular. O aumento da vasopressina induz retenção hídrica e hiponatremia, cujas consequências mais comuns são a oligúria, hipercreatininemia, hiperazotemia, redução da depuração de água livre e um aumento da fracção excretada de sódio e potássio, com consequente desenvolvimento de insuficiência renal.

Os efeitos nefrotóxicos dos AINEs estão relacionados com a inibição da COX-1 e COX-2, enzimas essenciais para a morfogenese e maturação renal normal. A COX-1 é uma enzima constitucional presente em muitos tecidos, incluindo os rins, tendo a COX-2 sido recentemente identificada também como enzima constitutiva deste órgão.

A IM raramente induz nefrotoxicidade em doentes com a função renal normal, mas pode agravar situações de disfunção pré-existentes. Em RN, a IM pode causar nefrotoxicidade, devido quer à imaturidade do rim, quer ao mecanismo de acção do fármaco (Biscarini, 2000b; Brion e Campbell, 1999; Chamaa et al., 2000; Cuzzolin et al., 2001; Dinchuk, et al., 1995; Flowlie, 1996; Ojala et al., 2001; Pezzati et al., 1999; Romagnoli et al., 1997).

2.2.4. Hepática

O mecanismo pelo qual os fármacos ou os seus metabolitos causam morte celular, pode processar-se de duas maneiras: os metabolitos reactivos rompem o balanço dos factores que favorecem a sobrevivência, levando a perda directa da viabilidade, ou modificam este balanço de modo a tornar as células hepáticas susceptíveis aos efeitos letais do sistema imunitário intrínseco, isto é, citocinas, tais como o factor de necrose tumoral (TNF), produzidas por activação de células inflamatórias residentes no fígado.

O resultado pode variar entre a manutenção da viabilidade e a apoptose ou necrose, dependendo do fármaco, do grau de exposição aos metabolitos reactivos e de uma variedade de factores genéticos e ambientais que modulam o metabolismo dos fármacos, os mecanismos de transporte, defesa e regeneração, e ainda da presença de citocinas e de genes conducentes à sobrevivência ou à morte (Kaplowitz, 2000 e 2002).

A IM está associada a lesão colestática reversível, alterações transitórias das enzimas hepáticas e a casos fatais de necrose hepatocelular aguda e de esteatose. A incidência de lesões é baixa, e a informação é insuficiente para explicar o mecanismo de indução de lesão citolítica e de esteatose. Os registos de lesão são principalmente hepatocelulares, necrose massiva ou central, acompanhada em alguns casos de esteatose microvascular, colestase relevante e biliverdinemia (Biscarini, 2000a; Cappell et al., 1988; Shivakumar e Jacob, 2002; Zimmerman, 1999a e 1999b).

3. CICLODEXTRINAS

3.1. Caracterização geral de ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são um grupo de sacarídeos estruturalmente relacionados, que são produzidos pela ciclização enzimática do amido, catalizada pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, formando uma espiral helicoidal de unidades de glucose unidas por ligações α -(1,4) (Biwer et al., 1988; Szejtli, 1988). Devido à falta de rotação livre à volta das pontes de ligação das unidades de glucose, as CDs não são moléculas cilíndricas, tomando a forma de cone truncado (Figura 6).

Em consequência da conformação em cadeia das unidades de glucopirranose, todos os grupos hidroxilo estão orientados para o exterior da molécula, com os grupos hidroxilo primários localizados no lado mais estreito e os secundários no lado mais largo da estrutura, conferindo um carácter hidrófilo (Loftson e Brewster, 1996).

A cavidade apresenta características hidrófobas devido ao carácter apolar determinado pelos dois anéis dos grupos C-H e pelo anel de átomos de oxigénio incluídos nas ligações glicosídicas. Esta estrutura molecular invulgar confere às CDs propriedades únicas.

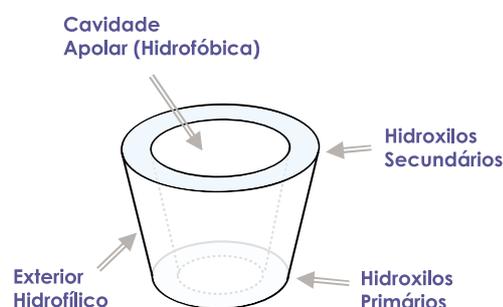


Figura 6. Forma de cone truncado das CDs e localização dos grupos hidroxilo primários e secundários (Adaptado de Hirayama e Uekama, 1999; Loftson e Olafsson, 1998; Szejtli, 1990; Thompson, 1997).

As CDs naturais mais comuns são a α -ciclodextrina (ciclomaltohexanose), β -ciclodextrina (ciclomaltoheptanose) e γ -ciclodextrina (ciclomalto-octanose), contendo respectivamente 6, 7 e 8 unidades α -1,4 de glucopirranose ligadas. Destes três derivados, a β -ciclodextrina (β -CD) parece ser a mais vantajosa para utilização farmacêutica como agente complexante, devido, entre outras propriedades, ao tamanho da sua cavidade, disponibilidade e baixo custo.

Têm sido isoladas CDs contendo mais de oito unidades: ciclomaltononaose (**d**-CD) com nove, ciclomaltodecaose (ϵ -CD) com dez, ciclomaltoundecaose (**x**-CD) com onze, ciclomaltododecaose (**h**-CD) com doze e ciclomaltotridecaose (**q**-CD) com treze (Bodor et al., 1995). Contudo, as suas capacidades complexantes e de solubilidade são geralmente mais baixas do que as da β -CD e γ -CD, sendo portanto de menor interesse farmacêutico (Loftsson e Brewster, 1997; Loftsson e Olafsson, 1998).

As CDs naturais α -CD, β -CD e γ -CD têm uma solubilidade em água limitada: 14,5%, 1,85% e 23,2% (m/v a 25 °C), respectivamente. Em solução aquosa, a cavidade apolar destas CDs contém moléculas de água (6, 11 e 17), as quais podem ser substituídas por outras que, em solução, sejam apolares ou menos polares que a água e possuam o tamanho adequado para se adaptarem ao seu interior.

O tamanho da cavidade na parte mais larga, para entrada da molécula hóspede varia de 4,7 a 5,3 Å, 6,0 a 6,5 Å e 7,5 a 8,3 Å, respectivamente para a CD α , β e γ (Figura 7) (Cabral-Marques e Moraes, 1991; Szejtli, 1990; Thompson, 1997).

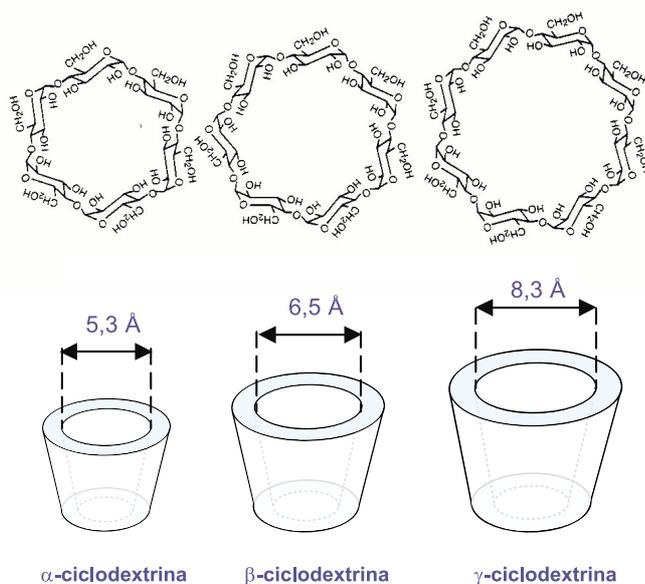


Figura 7. Estrutura molecular e dimensões da cavidade das CDs α , β e γ . (Adaptado de Biwer et al., 2002; Szejtli, 1990).

Para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas das CDs naturais, podem ser utilizadas várias técnicas, entre as quais o recurso a ajustamentos de pH apropriados ao aumento do efeito de complexação, a adição de polímeros solúveis em água, tais como a polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetilcelulose com o objectivo de aumentar a constante aparente de estabilidade e ainda a substituição química de qualquer dos hidrogénios que formam os grupos hidroxilo, originando derivados mais solúveis e de menor toxicidade (Redenti et al., 2000).

O pH tem capacidade de influenciar a complexação na medida em que condiciona o estado de ionização das moléculas. No caso das moléculas serem ionizáveis verifica-se a existência de um equilíbrio entre a complexação da forma ionizada e da não ionizada, tal como representado na Figura 8:

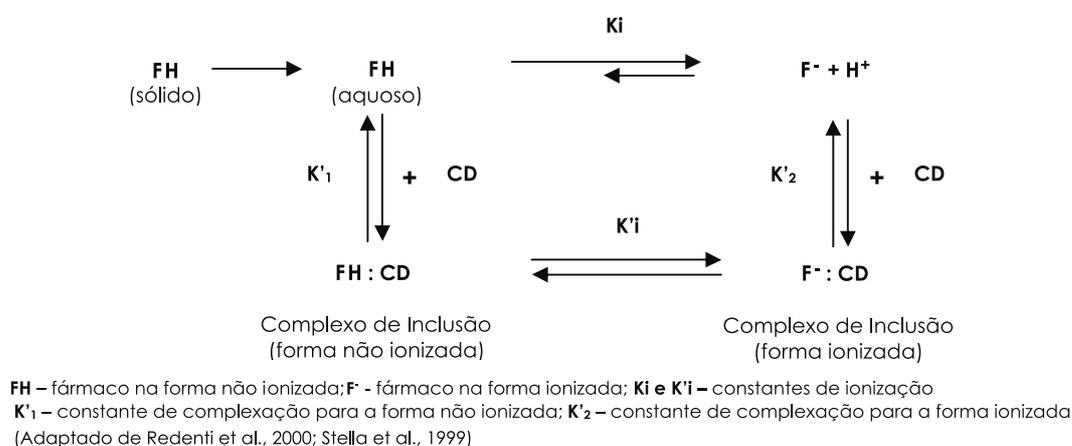


Figura 8. Modelo cinético do equilíbrio entre o complexo de inclusão da forma ionizada e o da forma não ionizada.

Para muitas moléculas, a forma ionizada tem menor capacidade de complexação com as CDs, especialmente quando ligada a CDs neutras, originando complexos menos estáveis (Stella et al., 1999). Esta diminuição da estabilidade pode ser atribuída a um aumento global da hidrofília do fármaco após ionização, o que reduz a sua interacção com a cavidade mais hidrofóbica da CD. Deste modo, condições que favoreçam a ionização dos fármacos aumentarão a fracção não complexada em solução, sendo assim possível que as condições do meio em que se encontra o complexo de CD, possam favorecer a sua dissociação devido a uma diminuição da constante de ionização, à medida que o complexo fica exposto a um pH que possa influenciar o estado de ionização quer do fármaco, quer da CD (Backensfeld et al., 1991; Buri, 1981; Stella et al., 1999). Verifica-se, contudo, que a solubilidade total conseguida pode ser significativamente aumentada,

uma vez que corresponde à soma de todas as formas em solução ($FH + F^- + FH:CD + F^-:CD$) (Redenti et al., 2000).

No que respeita ao uso dos derivados químicos das CDs, a sua ramificação pode ser obtida por reacção com glucose ou maltose na presença de enzimas como a isoamilase. Outros derivados comuns das CDs são obtidos por ligação de diversos grupos funcionais aos grupos hidroxilo primários e/ou secundários, por alquilação (i.e. metil e etil) ou hidroxialquilação (i.e. hidroxipropil e hidroxietil). A obtenção de derivados transforma frequentemente as CDs cristalinas, em misturas amorfas de derivados isoméricos, sendo, portanto, a solubilidade na água usualmente muito maior (Pitha et al., 1986). Cada unidade de glucose contém dois álcoois secundários em C2 e C3 e um álcool primário na posição C6 (Figura 9), providenciando 18 a 24 locais para modificação química (Jones et al., 1984; Mosher e Thompson, 2002).

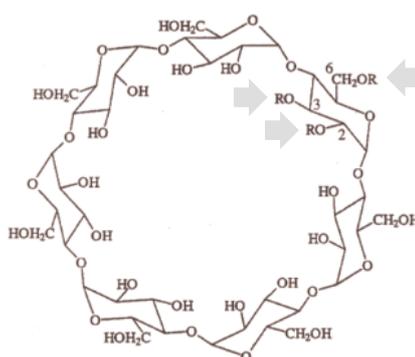


Figura 9. Estrutura molecular da **b**-CD. As setas indicam os grupos hidroxilo 2, 3 e 6, onde ocorrem as substituições para a obtenção de derivados químicos das ciclodextrinas naturais, substituindo todos os grupos hidroxilo por radicais (R), que, no caso da HP-**b**-CD, são hidroxipropil. (Adaptado de Hirayama e Uekama, 1999; Kaukonen et al., 1998; Mosher e Thompson, 2002; Thompson, 1997).

A nomenclatura das CDs deve incluir no mínimo a indicação de qual a CD (α , β ou γ), o tipo e o número de substituintes. Estes são usualmente referenciados por uma abreviatura colocada antes da CD, podendo ser incluída na abreviatura uma descrição mais pormenorizada dos grupos substituintes. Por exemplo, o grupo hidroxilo no substituinte hidroxipropil pode existir num dos três carbonos da cadeia propil. Esta posição isomérica é referenciada por um número precedendo a abreviatura do substituinte. A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) mais comum é a (2HP)- β -CD, a qual é normalmente conhecida como HP- β -CD.

O grau de substituição molar (SM), pode ser representado por um número a seguir à abreviatura do substituinte, e indica o número médio de substituintes da molécula, arredondado para o número inteiro mais próximo, sendo assim uma declaração do rácio molar de substituintes para a CD, não fornecendo contudo qualquer indicação da posição desses substituintes na unidade glucopirranose. O grau de SM pode influenciar as propriedades da molécula, sendo de um modo geral preferível um grau de substituição menor, dado que proporciona melhores capacidades de complexação. No caso da 2-HP- β -CD, os radicais 2-hidroxipropil substituintes (-O-CH₂-CHOH-CH₃), são randomizadamente distribuídos em todas as três posições das sete unidades de glucopirranose (Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Mosher e Thompson, 2002; Yoshida et al., 1988).

A hidroxialquilação ocorre, assim, de um modo não selectivo em muitos hidroxilos das moléculas de CD, consistindo deste modo numa mistura amorfa de compostos relacionados, com diferentes graus de substituição. O carácter multicomponente de tais derivados, não só evita a sua cristalização pela água, como também converte fármacos cristalinos num estado sólido amorfo, através da complexação por inclusão (Müller e Brauns, 1986; Uekama e Irie, 1990). A substituição química dos hidroxilos da CD natural tem impacto nos requisitos estereoquímicos de uma molécula hóspede. Em alguns casos a entrada pode ser bloqueada, mas, noutros casos, dependendo do número, flexibilidade e posição da ligação podem efectivamente actuar para alargar a cavidade e providenciar uma melhor complexação. A substituição na posição 3 e 6 será mais provável que estreite a abertura da cavidade, do que na posição 2 e 6, a qual pode permitir uma extensão desta (Bodor et al., 1995; Thompson, 1997).

No caso do substituinte hidroxipropil, apesar do seu tamanho, parece requerer um grau de substituição molar menor, para melhorar a ligação sem obstruir estereoquimicamente a entrada da cavidade. Os estudos do efeito do grau SM na capacidade de complexação evidenciaram que um grau mais baixo de substituição (2 a 5) favorece, de um modo geral, a complexação (Müller e Brauns, 1986). Este grau de substituição confere no estado sólido características físicas amorfas e uma solubilidade na água que pode exceder os 50% p/v (Cabral-Marques, 1994d; Hirayama e Uekama, 1999; Pitha et al., 1990; Szente e Szejtli, 1999; Thompson, 1997). Verifica-se, contudo, que para alguns fármacos um grau de SM maior aumenta a capacidade de solubilização, como foi demonstrado por Müller e Brauns (1986), para a Indometacina. Estes resultados levam a considerar que, para cada fármaco, devem ser utilizadas CDs com um grau de SM apropriado. A hidroxipropil- β -ciclodextrina representa um dos derivados com maior utilização terapêutica, sendo produzida à escala industrial (Nash, 2000).

3.2. Complexos de inclusão com ciclodextrinas

3.2.1. Mecanismo de complexação. Consequências e limitações

As CDs são capazes de formar complexos de inclusão com muitos fármacos, com tamanho e forma apropriados, encapsulando total ou parcialmente as moléculas-hóspedes. A cavidade das CDs tem afinidade preferencial para a forma neutra de um determinado substrato, sendo capazes de complexar e solubilizar compostos não polares. A complexação pode ser condicionada, entre outros factores, pela composição do esqueleto do composto, pela fraca solubilidade em água (inferior a 10 mg/ml), pelo estado de ionização, pela temperatura e solventes utilizados, por um ponto de fusão inferior a 250 °C (um ponto de fusão superior significa que as forças coesivas entre as moléculas são muito fortes) e por um peso molecular compreendido entre 100 e 400 Daltons. Contudo, pode ocorrer a formação de complexos com moléculas muito grandes, desde que contenham cadeias laterais apropriadas para inclusão parcial, originando compostos com solubilidade e estabilidade modificadas (Szjetli, 1991b; Thompson, 1997).

Os mecanismos pelos quais se processa a formação de complexos de inclusão são diversos, contudo todos têm em comum o facto de não ocorrer formação nem quebra de ligações covalentes. A principal força de ligação para a formação de complexo pensa-se que seja a libertação de entalpia das moléculas de água da cavidade das CDs, uma vez que estas não conseguem satisfazer a sua necessidade de ligação aos potenciais de hidrogénio, tendo portanto uma elevada entalpia. A energia do sistema diminui quando estas moléculas são substituídas por moléculas-hóspedes, que são menos polares do que a água. O facto de não se formarem ligações covalentes entre a CD e as moléculas-hóspedes, faz com que os complexos em condições fisiológicas, sejam facilmente dissociáveis (Cabral-Marques, 1994a). Na formação do complexo podem também participar a libertação de forças do anel, interacções van der Waals, ligações de hidrogénio, interacções hidrofóbicas e alterações na tensão de superfície do solvente (Loftsson e Olafsson, 1998).

Em solução aquosa, os complexos dissociam-se, encontrando-se em equilíbrio as moléculas livres com as moléculas ligadas na cavidade da CD. Este é um processo dinâmico no qual a molécula-hóspede se associa e dissocia constantemente da molécula-hospedeira. Nesta conformidade, o complexo será constituído por uma família de

espécies em proporções médias variáveis, sendo a espécie de complexo, a que apresenta maior tempo de existência (Loftson e Brewster, 1996; Stella et al., 1999; Szejtli, 1991a). Considerando a complexação com estequiometria de 1:1, as espécies encontram-se na forma de equilíbrio representado no esquema da Figura 10:

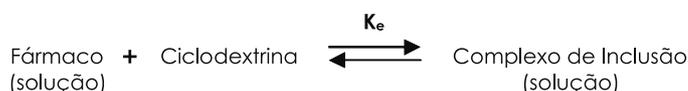


Figura 10. Equilíbrio estabelecido entre as formas de fármaco não complexada e complexada.

A encapsulação de uma molécula de fármaco lipofílico, insolúvel em água, poderá afectar muitas das suas propriedades físico-químicas e mecânicas, aumentando por exemplo a solubilidade aquosa, a velocidade de dissolução e a estabilidade química do fármaco, sem afectar a estrutura química ou a actividade farmacológica intrínseca, podendo esta ser potenciada pelo aumento da sua disponibilidade no local de acção (Backensfeld et al., 1990 e 1991; Loftsson e Olafsson, 1998; Redenti et al., 2000).

O efeito protector conferido pela complexação está dependente da constante de estabilidade (K_e) de formação do complexo de inclusão, devido ao permanente equilíbrio entre as moléculas livres de fármaco-hóspede, as de CD e as moléculas de complexo (Liversidge et al., 1989).

Os principais factores que afectam a extensão e o grau de complexação incluem o tamanho e a geometria da molécula-hóspede, a energia conformacional, a força das interacções van der Waals e de outras forças electrostáticas. Adicionalmente a solubilidade relativa da molécula-hóspede no ambiente circundante, e a solubilidade do complexo, contribuem para definir o equilíbrio final. A temperatura, o pH e outras moléculas-hóspedes competidoras, podem também afectar o equilíbrio (Cabral Marques, 1994b).

A extensão da complexação em meio aquoso, ou seja, a estabilidade do complexo formado, é caracterizada pela constante de estabilidade, também chamada de associação (K_a) ou dissociação (K_D), e depende de como a molécula-hóspede (F) se encaixa na cavidade da CD. A razão entre a constante de velocidade de recombinação (K_R) e a constante de velocidade de dissociação, traduz a magnitude da estabilidade do complexo, $K_e = K_{a:b} = K_R / K_D = F_a CD_b / [F]^a \times [CD]^b$, em que a:b representam o rácio molar de F incluído na CD. Quanto maior esta razão, maior é a estabilidade do complexo (Cabral-Marques, 1994a; Stella et al., 1999; Veiga, 1996).

A magnitude desta constante de associação pode assim ser usada para comparar a efectividade da ligação a diferentes CDs. Vários complexos com diferentes rácios de F:CD podem ser formulados, estando dependentes do tipo de CD usada e das características físico-químicas da molécula de fármaco. Em soluções diluídas, e/ou se o fármaco cabe totalmente na cavidade da CD, resulta um complexo com um rácio 1:1. Contudo, se a cavidade é suficientemente larga, podem ser acomodadas duas moléculas de F, originando um complexo com um rácio 2:1. Pelo contrário, se é a molécula de F que é muito grande, então duas ou várias moléculas de CD podem encapsular partes da estrutura molecular de F e formar um complexo com um rácio molar de 2:1 ou com uma ordem superior. Apesar de cada complexo ter uma estequiometria finita, pode ser formado mais do que um tipo de complexo num determinado sistema. Dependendo do método usado para determinar a K_e , é possível obter a descrição da estequiometria do complexo (a:b) (Mosher e Thompson, 2002).

Os complexos de inclusão de fármacos pouco solúveis em água, com CDs hidroxialquiladas apresentam uma maior solubilidade em água, uma maior velocidade de dissolução e uma absorção mais eficiente a partir da administração oral ou sublingual (Mosher e Thompson, 2002; Uekama e Irie, 1990; Yioshida et al., 1988).

A K_e pode ser um factor limitante por condicionar a libertação e absorção e deve ser tida em consideração de acordo com a via de administração que se pretende utilizar. Complexos muito lábeis podem resultar numa libertação prematura do fármaco, devido à fraca interacção, e complexos muito estáveis originarem um retardamento ou uma libertação incompleta do fármaco, comprometendo a absorção. A libertação do fármaco é condicionada por vários tipos de factores, tais como a diluição do complexo, o deslocamento competitivo do fármaco por outro tipo de moléculas, a ligação do fármaco aos componentes do plasma e dos tecidos, a captação do fármaco pelos tecidos, a eliminação da ciclodextrina, e possíveis variações de pH e temperatura (Stella et al., 1999).

No que respeita ao valor óptimo de K_e para que o complexo tenha utilidade terapêutica, não foi encontrado consenso na bibliografia consultada. Há autores que consideram que só valores de K_e situados entre 200 e 5000 M^{-1} têm utilidade prática, enquanto que outros consideram uma margem de valores compreendida entre 100 e 1000 M^{-1} , ou mesmo inferiores, 7 a 100 M^{-1} . Outros há que relatam a obtenção de complexos com valores de K_e muito mais elevados, 19000, 55000 ou 84000 M^{-1} e que,

mesmo assim, conferem melhoria das propriedades físico-químicas aos fármacos incluídos (Cabral-Marques, 1994a; Stella et al., 1999; Thompson, 1997; Veiga 1996).

A acção e toxicidade do complexo de inclusão nas condições "in vivo" e o comportamento do produto obtido, tal como o perfil de dissolução, podem constituir factores limitantes do seu uso.

A dose de fármaco necessária para se obter efeito terapêutico em relação com o peso molecular e a estequiometria do complexo, podem também ser factores que limitam a aplicabilidade de complexos de inclusão destinados a administração oral. Assim, quando a dose a administrar é elevada, o que requer grandes quantidades de complexo, pode condicionar aspectos de segurança e custo de produção (Cabral-Marques, 1994b; Redenti et al., 2000).

3.2.2. Métodos de preparação de complexos de inclusão

Existem vários métodos para a obtenção de complexos de inclusão. A selecção do método mais apropriado deve ter em consideração a performance do produto obtido, a facilidade de execução do método, o custo, a rentabilidade, a rapidez e a possibilidade de produção em larga escala (Veiga et al., 2001).

Os complexos de inclusão podem ser preparados em fase líquida por métodos de coprecipitação, neutralização, liofilização e secagem por pulverização, em fase semi-sólida por malaxagem e em fase sólida por moagem.

Em solução, os complexos são usualmente preparados pela adição de uma quantidade de fármaco (F) em excesso a uma solução aquosa de CD. A suspensão formada é equilibrada, por períodos até uma semana, à temperatura ambiente e filtrada ou centrifugada para formar uma solução límpida de complexo F:CD.

A preparação de complexos sólidos, a partir das soluções aquosas de F:CD, pode ser efectuada removendo a água através de evaporação ou sublimação, por exemplo por secagem por pulverização ou por liofilização (Cabral-Marques, 1994c; Duchêne e Wouessidjewe, 1990c; Loftson e Brewster, 1997; Pikal, 2002; Veiga, 1996).

A selecção dos métodos de complexação para a realização deste trabalho fundamentou-se nas considerações anteriores e nos diversos tipos de processos

existentes, bem como na análise dos resultados do estudo de solubilidade de fases. Foram preparados complexos em fase líquida, tendo sido usados dois processos de secagem, a liofilização e a secagem por pulverização, para a sua obtenção no estado sólido. Ambos os métodos são adequados para fármacos fracamente solúveis em água e para sistemas com um diagrama de solubilidade de fases tipo A, formando complexos de inclusão solúveis.

3.2.2.1. Liofilização

Este método consiste na preparação, à temperatura ambiente, da solução com quantidades estequiométricas de molécula-hóspede e CD. No caso da molécula-hóspede ser ácida, utiliza-se a amónia para conseguir a solubilização total, porque, sendo uma base volátil, é eliminada com o vácuo aplicado neste processo, devendo ser verificada posteriormente a sua ausência. A solução é então liofilizada, podendo o produto obtido ser ou não lavado com éter dietílico, após o que é seco em estufa de vácuo. O método de liofilização apresenta elevado rendimento, pode ser utilizado à escala industrial e leva à obtenção de um composto amorfo (Duchêne et al., 1989; Esclusa-Diaz et al., 1994; Fujioka et al., 1983; Kurosumi et al., 1975; Pikal, 2002; Szejtli e Szente, 1981; Vromans e Schalks, 1994).

Segundo alguns autores, no produto final não é possível distinguir um verdadeiro complexo de inclusão obtido por este processo, dado que o método de liofilização pode, por si só, contribuir para a passagem do fármaco ao estado amorfo (Duchêne e Wouessidjewe, 1990c).

3.2.2.2. Secagem por pulverização

Neste método mistura-se a quente e sob forte agitação, uma solução aquosa de CD com uma solução da molécula-hóspede em solvente apropriado. A solução final é pulverizada em equipamento adequado, ocorrendo a evaporação súbita do solvente (Esclusa-Diaz et al., 1994; Moyano et al., 1994). Com o método de secagem por pulverização obtém-se igualmente um composto no estado amorfo. É um processo com um rendimento mais baixo, que apresenta como vantagem a obtenção de micropartículas que conferem ao pó uma maior porosidade e escoamento, o que, tendo em vista a forma farmacêutica final, poderá ser um factor importante na selecção do método de produção.

Lin e Kao (1989) efectuaram o estudo do efeito deste processo de complexação em algumas características físicas da IM e obtiveram como resultado uma diminuição do diâmetro das partículas de 10,7 μm para 6,3 μm , observada por microscopia electrónica de varrimento e um aumento do ângulo de repouso de 49,7 para 55,8, o que implica uma maior porosidade e um fraco escoamento.

Alguns autores consideram que este método não é aplicável a substâncias termolábeis. Há no entanto estudos (Giunchedi e Conte, 1995) que afirmam ser adequado, uma vez que a rápida evaporação do solvente permite que a temperatura das gotículas possa ser mantida muito abaixo da temperatura de secagem do ar.

3.2.3. Métodos de detecção da formação de complexos

A interacção entre a molécula hóspede e a CD deve ser estudada por diversos métodos, quer no estado sólido, quer no estado líquido, de modo a confirmar a formação de complexo e não a ocorrência de uma simples mistura de moléculas-hóspedes com moléculas de CD. É necessária a comprovação da inclusão em estados diferentes, dado que a formação de complexo no estado líquido não garante necessariamente a existência do mesmo complexo no estado sólido.

3.2.3.1. Métodos de detecção no estado líquido

3.2.3.1.1. Método de solubilidade de fases

O método de solubilidade de fases, descrito em 1965 por Higuchi e Connors, é o processo mais correntemente usado para a identificação de formação de complexos de inclusão, a partir da análise do diagrama de solubilidade de fases e fundamenta-se nas alterações de solubilidade da molécula-hóspede por adição de quantidades crescentes de ciclodextrina.

Para estabelecer tais diagramas, uma quantidade em excesso da molécula-hóspede é adicionada a soluções aquosas de ciclodextrina com concentrações crescentes e agitada a temperatura constante. Quando se atinge o estado de equilíbrio, é determinada a concentração da molécula-hóspede nas várias soluções. Estes valores são representados graficamente em função das concentrações de ciclodextrina (Figura 11).

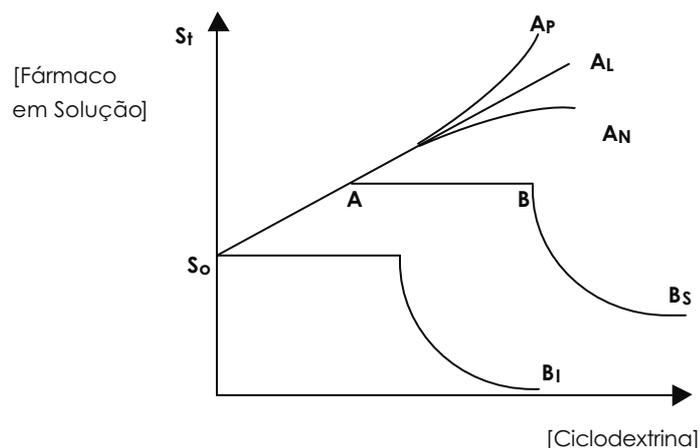


Figura 11. Diagrama de solubilidade de fases. **S** = substrato ou fármaco; **S_t** = concentração molar total de substrato dissolvido; **S₀** = solubilidade de equilíbrio do substrato na ausência de ciclodextrina; **A_P**, **A_L**, **A_N**, **B_S**, **B_I** = tipos de diagramas. (Adaptado de Higuchi e Connors, 1965; Mosher e Thompson, 2002; Thompson, 1997).

Os diagramas de solubilidade de fases estão dependentes do modelo de equilíbrio que se estabelece durante a formação de um complexo de inclusão e apresentam dois tipos principais, A e B, e alguns subtipos.

A premissa de que se parte é a de que, aumentos acima de certo nível na solubilidade nestes sistemas são devidos a uma ou mais interações entre o substrato e a ciclodextrina, para formar espécies quimicamente distintas, as quais podem ser chamadas complexos (Highichi e Connors, 1965).

Assim sendo, os diagramas do tipo A indicam a formação de complexos solúveis, aumentando portanto a quantidade total de substrato na solução. Neste tipo de diagrama podem ser observados vários comportamentos (Highichi e Connors, 1965):

- ❖ O tipo **A_L** é característico de um complexo de inclusão solúvel, com aumento linear de solubilidade e formação de complexos de composição constante. Isto significa que todos os compostos formados são de primeira ordem em relação à CD, ou seja, **S:CD**; **S₂:CD**; **S₃:CD**, ..., **S_n:CD**.
- ❖ O tipo **A_P** é característico da formação de complexos de ordem molecular maior, significando que uma molécula-hóspede é complexada com mais do que uma molécula de ciclodextrina, **S:CD₂**; **S:CD₃**, ..., **S:CD_n**.

- ❖ O tipo A_N pode estar associado a uma alteração na natureza efectiva do solvente na presença de grandes concentrações de ciclodextrina, levando a uma modificação da constante de formação do complexo. Outra possibilidade é a associação de moléculas de ciclodextrina quando em grande concentração, podendo isso afectar o grau aparente de complexação.

Os diagramas do tipo B indicam a formação de um complexo de solubilidade limitada e inferior à da ciclodextrina, podendo ser observados diferentes comportamentos (Highichi e Connors, 1965):

- ❖ O tipo B_S - Desde S_0 até A o sistema é semelhante ao diagrama tipo A, ou seja, a solubilidade aparente do fármaco aumenta devido à formação de um complexo solúvel com a CD. Contudo, no ponto A do diagrama atinge-se o limite de solubilidade do complexo. A adição de mais CD resulta na formação de mais complexo, com conseqüente precipitação; a concentração de fármaco não complexado é mantida constante pela dissolução do fármaco sólido. No ponto B, todo o fármaco sólido foi consumido e a adição de mais fármaco resulta da depleção deste para a solução por formação de complexo e pela concomitante precipitação de complexo insolúvel.

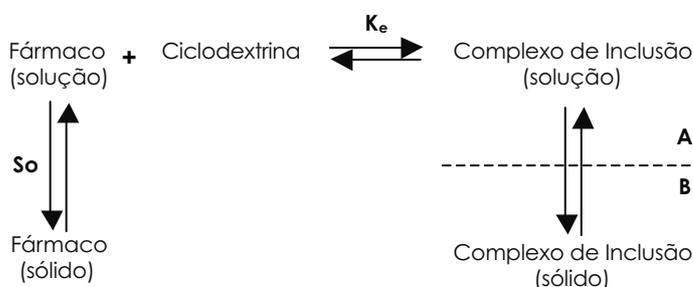


Figura 12. Modelo cinético do equilíbrio que se estabelece nos diagramas do tipo B.

- ❖ O tipo B_I é interpretado do mesmo modo que o B_S , com a diferença de que o complexo formado é tão insolúvel, que o aumento inicial de concentração de fármaco não é detectável.

O conhecimento da estequiometria e da constante de equilíbrio de formação do complexo permitirá a descrição quantitativa da extensão da interacção molecular. Estas quantidades podem, a maior parte das vezes, ser calculadas a partir do diagrama de fases. Em muitas substâncias a complexidade do sistema impossibilita uma descrição

completa do equilíbrio, mas mesmo nestes casos é possível calcular as constantes de equilíbrio aparente, com base numa estequiometria assumida (Higuchi e Connors, 1965).

Para os sistemas com diagrama de solubilidade de fases do tipo A e B_S, é possível determinar, a partir da parte ascendente e linear da curva, a eficiência de complexação. Um declive com valor de 1 significa que uma mole de moléculas-hóspedes é complexada por uma mole de moléculas de ciclodextrina (1:1), ou seja 100% de eficiência. Declives de valor superior a 1 correspondem a uma complexação de maior ordem molecular.

Quando no diagrama se obtém uma linha recta, é assumida a formação de um complexo 1:1, e a constante de estabilidade é calculada a partir da equação: $K_{e(1:1)} = \text{Declive} / S_o \times (1 - \text{Declive})$, com determinação experimental de S_o , em que S_o é a solubilidade do substrato, na ausência da ciclodextrina e o seu valor é determinado pela intercepção da recta de solubilidade com o zero de concentração de ciclodextrina (Duchêne e Wouessidjewe, 1990c; Higuchi e Connors, 1965; Mosher e Thompson, 2002; Otagiri et al., 1983; Thompson, 1997; Veiga, 1996; Veiga et al., 1996).

Esta constante reflecte o correcto ajustamento da molécula-hóspede dentro da cavidade da CD (Duchêne et al., 1989).

3.2.3.1.2. Método de espectroscopia de ultravioleta

A espectroscopia de ultravioleta (UV), na região do espectro magnético 180 a 400 nm, é um dos métodos que pode ser utilizado para a detecção da formação de complexos de inclusão no estado líquido. Por vezes, a formação de complexos altera as propriedades espectrais do fármaco, podendo ocorrer desvios na intensidade e comprimento de onda da absorção máxima e/ou um alargamento das bandas. Estas alterações podem ser explicadas por perturbações do nível de energia dos electrões da molécula-hóspede, como resultado quer de uma interacção directa com a ciclodextrina, quer da expulsão das moléculas de água de solvatação, quer ainda da combinação dos dois efeitos (Cabral-Marques, 1994c; Otagiri et al., 1983; Szejtli, 1990; Veiga, 1996).

3.2.3.2. Métodos de detecção no estado sólido

3.2.3.2.1. Difracção de raios-X

O estudo das propriedades cristalográficas é importante, por um lado, porque estruturas cristalinas diferentes da mesma entidade química, como é o caso dos polimorfos, exibem diferente solubilidade, estabilidade ou biodisponibilidade e, por outro, porque os métodos de complexação podem promover essas alterações.

A difracção de raios-X é um dos métodos de eleição para elucidar qual a estrutura molecular de um complexo de inclusão com CDs no estado sólido. O difractograma de um verdadeiro complexo de inclusão é distinto do obtido pela sobreposição de cada um dos compostos. No caso de moléculas hóspede cristalinas, o difractograma sugere a formação de complexo, somente se ocorrer o desaparecimento de alguns picos característicos da molécula-hóspede ou se aparecerem outros picos que não se observavam originalmente, nem no difractograma da CD, nem no da molécula-hóspede (Brittain, 1997 e 2002; Cabral-Marques, 1994c; Veiga, 1996).

3.2.3.2.2. Espectroscopia vibracional - Infravermelhos (*Fourier Transform Infrared - FTIR*)

As energias associadas com os modos vibracionais de um composto químico estão compreendidas entre 400 e 4000 cm^{-1} . A absorção de energia na região do infravermelho médio, está associada a transições fundamentais entre estados vibracionais de uma molécula.

O recurso a espectrómetros de absorção no infravermelho interferométricos (associação da técnica de transformados de Fourier à espectroscopia de infravermelho - FTIR) permite ultrapassar as dificuldades de detecção, com espectrómetros dispersivos, de fótons com baixos valores de energia (especialmente no infravermelho longínquo) e da sobreposição das sucessivas ordens de difracção, para comprimentos de onda suficientemente longos (Salsa, 1998; Teixeira-Dias, 1986). Os modos vibracionais podem ser observados directamente através da absorção de radiação na região de infravermelhos do espectro.

Os modos vibracionais mais importantes sob o ponto de vista analítico são de dois tipos básicos: *Elongação* - variação do comprimento da ligação e *Deformação* - variação do ângulo da ligação.

Numa molécula, certos grupos funcionais absorvem a radiação de infravermelhos e exibem bandas de absorção em regiões com frequências características, independentemente da estrutura do resto da molécula. Estas bandas são previsíveis e permitem retirar informação acerca de moléculas desconhecidas ou sobre modificação que possa ocorrer numa molécula conhecida.

No caso da formação de complexos com CDs, as bandas correspondentes à parte incluída da molécula-hóspede são geralmente deslocadas ou alteradas nas suas intensidades. Em determinados casos, como acontece quando está presente um grupo carbonilo (1650 e 1700 cm^{-1}) uma vez que a banda sofre modificação, podem ser observadas alterações espectroscópicas que indicam a formação de complexo. O modo de alongação do grupo carbonilo pode também reflectir a existência de polimorfismo estrutural ou conformacional (Brittain, 1997 e 2002; Cabral-Marques, 1994c; Veiga, 1996).

3.2.3.2.3. Análise térmica - Calorimetria de Varrimento Diferencial

A calorimetria de varrimento diferencial (CVD), um dos métodos de análise térmica mais usado, mede as alterações de energia num material, as quais podem ser manifestadas como exotérmicas ou endotérmicas (Giron, 1990).

A CVD pode demonstrar a formação de complexos de inclusão, uma vez que o pico endotérmico está ausente à temperatura de fusão do fármaco incluído, podendo no entanto ser observado para a mistura física e para o fármaco isolado. O desaparecimento do pico endotérmico ocorre porque o processo de inclusão leva a que os pontos de fusão, de ebulição, de sublimação ou de degradação, sejam deslocados para temperaturas diferentes ou não se observem até à temperatura limite de decomposição da ciclodextrina (250 a 300 °C) (Cabral-Marques, 1994c; Cabral-Marques et al., 1990; Class et al., 2002).

O polimorfismo pode também ser evidenciado através de CVD, uma vez que os diversos polimorfos apresentam picos endotérmicos diferentes (Brittain, 2002).

3.2.4. Avaliação da Biodisponibilidade

Os estudos de biodisponibilidade - ensaios de velocidade de dissolução e de coeficiente de partilha - são relevantes para a previsão do comportamento "in vivo" das preparações em investigação, tendo, contudo, em conta, as limitações intrínsecas. Estes parâmetros, conjuntamente com a constante de ionização, pH dos fluidos gastrointestinais, superfície de absorção e tempo de permanência, bem como a lipofilia das moléculas, são determinantes da velocidade e extensão do processo de absorção.

O sistema de classificação biofarmacêutico (Figura 13) fundamenta-se na absorção de fármaco através da membrana intestinal, a uma velocidade que é proporcional à sua concentração na superfície da membrana, sendo a dissolução "in vivo" um factor crítico neste processo. Este sistema é uma ferramenta científica para classificação de fármacos, baseada na sua solubilidade em água e permeabilidade intestinal, caracterizando os fármacos em quatro categorias:

- I. Elevada solubilidade e elevada permeabilidade;
- II. Reduzida solubilidade e elevada permeabilidade;
- III. Elevada solubilidade e reduzida permeabilidade;
- IV. Reduzida solubilidade e reduzida permeabilidade.

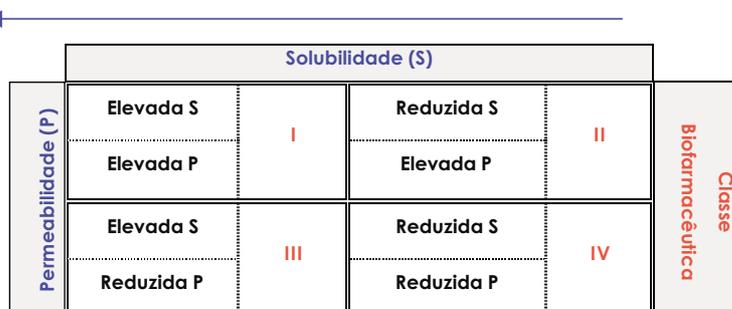


Figura 13. Classificação biofarmacêutica de fármacos quanto à solubilidade e à permeabilidade. (Adaptado de Amidon et al., 1995; Barreto et al., 2002).

Para fármacos do grupo I e IV, a correlação dos dados não é muito clara, e deve ser efectuada determinação experimental da absorção "in vivo";

Para fármacos do grupo III, a permeabilidade é o factor limitante de absorção, não sendo neste caso os dados "in vitro" de grande utilidade;

Para os fármacos do grupo II, a dissolução é o factor limitante da absorção e os valores dos estudos "in vitro" podem ser bastante úteis.

No caso de fármacos com problemas de biodisponibilidade, tal circunstância pode ser reflexo de que a absorção ocorre durante um período de tempo limitado após a ingestão, o que implica igualmente que o processo de dissolução no TGI seja limitado no tempo para alcançar uma boa biodisponibilidade, devendo assim ser estudado o tempo crítico para se atingir uma percentagem óptima de fármaco dissolvido no local de absorção (Amidon et al., 1995; Barreto et al., 2002; Dressman et al., 1998; Panchagnula e Thomas, 2000; Shargel e Yu, 2002).

3.2.4.1. Estudos de Dissolução

A solubilidade e dissolução de um fármaco constitui um requisito prévio à absorção e obtenção de resposta clínica, em quase todos os medicamentos administrados por via oral, justificando-se assim a importância e necessidade dos estudos de dissolução. Estes são utilizados no desenvolvimento de novas formulações, no controlo de qualidade de formas farmacêuticas e para dar indicações de bioequivalência, podendo os dados ser correlacionados com a actividade "in vivo".

Os métodos para o estudo da dissolução descritos em diversas Farmacopeias (Americana, Europeia e Portuguesa) utilizam vários tipos de equipamento, como por exemplo o aparelho com pá agitadora, com cesto de rede, de cilindros oscilantes ou de célula de fluxo contínuo. Cada um deles está adequado para uma geometria e tamanho específicos do produto em estudo, bem como para diferentes formas farmacêuticas, apresentando tipos de agitação característicos, dependendo dos quais, as condições de dissolução são estabelecidas (Ford e Rajabi-Siahboomi, 2002).

Os modelos que permitem prever a absorção dos fármacos a partir dos estudos de dissolução estão limitados pela complexidade de fenómenos que ocorrem no TGI, como sejam a situação de jejum ou pós-prandial, a fase do ciclo de motilidade, o esvaziamento gástrico, o conteúdo do lúmen intestinal, o mecanismo responsável pela absorção do fármaco e permeabilidade, e alterações físico-químicas da molécula ao longo do TGI (Barreto et al., 2002; Dressman et al., 1998).

Assim, para que os ensaios de dissolução permitam perspectivar o comportamento "in vivo", têm que ser utilizados meios de dissolução que se assemelhem às condições fisiológicas, devendo ser considerados factores como, o impacto do

volume de fluidos disponível, a presença de tensio-activos, a influência dos padrões de motilidade na dissolução e solubilidade, e condições *sink*. As condições *sink* são obtidas através da manutenção de baixas concentrações de fármaco no fluido de dissolução, entre 10 a 15% da sua solubilidade, à temperatura de 37 °C, o que se consegue para a maioria dos fármacos utilizando uma quantidade relativamente elevada de fluido, em geral igual ou superior a 1000 ml. Quando não é possível utilizar este tipo de meios de dissolução, recorre-se a meios tão simples quanto possível, devendo a temperatura e o pH ser semelhantes ao que se espera nos fluidos "in vivo", mantendo ou não as condições *sink* (Ford e Rajabi-Siahboomi, 2002).

A velocidade de dissolução é também influenciada pelo tamanho da partícula, forma do cristal, polimorfismo, molhabilidade, adsorção aos excipientes, formação de complexos de reduzida solubilidade, formação de dispersões sólidas, processo de produção, tempo de desintegração e natureza do revestimento (Amidon et al., 1995; Dressman et al., 1998).

Em síntese, os resultados obtidos com qualquer um dos tipos de aparelhos são sempre afectados pelas suas especificidades intrínsecas e pelas condições envolventes, pelo tipo e velocidade de agitação, volume, composição e temperatura do fluido de dissolução, devendo estas ser tidas em consideração para que os dados sejam reprodutíveis.

A duração dos testes de dissolução é outro factor a ponderar, devendo ser escolhida tendo em consideração não só os locais onde o fármaco vai ser absorvido, mas também, de acordo com a altura em que este é administrado. Se um fármaco for absorvido a partir da parte superior do intestino delgado e se for administrado em jejum, o meio do teste de dissolução deve simular as condições gástricas de jejum e ter uma duração de 15 a 30 minutos. Por outro lado, se for administrado com alimentos e bem absorvido através do intestino delgado e na parte proximal do intestino grosso, pode ser necessária uma duração de 10 horas, com as apropriadas variações na composição do meio.

Assim, de modo a permitir 1-2 horas para absorção de um fármaco no intestino delgado, a dissolução de um tal composto deve estar completa, sob condições gástricas, em 15 a 30 minutos e/ou sob condições semelhantes às do intestino delgado, dentro de uma hora. Nestas circunstâncias, é razoável a utilização de critérios de 85% de fármaco

dissolvido após 15 minutos no meio gástrico; após uma combinação de 15 minutos no meio gástrico, com 15 minutos no meio intestino delgado; ou após 30 minutos num meio representativo das condições do intestino delgado (Dressman et al., 1998; Kingsford et al., 1984).

Os dados podem ser apresentados e tratados utilizando vários métodos de análise (Chowdary e Sureshbabu, 1994; Ford e Rajabi-Sialiboom, 2002):

- ❖ *Perfis de dissolução* - representação gráfica da monitorização contínua da percentagem de concentração de fármaco dissolvido *versus* tempo. A concentração é expressa em termos de fracção da dose dissolvida, obtendo-se uma curva do tipo cumulativo, em que o valor máximo de fracção dissolvida no valor máximo de tempo, tende para 100%.
- ❖ *Linearização* - expressa os dados de dissolução através apenas de um parâmetro, por exemplo uma constante de velocidade. Este parâmetro permite comparar as velocidades de libertação de diferentes formas farmacêuticas de um fármaco.
- ❖ *Parâmetros de dissolução*
 - *Tempos de dissolução* - Avaliação do tempo necessário para que determinadas proporções do fármaco, expressas em percentagem, sejam dissolvidas. Geralmente utilizam-se valores de $t_{20\%}$, $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$, designando-se o valor de $t_{50\%}$ por semi-vida de dissolução.
 - *Fracção de fármaco dissolvido num intervalo de tempo* - Avaliação da fracção da dose dissolvida ao fim de períodos de tempo previamente definidos.
 - *Eficiência de dissolução (ED)* - este cálculo efectuado em tempos definidos, foi proposto pela primeira vez por Khan em 1972 e por Khan e Rhodes em 1975 e reflecte a quantidade de dose que se dissolve num tempo específico.

O parâmetro de ED permite caracterizar o processo de dissolução como um todo, dado que é definido pela área sob a curva de dissolução até um certo tempo t , expressa como uma percentagem da área do rectângulo descrito por 100% de dissolução no mesmo tempo t .

Este parâmetro tem ainda a vantagem de poder ser correlacionável com os dados "in vivo", dado que se aproxima mais da situação clínica, se considerarmos que o grau de absorção é proporcional à concentração de fármaco em solução e ao tempo de permanência no local do TGI e que a quantidade que atinge a circulação sanguínea

é calculada pela área sob a curva da concentração plasmática (Chowdary e Suresh Babu, 1994; Conti et al., 1995; Veiga, 1996).

A IM, classificada no grupo II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico, é fracamente solúvel em água e nos fluidos aquosos e a sua absorção é limitada pela sua velocidade de dissolução e solubilidade, sendo um dos objectivos da sua complexação com CDs conseguir melhorar estas características, contribuindo assim para um aumento da absorção “in vivo”.

3.2.4.2. Coeficiente de Partilha

A lipofilia tem a capacidade de influenciar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das substâncias biologicamente activas.

As características estruturais de um fármaco, o seu balanço hidrófilo-lipófilo e a sua capacidade de ionização, reflectem-se na propriedade de difusão passiva de uma molécula através de um sistema multicompartimental, caracterizado pela variação descontínua de pH. Estas características devem ser compatíveis com a natureza da membrana lipídica que o fármaco tem que atravessar, constituindo conseqüentemente um factor limitante para que este atinja o local de acção em quantidade terapêutica útil, condicionando deste modo a absorção e os fenómenos subseqüentes de distribuição, metabolização e excreção (La Rotonda et al., 1988).

A lipofilia e a constante de ionização são deste modo características físico-químicas interligadas, das quais depende a velocidade e a extensão de absorção, e que são condicionadas por vários factores fisiológicos, de entre os quais o pH do meio. A relação entre estes dois parâmetros e o pH é conhecida pela hipótese da “partilha segundo o pH” (Buri, 1981). Esta hipótese fundamenta-se em vários pressupostos:

- ❖ A maior parte das moléculas de fármacos são ácidos ou bases fracas;
- ❖ Atravessam as barreiras lipídicas por difusão passiva;
- ❖ Para se difundir no meio lipídico, a substância deve apresentar algum carácter lipófilo que lhe permita a solubilidade nesse meio;
- ❖ Só a fracção não ionizada é lipossolúvel;
- ❖ É essencialmente sob a forma não ionizada que o fármaco atravessará a barreira membranar;
- ❖ O grau de ionização depende do pH, sendo conseqüentemente diferente para diversos valores de pH.

A lipofilia é determinada experimentalmente através da razão da distribuição do fármaco entre um solvente não miscível com a água e uma fase aquosa, conhecido por coeficiente de partilha (CP). É uma característica física que permite determinar o balanço entre as propriedades lipófilas e hidrófilas, representando a razão entre a parte não ionizada da molécula, que se dissolve na fase oleosa saturada, e a ionizada, solúvel na fase aquosa que pode ser água ou tampão.

Ao longo dos anos têm sido utilizadas várias fases oleosas, sendo hoje considerado por alguns autores, que a fase que apresenta um significado mais aproximado da situação que ocorre “in vivo” é o n-octanol, devido à sua estrutura química possuir cadeias lipófilas, grupos hidrofílicos, capacidade para captar moléculas de água e parâmetros de solubilidade similares aos das membranas naturais. Recomenda-se para a fase aquosa a utilização de um tampão com um pH semelhante ao meio fisiológico que se pretende estudar (Buri, 1981; Leo et al., 1971; Lien e Ren, 2002; Panchagnula e Thomas, 2000).

Os estudos de lipofilia de compostos de complexos de inclusão com CDs, dissolvidos na fase aquosa, baseiam-se em modelos de distribuição entre as duas fases, como representado na Figura 14 e têm como pressupostos que as CDs e os complexos de inclusão não se deslocam da fase aquosa para a fase oleosa, devido ao seu carácter hidrófilo (Frijlink et al., 1989; Nakajima et al., 1984; Uekama et al., 1983; Veiga, 1996).

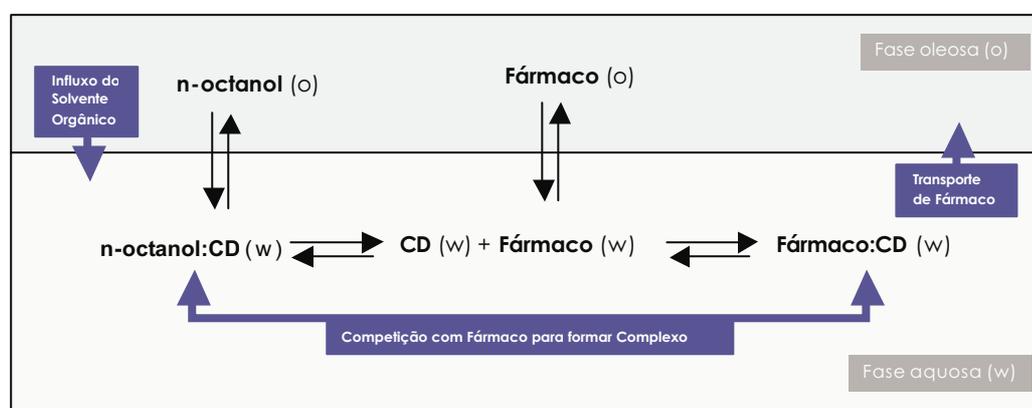


Figura 14. Modelo de distribuição das várias entidades em solução na fase aquosa e oleosa e processos envolvidos no transporte de fármaco para a fase oleosa. (Adaptado de Frijlink et al., 1989; Veiga, 1996).

As experiências efectuadas por alguns autores mostram que a adição de CD a um sistema bifásico de solventes com fármacos lipófilos, resulta num processo diferente daquele que existe na ausência de CD.

No interior da fase aquosa a concentração de fármaco livre será baixa devido à complexação com a CD. Perto da interface, contudo, a concentração de fármaco livre será relativamente alta, devido ao deslocamento do fármaco do complexo, pelo solvente orgânico. O transporte de massa do fármaco a partir da fase aquosa para a fase oleosa será principalmente determinado pela concentração total de fármaco livre e complexado na fase aquosa e não somente pela fracção livre.

À medida que o solvente orgânico entra na fase aquosa, a capacidade das CDs para aumentar a dissolução do fármaco diminui, devido à competição entre o solvente e o fármaco para complexar com a molécula de CD. O coeficiente de partilha apresentará consequentemente só ligeiras alterações com a adição das CDs (Frijlink et al., 1989; Nakajima et al., 1984; Uekama et al., 1983; Veiga, 1996).

O coeficiente de partilha tem sido definido de duas formas pelo facto da ionização das moléculas ser dependente do pH:

- ❖ Coeficiente da partilha aparente (P^*) - razão da concentração total na fase lipófila e a concentração na fase hidrófila (dependente do pH);
- ❖ Coeficiente de partilha verdadeiro (P) - razão das concentrações das moléculas não ionizadas e não associadas na fase lipófila e a concentração na fase hidrófila.

Segundo a lei de Nernst, o coeficiente de partilha é uma constante para qualquer composto num determinado sistema solvente, a uma determinada temperatura. Tal como qualquer constante, P está linearmente relacionado com a alteração da energia livre padrão, quando é convertido para a escala logarítmica. Por causa desta relação linear de energia livre e face à extensão da gama de valores de P^* , utiliza-se habitualmente o valor de $\log P$, o qual é correlacionável, entre outros parâmetros farmacocinéticos, com a permeabilidade e distribuição (Barreto et al., 2002; Lien e Ren, 2002; Panchagnula e Thomas, 2000).

Dentro de um mesmo tipo de compostos, a absorção aumenta com a lipofilia da molécula até atingir um nível máximo para um intervalo de valores de $\log P$, após o qual começa a decrescer segundo uma relação parabólica. Valores de $\log P$ entre 0 e 3 constituem um intervalo óptimo para absorção passiva. Um valor de zero, significa que a substância é hidrofílica, logo, apresenta uma boa solubilidade, no entanto a sua permeabilidade é reduzida. Para valores de $\log P$ superiores a 3, encontramos fármacos lipofílicos com uma absorção favorável, mas também mais susceptíveis de sofrer

metabolismo e/ou depuração biliar, ligação às proteínas e uma maior distribuição. A lipofilia está igualmente associada à tendência para uma elevada depuração metabólica, uma vez que esta característica favorece a afinidade para a ligação às enzimas (Barreto et al., 2002; Panchagnula e Thomas, 2000).

O estudo efectuado do coeficiente de partilha das várias formas de IM, tem como objectivo avaliar a influência da complexação na lipofilia e deste modo na capacidade de distribuição em sistemas bifásicos.

3.3. Absorção, metabolismo e excreção de complexos de ciclodextrinas administrados por via oral

Após administração oral, as CDs naturais não são hidrolisadas no intestino delgado, ocorrendo degradação enzimática pela flora bacteriana a nível do intestino grosso. As CDs naturais são bastante estáveis em meio alcalino, mas hidrolisam-se em meio fortemente ácido. São completamente resistentes à degradação enzimática pelas β -amilases que atacam grupos terminais livres e susceptíveis às α -amilases que actuam no interior da molécula, variando no entanto o grau de degradação com o tipo de CD.

Existe evidência de que há possibilidade de absorção das CDs ao nível do intestino delgado, embora o tamanho e a polaridade da molécula impeçam a penetração imediata nas membranas biológicas. Esta incapacidade resulta numa diminuição de absorção quando os compostos polares são administrados por via oral. A absorção de β -CD está descrita como sendo inferior a 4%, devido ao peso molecular e ao carácter hidrófilo, que dificultam a difusão passiva (Cabral-Marques, 1994a; Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Irie et al., 1988).

Os derivados das CDs são geralmente mais resistentes à hidrólise no TGI do que as CDs naturais. A biodisponibilidade oral da HP- β -CD foi estudada em cães e em ratos, estimando-se uma absorção de 3,3% para os primeiros e um valor inferior para os segundos, com uma excreção de 60% sob a forma intacta. Outros estudos, efectuados em ratos aos quais foi administrada HP- β -CD marcada com ^{14}C , evidenciaram o aparecimento da molécula radiomarcada numa percentagem de 3% na urina, 71% nas fezes e 3% exalada na respiração. Deste modo, apesar da HP- β -CD poder ser também absorvida numa percentagem variável, dependendo da via de administração oral ou

rectal e dos factores que promovem o aumento da permeabilidade da membrana da mucosa intestinal, os estudos apontam para que a quantidade que possa entrar na circulação sistémica, aí permaneça até ser eliminada intacta na urina, não induzindo toxicidade com significado clínico relevante (Arima, 1992; Flourié et al., 1993; Frijlink et al., 1990b; Mosher e Thompson, 2002).

Quando os complexos de inclusão se encontram em solução, estabelece-se um equilíbrio dinâmico entre o complexo e as moléculas livres existentes no meio ambiente, estando a estabilidade dos complexos administrados por via oral principalmente dependente da constante de formação do complexo (Liversidge et al., 1989), do efeito de competição para a molécula de HP- β -CD exercido pelas moléculas de sais biliares existentes no intestino delgado (Miyazaki et al., 1981; Nakanishi et al., 1989) e da degradação enzimática da CD por parte das α -amilases da flora bacteriana do intestino grosso (Duchêne e Wouessidjewe, 1990b).

As ciclodextrinas naturais, como já anteriormente referido, sofrem hidrólise lenta por acção das α -amilases sendo fermentadas por várias estirpes de Bacteroides, que clivam as ligações glicosídicas internas do tipo α -1,4. Os produtos da clivagem das ciclodextrinas, maltodextrinas lineares, maltose e glucose, são degradados e absorvidos como os do amido, mas ao nível do intestino grosso, e excretados sob a forma de dióxido de carbono e água (Antenucci e Palmer, 1984; Irie e Uekama, 1997). A introdução de substituintes nos grupos hidroxil e a adição de moléculas hóspede, reduz de um modo geral a velocidade de hidrólise enzimática por diminuição da afinidade das enzimas para as CDs e por dificuldade de acesso destas aos átomos de oxigénio glicosídicos do interior da cavidade, o que leva alguns autores a considerar que a HP- β -CD não é hidrolisada pelas amilases do intestino, sendo assim eliminada intacta nas fezes (Cabral-Marques, 1994a e 1994d; Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Szejtli, 1990).

Outros autores são de opinião de que a α -amilase *Aspergillus oryzae* hidrolisa a HP- β -CD com uma velocidade muito lenta comparativamente com a correspondente CD natural não substituída. O grau de SM influencia a velocidade de hidrólise enzimática, sendo tanto mais lenta quanto maior o grau de substituição. A quase negligenciável degradação enzimática da HP- β -CD, indicia que é provável que o seu metabolismo "in vivo" seja mínimo, devido à sua resistência às endoamilases (Szent e Szejtli, 1999).

Com base na bibliografia consultada, propõe-se na Figura 15 um modelo de comportamento dos complexos de inclusão no intestino após administração oral e os vários factores intervenientes no processo de libertação e absorção da IM complexada com a HP- β -CD.

Quando se administra por via oral um complexo de inclusão de fármaco em ciclodextrinas hidroxialquiladas, os estudos efectuados (Cabral-Marques, 1994d; Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Frijlink et al., 1990b; Hirayama e Uekama, 1999; Miyajima et al., 1986; Nakanishi et al., 1989; Strattan, 1992) levam a prever que:

- ❖ ao nível do estômago este não sofra qualquer tipo de alteração;
- ❖ ao nível do intestino delgado haja competição entre as moléculas de sais biliares e a molécula de fármaco pela complexação com a ciclodextrina;
- ❖ que a nível do intestino grosso haja reduzida hidrólise enzimática da ciclodextrina por parte da flora microbiana, e que a maior parte da CD seja eliminada nas fezes na forma intacta, ou que, no caso de haver hidrólise, se formem maltodextrinas lineares, maltose e glucose, as quais podem ser absorvidas ou então eliminadas sob a forma de dióxido de carbono e água.

Os principais factores dos quais depende a estabilidade do complexo com CDs hidroxialquiladas ao longo do TGI serão, assim, a constante de formação do complexo e a interacção com os sais biliares presentes.

A constante de formação do complexo entre o fármaco e a CD (K_D) é um factor relevante, como já se referiu, dado que se o seu valor for elevado não há libertação da molécula com conseqüente diminuição da fracção livre e da absorção.

Por outro lado, a formação de complexos de inclusão dos sais biliares com as CDs, está dependente do efeito de competição com o fármaco-hóspede, originando a deslocação deste da molécula do complexo, melhorando a sua biodisponibilidade (Nakanishi et al., 1989). Este mecanismo pode ser positivo no caso da IM, dado que promove a sua libertação, ficando disponível para ser absorvida. O processo pelo qual os sais biliares aumentam a dissolução da IM envolve solubilização micelar e efeito molhante (Miyazaki et al., 1981). A IM sob a forma de micelas é inserida na membrana gastrointestinal por interacção com os seus componentes, promovendo a absorção do fármaco. Contudo, podem ocorrer potenciais danos na membrana, causados por esta interacção.

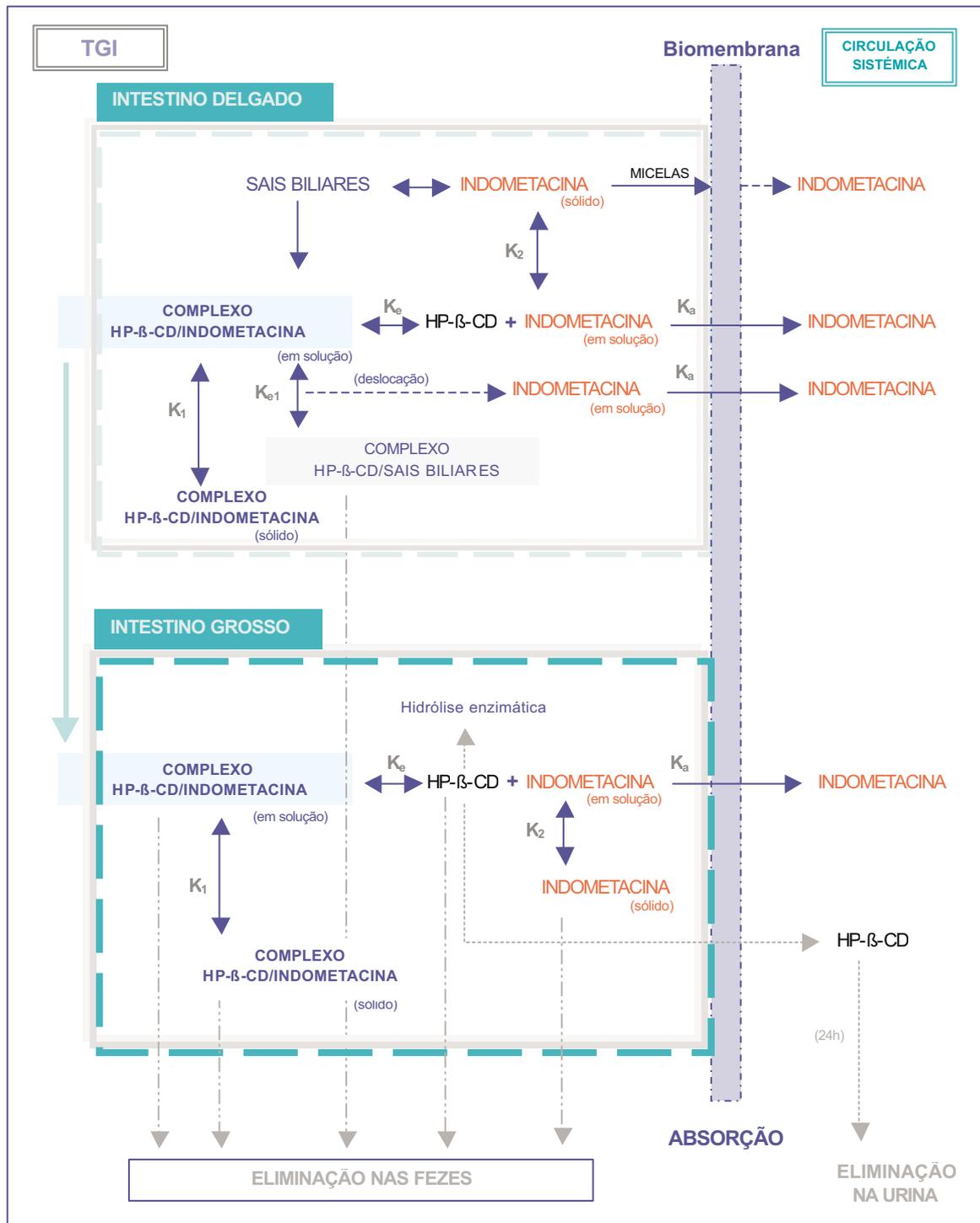


Figura 15. Modelo proposto de comportamento dos complexos de ciclodextrina no intestino, após administração oral.

- K_1 - constante de equilíbrio entre o complexo na forma sólida e no estado líquido;
- K_2 - constante de equilíbrio entre a indometacina na forma sólida e no estado líquido;
- K_a - constante de absorção da Indometacina;
- K_e - constante de estabilidade de formação do complexo com Indometacina;
- K_{e1} - constante de estabilidade de formação do complexo com sais biliares.

(Adaptado de Cabral-Marques, 1994d; Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Frijlink et al., 1990b; Hirayama e Uekama, 1999; Miyajima et al., 1986; Nakanishi et al., 1989; Strattan, 1992)

Em termos farmacêuticos é desejável usar complexos de formação cuja constante se situe entre 100 e 1000 M⁻¹, uma vez que os valores das constantes de formação de complexos com as várias moléculas dos sais biliares a pH 7,2 com a β -CD são respectivamente 2670 M⁻¹, 1100 M⁻¹, 410 M⁻¹ e 406 M⁻¹ para o deoxicolato, colato, glicocolato e taurocolato de sódio (Miyajima et al., 1986; Nakanishi et al., 1989). Fármacos com uma constante de formação menor formam complexos instáveis, enquanto que aqueles que têm uma constante de formação elevada são estáveis demais para que a troca com os sais biliares ocorra. Se a constante se situar nos valores referidos, a competição ocorre para a formação de complexo com os sais biliares no intestino delgado.

A inclusão de moléculas de sais biliares é também benéfica, por diminuir a capacidade das CDs livres interagirem com os fosfolípidos da membrana intestinal, com formação de complexos de inclusão, que podem provocar a fluidez desta e conseqüente aumento da permeabilidade, podendo esta capacidade ser uma das explicações para a absorção das CDs (Irie e Uekama, 1997).

Estudos metabólicos e farmacocinéticos efectuados em ratos, murganhos e cães, mostraram que a HP- β -CD administrada por via oral pode ser absorvida na forma intacta, numa proporção que varia entre 1 e 3%, sendo o material não absorvido excretado nas fezes. A maior parte da pequena quantidade metabolizada é provavelmente convertida em dissacáridos no intestino grosso, constituindo assim o principal mecanismo de absorção. Contudo, sabe-se que a HP- β -CD é dializável através de membrana de acetato, e que os sais biliares podem aumentar a absorção de moléculas intactas (Strattan, 1992).

A verificar-se absorção, os estudos de administração IV da HP- β -CD mostram que ela é eliminada intacta na urina após 24h por filtração glomerular, com uma cinética de eliminação linear que implica ausência de nefrotoxicidade. Irie e colaboradores (1992a; 1992b) estudaram o comportamento da HP- β -CD administrada por via IV e concluem que esta se mantém em circulação e que não atravessa membranas lipídicas por causa da sua polaridade, podendo, quando em contacto com elas, extrair componentes lipídicos, preferencialmente o colesterol, actuando assim também como transportadores de moléculas lipídicas existentes na corrente sanguínea. Estes complexos de colesterol: HP- β -CD dissociam-se no filtrado glomerular, a HP- β -CD passa através do glomérulo

sem provocar obstrução e ocorre deposição de colesterol no rim (Fini et al., 1995; Flourié et al., 1993; Frijlink et al., 1990a; Gerloczy et al., 1994; Nakanishi et al., 1992; Shamat, 1993; Tan e Lindenbaum, 1991).

3.4. Toxicidade das ciclodextrinas administradas por via oral

A administração oral das CDs naturais não induz qualquer tipo de toxicidade aguda, e, mesmo em doses mais elevadas, não origina mortalidade quando administrada a animais. O DL50, em ratos, para a via oral, é descrito como sendo superior a 12,5 g/kg para a α -CD, 18,8 g/kg para a β -CD e 8 g/kg para a γ -CD (Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Mosher e Thompson, 2002; Szejtli, 1990).

A administração prolongada não promove alterações significativas em nenhum órgão nem nos parâmetros analíticos do sangue. Observa-se contudo em alguns dos estudos efectuados, que a administração crónica de ciclodextrinas a ratos, pode provocar algumas alterações:

- ❖ Reduz o aumento de peso, bem como os triglicerídeos séricos e a deposição de gordura, uma vez que os produtos da hidrólise das CDs incluem glucose e malto-oligosacarídeos, conhecidos por serem rapidamente fermentados pela flora anaeróbia do intestino grosso e originarem entre outros produtos, ácidos gordos (Flourié et al., 1993).
- ❖ O rim e o fígado mostraram ser órgãos alvo da toxicidade da β -CD, provocando alterações morfológicas com aumento do hepatócito centrolobular compatíveis com elevação das enzimas hepáticas (transaminase glutâmico-pirúvica, glutâmico-oxalacética e carbamoil-ornitina). Estas modificações, consideradas moderadas, foram observadas com doses superiores a 1313 mg/kg/dia em ratos macho e 1743 mg/kg/dia em fêmeas, administradas durante 52 semanas (Bellringer et al., 1995).
- ❖ Um dos efeitos sistémicos secundários das CDs é o aumento da eliminação gastrointestinal de certos nutrientes e sais biliares. Este efeito, porém, só é observado para doses superiores a 20% da dose recomendada. O efeito produz-se pela conversão aumentada do colesterol sérico a sais biliares, com conseqüente diminuição dos seus níveis plasmáticos. A capacidade

das CDs para complexar o colesterol pode também contribuir para desestabilizar a membrana. Estes efeitos podem estar directamente relacionados com o facto de algumas CDs poderem actuar como promotores da permeabilidade da membrana ou causar irritação dos tecidos, após administração por via injectável (Stella e Rajewski, 1997).

- ❖ Não se observou evidência macroscópica da existência de patologias, após um ano de exposição oral de ratos à β -CD, mas a avaliação microscópica dos tecidos revelou alterações. Os órgãos mais afectados pela exposição foram o rim e o fígado. Os efeitos no rim foram considerados como não tendo gravidade toxicológica. Foi observada alguma necrose celular no fígado em percentagens que variam entre os 2,5 a 5% dos animais, bem como o aparecimento de infiltrado inflamatório e um aumento do nível sérico das enzimas hepáticas. As observações foram consideradas como representando hepatotoxicidade moderada (Mosher e Thompson, 2002).

O mecanismo pelo qual a β -CD causa alterações hepáticas não está ainda definido, apresentando os estudos em outras espécies de animais, nomeadamente em cães, ausência de lesão quando expostos durante um ano a dietas contendo até 5% de ciclodextrina, levando a considerar que pode ser um efeito relacionado com a espécie e não reflectir uma hepatotoxicidade geral (Thompson, 1997).

A toxicidade aguda e subcrónica da HP- β -CD é insignificante após a sua administração intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intracraniana ou tópica, e mesmo quando administrada por via intravenosa na dose de 10 g/kg, não se observa a acumulação a nível renal observada com outras ciclodextrinas (Brewster et al., 1990 e 1992; Carpenter et al., 1995; Loftson e Brewster, 1997; Pitha e Pitha, 1985; Pitha et al., 1986 e 1994; Stella e Rajewski, 1997; Strattan, 1992; Yoshida et al., 1988).

Uma pesquisa efectuada em ratos, por administração intravenosa de 400 mg de HP- β -CD durante 90 dias, resultou em toxicidade moderada, evidenciada pela diminuição do aumento de peso corporal, alterações dos parâmetros séricos, aumento da actividade das células fagocitárias mononucleares dos pulmões e fígado e ainda alterações do pâncreas (Mosher e Thompson, 2002).

Os estudos clínicos evidenciam que a HP- β -CD é considerada não tóxica numa dose diária inferior a 16 g/kg. Não apresenta potencial mutagénico, não tem efeitos adversos na fertilidade nem no desenvolvimento pré e pós-natal e não é nem embriogénica nem teratogénica (Irie e Uekama, 1997).

Vários são os estudos que foram efectuados em ratos com a finalidade de avaliar a segurança da administração oral da HP- β -CD:

- ❖ Algumas das investigações revelaram que a toxicidade a longo prazo não induziu mortalidade, nem sinais visíveis de doença, apesar do grupo experimental ter apresentado um ligeiro aumento de peso comparativamente com o grupo controlo. O aumento do tamanho do fígado após administração crónica durante 112 dias, sem alterações morfológicas, nem diferença significativa do colesterol sérico, pode ser atribuída à formação de complexos de inclusão com os ácidos biliares no intestino. A inibição da captação destes poderá levar a um aumento da sua síntese e possivelmente ao aumento do tamanho do fígado (Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Gerloczy et al., 1994; Pitha e Pitha, 1985).
- ❖ Estudos efectuados em células humanas de epitélio intestinal (Caco-2) para testar a resistência transepitelial, demonstraram que a HP- β -CD não afecta a sua integridade e não evidencia toxicidade na actividade enzimática intracelular da desidrogenase, parecendo assim ser segura no que respeita aos efeitos locais no intestino (Tötterman et al., 1997).
- ❖ Uma outra pesquisa avaliou a segurança da HP- β -CD em ratos por um período de 2 anos. As doses atingiram os 5000 mg/kg/dia. Não foram detectados efeitos adversos, excepto o efeito laxativo considerado não relevante (Mosher e Thompson, 2002).

3.5. Utilização terapêutica de complexos de inclusão para administração por via oral

Os novos sistemas terapêuticos, dos quais a formação de complexos de inclusão com CDs é um exemplo, abrem novas perspectivas à utilização dos fármacos.

Os principais objectivos a atingir com a utilização por via oral destes novos sistemas incluem:

- ❖ Aumento da solubilidade aquosa e melhoria da biodisponibilidade através do aumento da velocidade aparente e extensão da dissolução;
- ❖ Melhoria das características físicas para uma melhor homogeneização e compressão do fármaco sob a forma de comprimidos;
- ❖ Aumento da estabilidade ou do tempo de libertação, durante o trânsito gastrointestinal, pela modificação do local e/ou do perfil de tempo de libertação do fármaco;
- ❖ Modificação dos parâmetros farmacocinéticos, implicando a melhoria da absorção um aumento dos níveis sanguíneos de fármacos pouco solúveis na água;
- ❖ Conseguir uma diminuição da irritação dos tecidos, dos efeitos laterais e das reacções hemolíticas;
- ❖ Mascaram o cheiro e sabor desagradável;
- ❖ Fármacos incompatíveis podem ser misturados, se pelo menos um deles estiver complexado;
- ❖ Soluções aquosas estáveis, de fármacos pouco solúveis na água, podem ser conseguidas sem a necessidade de adição de solventes orgânicos (Brewster et al., 1997; Duchêne e Wouessidjewe, 1990a e 1990b; Duchêne et al., 1989; Fujioka et al., 1983; Miyaji et al., 1992; Rajewski e Stella, 1996; Szejtli, 1990 e 1991a; Thompson, 1997).

Centenas de CDs modificadas têm sido preparadas e mostraram ter aplicação em investigação. Contudo, só alguns derivados têm potencial utilização terapêutica.

O aumento da biodisponibilidade é assim um dos efeitos mais significativos da complexação com CDs. A biodisponibilidade de uma especialidade farmacêutica, administrada por via oral, depende de vários factores, entre os quais a velocidade de dissolução, a solubilidade e a velocidade de absorção intestinal. Doses idênticas de uma mesma especialidade farmacêutica administradas por via oral podem resultar, dependendo da formulação, em diferentes curvas concentração/tempo, podendo ocorrer em muitos casos uma absorção incompleta.

O processo de dissolução e absorção de um fármaco administrado por via oral pode, em síntese, ser expresso pelo modelo cinético representado na Figura 16:

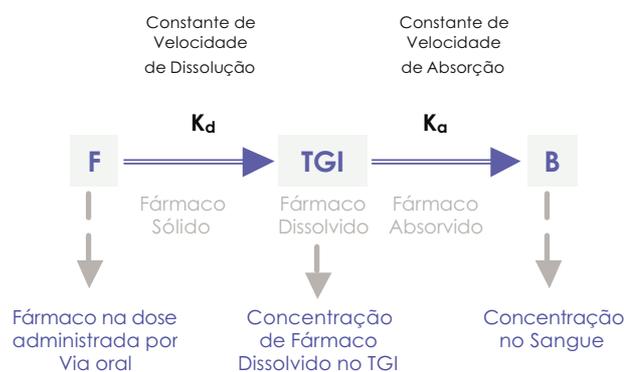


Figura 16. Modelo cinético do processo de dissolução/absorção de um fármaco administrado por via oral. (Adaptado de Szejtli, 1990 e 1991a).

- ❖ Se $K_d > K_a$ - o fármaco é muito solúvel e a absorção é o factor limitante. Nestes casos, a complexação com CDs não promove a absorção, podendo eventualmente diminuí-la.
- ❖ Se $K_d < K_a$ - o fármaco é pouco solúvel e a dissolução é o factor limitante. Nestes casos, K_d tem que ser aumentado quer por micronização das partículas do fármaco, preparando soluções sólidas em matrizes hidrofílicas, quer adicionando agentes tensio-activos; ou ainda formando complexos menos hidrofóbicos, por exemplo com ciclodextrinas. Sendo reconhecido que a velocidade de dissolução e solubilidade de fármacos hidrofóbicos aumenta consideravelmente quando são incluídos na cavidade das CDs, se K_a se mantiver constante, a concentração sanguínea aumentará (Szejtli, 1990 e 1991a).

A inclusão de fármacos hidrofóbicos dentro da cavidade da CD pode assim melhorar a sua solubilidade e estabilidade em água, o grau e extensão da dissolução do complexo F:CD, e a biodisponibilidade do fármaco, quando a dissolução e a solubilidade são factores limitantes da disponibilidade (Duchêne et al., 1985; Mosher e Thompson, 2002).

A libertação de um fármaco no TGI, do ponto de vista da optimização farmacoterapêutica, deve ser controlada de acordo com a finalidade terapêutica e as propriedades farmacológicas da substância activa, sendo possíveis diferentes formas de libertação, tal como esquematizado na Figura 17.

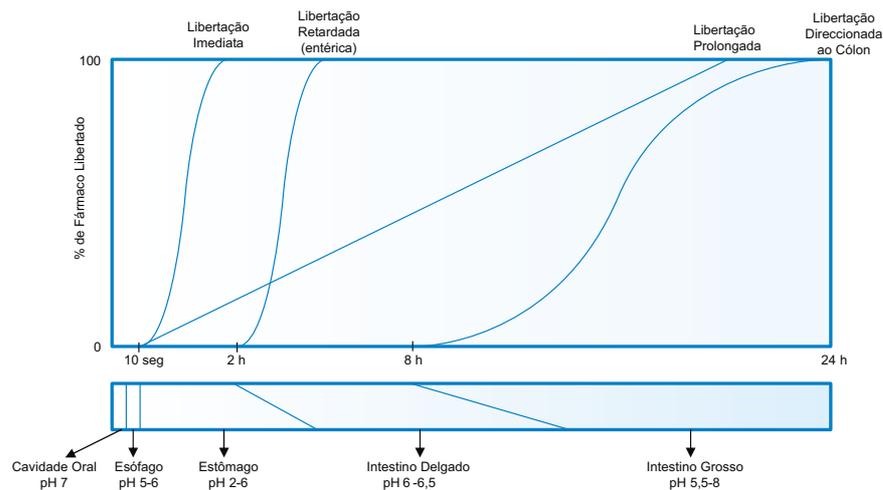


Figura 17. Formas de libertação de fármacos no TGI e pH das várias áreas anatómicas, no adulto em condições de jejum. (Adaptado de Hirayama e Uekama, 1999; Shargel e Yu, 2002).

As propriedades de biodegradação das CDs são particularmente úteis, quando estas são utilizadas como transportadoras de fármacos para os vários locais de absorção ao longo do TGI.

As CDs actuam essencialmente como transportadoras e protectoras do fármaco enquanto este atravessa o TGI, tendo sido aplicadas com sucesso quando o passo limitante é a solubilidade, a dissolução, o estado físico ou a degradação da molécula e não a sua absorção.

Quando um fármaco é administrado por via oral, inicia rapidamente a dissociação no fluido gastrointestinal, estando esta dependente da magnitude da constante de estabilidade do complexo e das características da CD utilizada no que respeita à degradação enzimática, observando-se, de um modo geral, que o aumento máximo de absorção é conseguido quando uma quantidade suficiente de CD é utilizada para solubilizar o fármaco. A adição de mais CD à solução de fármaco diminui a fracção livre deste e, conseqüentemente, reduz a biodisponibilidade (Hirayama e Uekama, 1999).

3.6. Fundamentação para a utilização de complexos de inclusão de Indometacina com Hidroxipropil- β -ciclodextrina

Estudos efectuados por diversos autores evidenciam que a molécula de IM sofre inclusão parcial na molécula de HP- β -CD, havendo contudo divergência quanto à parte da estrutura química da IM que é incluída na ciclodextrina. Na Figura 18 representam-se esquematicamente as duas principais hipóteses de forma de inclusão: inclusão da parte do anel indol (Djedäini et al., 1990) e inclusão da parte p-clorobenzeno, sendo esta última a que tem maiores defensores.

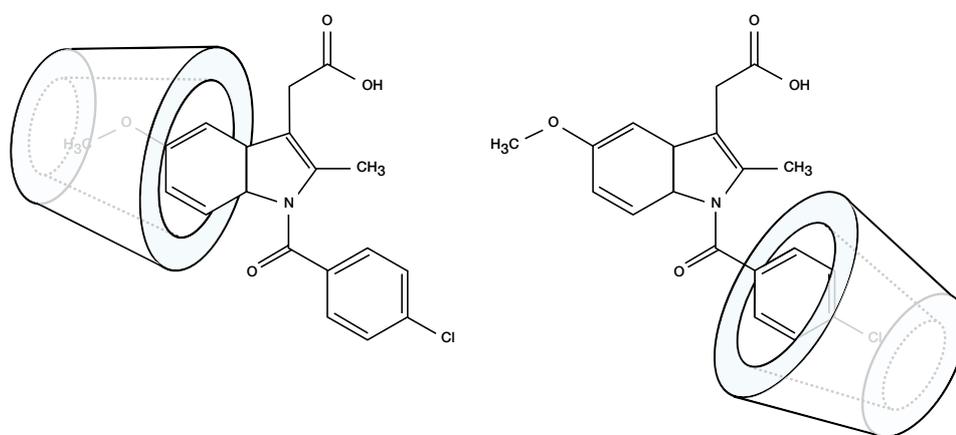


Figura 18. Inclusão parcial de IM em CD, exemplo da inclusão da parte indol e da parte p-clorobenzeno. (Adaptado de Backensfeld et al., 1990 e 1991; Djedäini et al., 1990; Redenti et al., 2001).

A análise das dimensões quer da cavidade da HP- β -CD, quer da molécula de IM inviabilizam a hipótese de inclusão completa. Contudo, existe evidência da inclusão do grupo funcional N-acil da IM, fundamentada na sua dimensão (7 Å) e comprovada através de técnica de simulação do modelo molecular tipo Stuart e modelação computacional, permitindo estes métodos obter informação sobre a geometria e a estrutura dos compostos de inclusão (Backensfeld et al., 1990 e 1991; Hamada et al., 1975; Kurozumi et al., 1975; Lin et al., 1991; Redenti et al., 2001). O carácter lipofílico da IM favorece também a formação do complexo.

A inclusão do grupo p-clorobenzeno confere protecção contra a hidrólise que ocorre a pH básico, dado que evita a cisão ao nível do grupo N-acil, aumentando a solubilidade e a velocidade de dissolução, prevenindo o contacto directo com a mucosa gástrica e diminuindo o tempo de permanência da molécula, com redução da sua toxicidade local.

4.1. Estudos em modelos animais vivos

A utilização de animais na investigação científica remonta a Aristóteles (384-322 BC). Desde então, esta ciência evoluiu para um conceito de animal de laboratório deliberadamente escolhido pela sua inerente adequação para o propósito da investigação em causa. Os estudos em animais vivos justificam-se por serem o único meio de estimar a interacção dos factores que podem modular a expressão da actividade farmacológica “in vivo” e as interacções entre os vários órgãos e o sistema neuroendócrino do animal como um todo, bem como identificar os efeitos adversos inesperados e estimar as doses que podem ser farmacologicamente activas, sem indução de efeitos não desejados.

Para a maior parte das substâncias, o mecanismo de acção será o mesmo quer no Homem, quer em mamíferos de outras espécies. Existirão assim, na resposta farmacológica, mais diferenças quantitativas do que qualitativas. Na maior parte dos casos os animais são mais sensíveis do que o Homem a determinados medicamentos, variando também a sensibilidade entre as várias espécies de animais de laboratório, explicadas pelas diferenças no metabolismo. Estas variações podem ser qualitativas e quantitativas e reflectem-se na capacidade de desintoxicação, velocidade de absorção, transporte, distribuição e eliminação de substâncias químicas.

Após administração oral, a absorção em animais de laboratório é geralmente considerada similar à do Homem, havendo contudo variações quantitativas relacionadas com a diferente composição da flora bacteriana do TGI. A distribuição e armazenamento de fármacos é razoavelmente consistente nas diversas espécies de mamíferos, inclusive no Homem, apesar da ligação aos componentes do plasma ser mais extensa no Homem, do que em animais de pequeno porte. A excreção urinária em diferentes espécies está dependente, até certo ponto, das diferentes dietas, dado que estas influenciam o pH e deste modo a grau de ionização dos compostos. A excreção biliar é bastante variável entre espécies e é aparentemente mais extensa em murganhos e coelhos do que nos ratos e no Homem.

As diferenças entre as espécies, na resposta aos fármacos, parecem estar relacionadas principalmente com a velocidade de biotransformação, a qual é geralmente

mais rápida em animais de pequeno porte do que no Homem (Calabrese, 1984; Fort, 2002; Wright, 1997).

Com a finalidade de avaliação da segurança dos fármacos são efectuados testes de toxicidade em modelos animais adequados ao objectivo do estudo. Para caracterizar a natureza do efeito secundário que se espera de um fármaco, é necessário usualmente administrar uma dose muito mais alta do que a dose terapêutica ou durante um período de tempo mais longo. Isto porque as doses de fármaco necessárias para provocar efeito farmacológico ou toxicológico são geralmente superiores em animais de laboratório e porque os efeitos secundários de fármacos adequados para a clínica são por vezes provocados por doses exageradas.

Os testes de segurança devem ser efectuados em mais do que uma espécie animal, por um lado devido ao facto de a extrapolação de resultados para o Homem não ser linear e por outro para garantir que a segurança não foi sobrestimada ou que algum potencial efeito secundário não foi verificado. É prática de rotina recomendada efectuar os testes em, pelos menos, duas espécies de animais.

Para chegar a uma estimativa da dose no Homem são aplicados factores de segurança que variam consoante a espécie. Estes factores derivam das observações já anteriormente referidas de que animais de laboratório conseguem usualmente tolerar doses mais altas sem exhibir toxicidade, variando estas diferenças com o grau de metabolismo basal e este com o rácio superfície/peso corporal. Este factor, pelo qual deve ser dividida a dose utilizada no animal em estudo, varia consoante os autores, podendo ser por exemplo de 10 para o rato e de 6 para o cão, ou, como recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em estudos para fins de autorização regulamentar de comercialização, ser 6 o factor de conversão a utilizar quando o animal estudado é o rato (acessível em: <http://www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm>).

A variedade dos testes e a extensão dos estudos necessários depende da natureza do fármaco e do uso clínico que se pretende. Depende, também, dos requerimentos exigidos pelas agências regulamentares do medicamento nos diversos países onde este será registado para comercialização, e dos requisitos desenvolvidos pela *International Conference on Harmonization* (ICH), representativa da Europa, Estados Unidos e Japão.

Os cuidados adequados dispensados aos animais de laboratório são preceitos básicos para assegurar a validade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, existindo normas a nível internacional e local, que asseguram a certificação de qualidade de

cuidados dispensados aos animais. Existe também legislação relativa à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, e que em Portugal é regulamentada pelo Decreto-Lei n.º 129/92 de 6 de Julho, com a redacção dada pelo Decreto-Lei n.º 197/96 de 16 de Outubro e pela Portaria n.º 1005/92 de 22 de Outubro, com as alterações introduzidas pelas Portarias n.º 466/95 de 17 de Maio e n.º 1130/97 de 7 de Novembro.

Esta preocupação com o bem-estar dos animais deve englobar um refinamento dos procedimentos a levar a cabo, de modo a causar menos stress aos animais, ou uma redução do número de animais necessários num determinado teste, mantendo no entanto a qualidade e validade da informação científica obtida (Calabrese, 1984; Fort, 2002; Wright, 1997).

4.2. Avaliação da toxicidade gástrica “in vivo” em modelo animal

A irritação da mucosa gastrointestinal, causada por agentes terapêuticos administrados por via oral, pode ocorrer através da via sistémica e da via de contacto tópico, como já anteriormente referido, em relação aos AINEs. Modelos animais têm vindo a ser desenvolvidos em várias espécies (Fara et al., 1988), tais como:

- ❖ O gato, recorrendo-se à utilização de mucosa gástrica ou do esófago;
- ❖ O porco, para o estudo da mucosa do intestino delgado;
- ❖ O coelho, para pesquisa na mucosa do intestino grosso;
- ❖ O cão, para a investigação de todo o intestino.

Os ratos, principalmente da espécie Wistar, têm sido utilizados em vários estudos, como modelo animal para evidência de lesão gastrointestinal, sendo reconhecida a sua validade e efectividade (Ammoury et al., 1989 e 1993; Davis et al., 1994; Lin et al., 1994; Miyazaki et al., 1981; Nambu et al., 1978; Ohno et al., 1999; Skeljo et al., 1993).

As técnicas envolvidas na avaliação da lesão da mucosa gastrointestinal são várias, dependendo do desenho do estudo, do local da lesão e das condições em que decorrem os ensaios.

Para o desenvolvimento deste trabalho recorreu-se a técnicas que se encontram entre as mais frequentemente utilizadas e que englobaram, para a investigação de lesão da mucosa gástrica, a avaliação macroscópica do aparecimento de lesão e o estudo histopatológico das partes da mucosa com evidência macroscópica de lesão. Para a análise do muco gástrico foi efectuado estudo citológico. ■

Objetivos

Objectivos

33

87

93

139

237

247

Tendo em consideração que:

- ❖ Há uma menor absorção da IM quando administrada por via oral a recém-nascidos, pela sua fraca solubilidade a pH 7 e por sofrer hidrólise a este valor de pH;
- ❖ Há um mecanismo de indução de toxicidade gastrointestinal da IM, quer sistémico por inibição das prostaglandinas, quer local, dependente do tempo de residência em contacto com a mucosa;
- ❖ Existe evidência de que a IM tem capacidade de induzir lesão hepática e renal quando administrada por via sistémica;
- ❖ Existem estudos a relatar a ausência de toxicidade da HP- β -CD, quando administrada por via oral;
- ❖ A IM tem capacidade de formar complexos de inclusão com HP- β -CD.

As hipóteses que se colocam são:

- ❖ A formação de complexo de inclusão com HP- β -CD
 - Aumenta a solubilidade e a eficiência de dissolução da IM, não afectando a sua estabilidade;
- ❖ Quando a forma complexada é administrada por via oral
 - Pode reduzir a toxicidade gástrica da IM;
 - A IM mantém a capacidade de induzir lesão hepática e renal;
 - A HP- β -CD, nas doses utilizadas, não tem capacidade de induzir lesão morfológica gástrica, renal ou hepática.

Os objectivos deste trabalho foram:

Na Parte I

- ❖ Demonstrar a formação de complexos pelos métodos de preparação utilizados.
- ❖ Avaliar a influência da complexação:
 - No estado físico da IM;
 - Na solubilidade e dissolução da IM;
 - No coeficiente de partilha da IM.

Na Parte II

- ❖ Avaliar em modelo animal:
 - A toxicidade gástrica da IM nas várias formas estudadas, quando administradas por via oral;
 - A toxicidade hepática e renal da IM;
 - A toxicidade hepática e renal da HP- β -CD. ■

Parte I
Estudo Tecnológico

Estudo Tecnológico



33

89

93

139

237

247

OBJECTIVOS

Os objectivos específicos do estudo tecnológico são:

- ❖ A preparação de complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina por duas técnicas diferentes de complexação;
- ❖ Análise da influência dos métodos de complexação na estabilidade da indometacina;
- ❖ Estudo de interacção da indometacina com a hidroxipropil- β -ciclodextrina;
- ❖ Avaliação da biodisponibilidade.

1. MATERIAIS EM ESTUDO

1.1. Indometacina

A IM matéria-prima (MP) utilizada sob a forma ácida (IMfa) foi cedida pela Merck Sharp & Dohme, de acordo com as condições do protocolo efectuado. O produto foi usado tal como recebido.

1.2. Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

A HP- β -CD utilizada foi adquirida à Jassen Biotech, Beerse, Bélgica. Segundo a informação do fornecedor apresenta um peso molecular 1300 e um grau de substituição molar médio de 0,39. Foi utilizada tal como recebida.

1.3. Tampões fosfato

As soluções de tampão fosfato (Tf) foram preparadas segundo a Farmacopeia Portuguesa, V edição (FP V).

Solução tampão pH 4,5

Dissolvem-se 13,61 g de fosfato monopotássico em 750 ml. Ajusta-se o pH com hidróxido de sódio 0,1 N ou ácido clorídrico 0,1 N. Completa-se o volume para 1000 ml com água purificada.

Solução tampão pH 5,5

1. Dissolvem-se 13,61 g de fosfato monopotássico em água purificada e completa-se o volume para 1000 ml.
2. Dissolvem-se 35,81 g de fosfato dissódico em água purificada e completa-se o volume até 1000 ml.
3. A 96,4 ml da solução 1, adicionam-se 3,6 ml da solução 2.

Solução tampão pH 7,0

Misturam-se 250 ml de uma solução de fosfato monopotássico 0,2 M com 148,2 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 0,8% (m/v). Ajusta-se o pH se necessário, e completa-se o volume para 1000 ml com água purificada.

Solução tampão pH 7,2

Misturam-se 1250 ml de uma solução de fosfato monopotássico 0,2 M com 867,5 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 0,8% (m/v), completa-se o volume para 5000 ml. Ajusta-se o pH se necessário.

1.4. Reagentes

Todos os reagentes usados eram de grau analítico (Merck) e as soluções aquosas foram preparadas com água purificada por osmose inversa (Elgastat, UHQ II).

2. MÉTODOS

A metodologia utilizada no desenho do estudo tecnológico está representada no organograma da Figura 19:

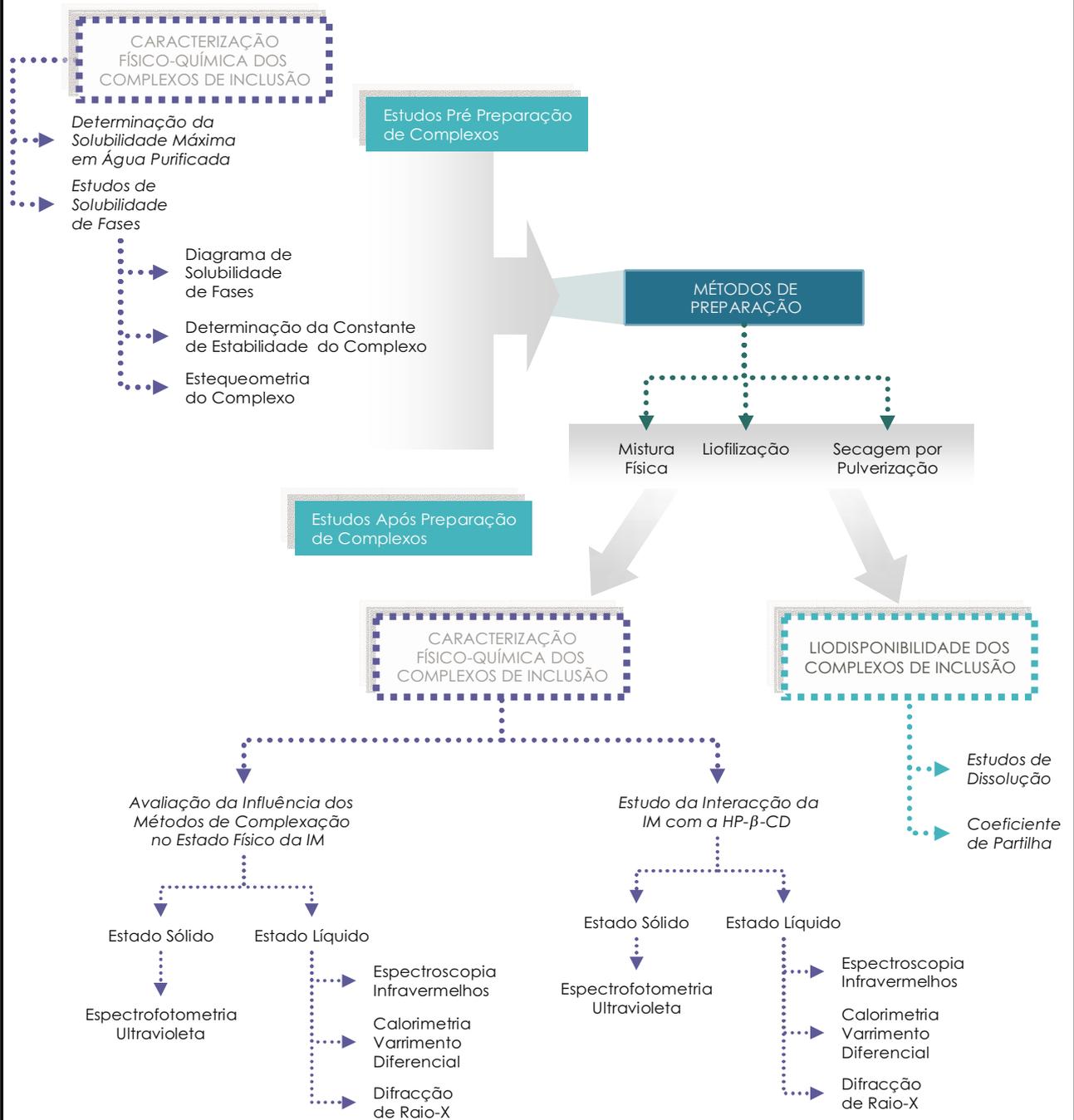


Figura 19. Desenho experimental do estudo tecnológico.

2.1. Caracterização físico-química dos complexos de inclusão

2.1.1. Doseamento espectrofotométrico da indometacina

Pesaram-se quantidades exactas de IM que foram dissolvidas no solvente utilizado como branco. A partir desta solução prepararam-se várias diluições padrão com diferentes concentrações. O doseamento foi efectuado por absorção espectroscópica no ultravioleta (UV) a 319 nm (Shimadzu UV 160), contra um branco.

Sempre que este método de doseamento foi aplicado foram construídas curvas de calibração com as absorvâncias lidas a 319 nm *versus* concentrações. O método foi validado para o parâmetro de linearidade, tendo esta sido determinada a partir do coeficiente de correlação da curva de calibração, cujo valor de $r=0,999$ indica uma boa linearidade entre a absorvância e a concentração.

2.1.2. Determinação da solubilidade máxima em água purificada

Uma quantidade de produto em excesso foi colocada em 20 ml de água purificada. A suspensão foi submetida a agitação magnética à temperatura ambiente durante 48h, após o que foi deixada em repouso 24h e se procedeu a filtração através de um filtro 0,45 μm (Millipore).

O doseamento foi efectuado por absorção espectrofotométrica no UV a 319 nm (Shimadzu UV 160), tendo sido utilizado como branco ácido hidroclorídrico metanólico a 1:10 (HCl 0,1N metanólico) e construídas curvas de calibração para diluição 1:1 e 1:5 (O'Brien et al, 1984).

2.1.3. Estudo de solubilidade de fases

Estudo efectuado em tampão fosfato pH 4,5 e 7,0 e em água purificada, de acordo com o método de Higuchi e Connors (Figura 20).

Uma quantidade de IM em excesso (50 mg) foi adicionada a 20 frascos rolhados de 50 ml, contendo concentrações crescentes de HP- β -CD (0,005 M a 0,1 M) (valor corrigido de hidratação) dissolvidas em 20 ml de tampão fosfato a pH 4,5 e pH 7,0.

Os frascos foram protegidos da luz e agitados à temperatura ambiente durante 7 dias. De acordo com dados antecedentes, após este período de tempo atinge-se o equilíbrio e o máximo de solubilidade.

As suspensões foram filtradas através de um filtro (Millipore) de 0,45 μm , diluídas adequadamente em ácido hidroclorídrico metanólico (1:10) e o teor de IM determinado por absorção espectrofotométrica no UV a 319 nm (Shimadzu UV 160), tendo sido construídas curvas de calibração para as respectivas diluições.

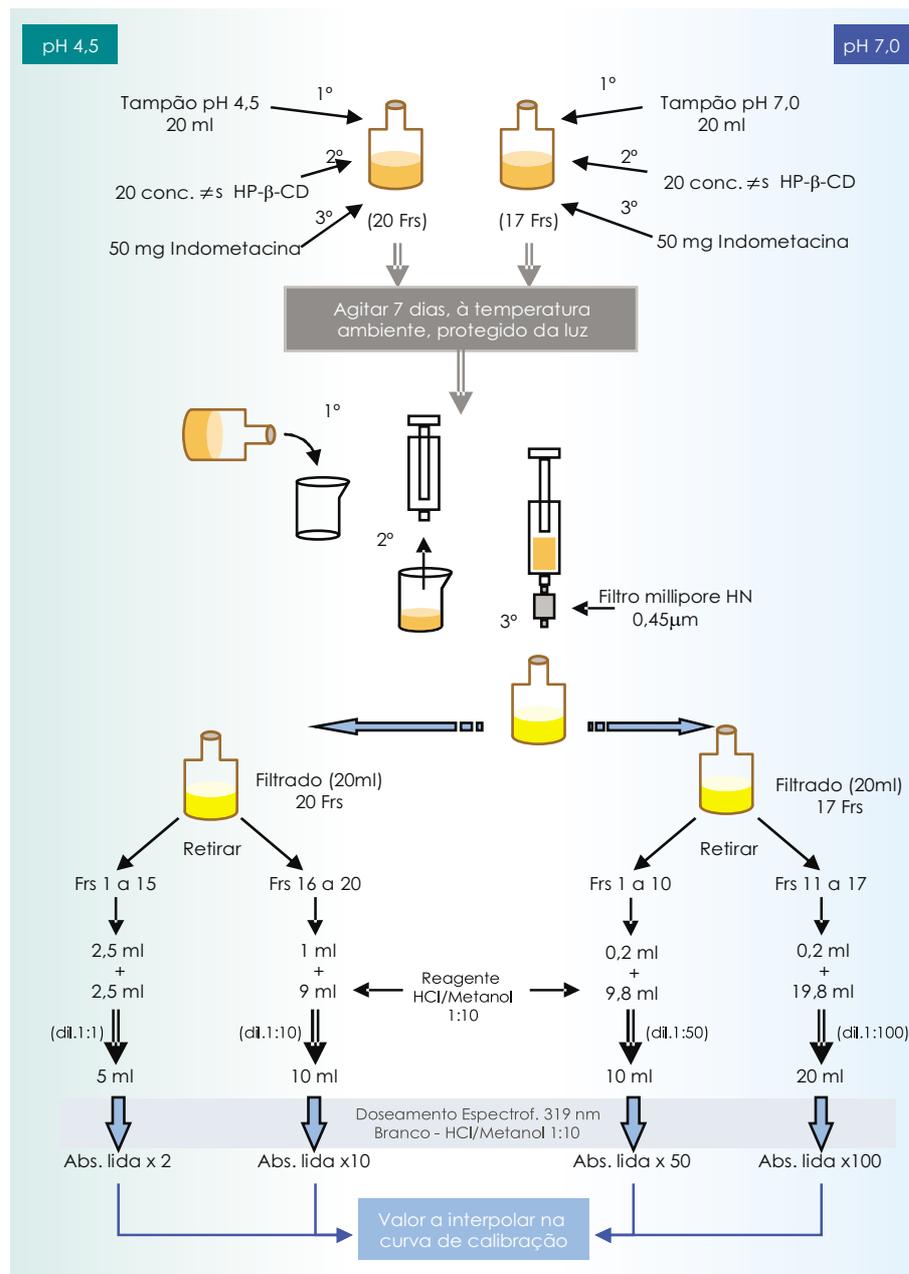


Figura 20. Estudo de solubilidade de fases. Desenho experimental da preparação de amostras e do doseamento espectrofotométrico. **Frs** - Frasco; **dil** - diluição; **Abs** - Absorvância; **≠s** - Diferentes; **conc.** - concentração.

2.1.4. Estequeometria do complexo

A estequeometria do complexo foi determinada com base no valor do declive e no tipo de diagrama o qual segundo Higuchi e Connors, assume uma estequiometria de 1:1, para diagramas tipo A_L e A_N , com declive inferior a 1. O mesmo tipo de diagramas foi obtido nos estudos de outros autores (Backensfeld et al., 1991; Muller e Brauns, 1985)

2.1.5. Determinação da constante de estabilidade

As constantes de estabilidade (K_s) foram calculadas de acordo com a eq. (1), aplicável para a formação de complexos cuja estequeometria é 1:1, com determinação experimental de S_o .

$$K_{s(1:1)} = \text{Declive} / S_o \times (1 - \text{Declive}) \quad (1)$$

Em que S_o , é a solubilidade de equilíbrio do substrato (S), na ausência de ciclodextrina, e o seu valor é determinado pela intercepção da recta de solubilidade com o zero de concentração de ciclodextrina (Backensfeld et al., 1991; Otagiri et al., 1983; Veiga, 1996; Veiga et al., 1996).

2.1.6. Determinação do teor de Indometacina nos complexos

Foi efectuada a adição de uma quantidade 40 mg de cada um dos complexos a 10 ml de tampão fosfato pH 7,0 até se obter uma dissolução completa. O doseamento da IM foi realizado através de leitura da absorção espectrofotométrica no UV a 319 nm, contra um branco de tampão fosfato pH 7,0, utilizando a curva de calibração calculada para uma diluição de 1:50.

2.1.7. Avaliação da influência dos métodos de complexação no estado físico da indometacina e estudo da interação com hidroxipropil- β -ciclodextrina

2.1.7.1. No estado líquido

2.1.7.1.1. Espectrofotometria Ultravioleta

O espectro de absorção da IM no UV foi determinado de acordo com o método anteriormente descrito.

Para o estudo da IM matéria-prima, IM liofilizada e IM submetida a processo de secagem por pulverização, foi utilizado como branco o etanol. A concentração de IM utilizada foi de $8,4 \times 10^{-5}$ M.

Para o estudo do complexo obtido pelo método de secagem por pulverização e por liofilização, foi utilizado como branco o tampão fosfato pH 7,0. A concentração de IM utilizada foi de $5,6 \times 10^{-5}$ M.

As curvas de calibração foram construídas com as absorvâncias lidas a 319 nm *versus* concentrações. O método foi validado para o parâmetro de linearidade.

2.1.7.2. No estado sólido

2.1.7.2.1. Espectroscopia de infravermelhos - *Fourier transform*

infrared (FTIR)

O espectro das amostras foi registado à temperatura ambiente, numa banda de transmitância de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , num espectrómetro modelo Nicolet FTIR: Magma-IR Spectrometer 740, feixe único, com uma fonte global e um detector DTGS com janelas CsJ, acoplado a um computador pessoal, sendo a amostra dispersa numa pastilha de brometo de potássio (KBr).

2.1.7.2.2. Calorimetria de varrimento diferencial

A análise térmica foi efectuada num calorímetro Shimadzu DSC-50. Quantidades de amostra dos produtos em estudo, equivalentes a 2 mg de IM, foram colocadas em cápsula de alumínio aberta em atmosfera de azoto e submetidas a uma velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, de 25 a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, sob um fluxo de azoto de $20 \text{ ml}/\text{min}$. Como referência utilizaram-se cápsulas de alumínio vazias.

2.1.7.2.3. Difrakção de raios-X

O registo dos difractogramas foi efectuado num difractómetro de pó Enraf-Norius, equipado com um detector curvo INEL CPS 120 sensível à posição, tendo sido utilizada radiação Cu-K α_1 , monocromatizada por um cristal curvo de quartzo.

O ensaio foi efectuado nas condições seguintes: com uma voltagem de 50 kV e corrente de 40 mA e com detector fixo, a receber radiação numa amplitude angular de 120 °.

2.2. Avaliação da Biodisponibilidade

2.2.1. Estudos de dissolução

O estudo foi efectuado de acordo com o método de pá agitadora (FP V), à temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, em 1000 ml de tampão fosfato pH 7,2, com uma velocidade de agitação de 75 rpm, em condições *sink*. As amostras (fracção 90-160 μm) contendo 60 mg de IM ou o seu equivalente na mistura física e nos complexos de inclusão, foram adicionadas ao meio de dissolução, sob a forma de pó disperso.

A cinética de dissolução da IM foi determinada num sistema de fluxo contínuo fechado constituído pelo aparelho de dissolução (Hanson Research) conectado a um espectrofotómetro (Shimadzu, UV 160) através de uma bomba peristáltica (Gilson, Miniplus).

A absorvância foi monitorizada contínua e automaticamente a 319 nm durante 420 min. Foi registada a percentagem de fármaco libertado aos 5, 30 e 60 minutos e calculada a eficiência de dissolução nestes tempos.

Foi efectuada a determinação da equação da recta da curva de calibração, para o cálculo de concentração a pH 7,2. O método foi validado para o parâmetro de linearidade. A área sob a curva das diferentes amostras foi calculada através do método dos trapézios (Chowdary e Suresh Babu, 1994; Veiga, 1996). Foram efectuados seis testes de dissolução e calculada a média aritmética \pm desvio padrão.

A monitorização contínua foi utilizada para traçar os perfis de dissolução até aos noventa minutos, com a percentagem de fármaco libertada em função do tempo.

Foi registado o tempo necessário para atingir os 50% ($t_{50\%}$) e os 90% ($t_{90\%}$) da quantidade de IM dissolvida (Chowdary e Suresh Babu, 1994).

2.2.2. Determinação do coeficiente de partilha

O coeficiente de partilha foi determinado utilizando como fase aquosa, tampão fosfato pH 7,0 e 5,5 e como fase oleosa, n-octanol. As amostras dos produtos em análise foram dissolvidas na fase aquosa e determinadas as respectivas concentrações iniciais por espectrofotometria no UV a 319 nm.

As fases foram misturadas por agitação com barra magnética (700 rpm) durante 2 horas à temperatura ambiente, após o que foram sujeitas a centrifugação (3000 rpm/10 min), de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 21.

A concentração final da IM em todas as amostras foi determinada na fase aquosa por leitura da absorvância medida por espectrofotometria no UV a 319 nm. A concentração do fármaco na fase oleosa foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a final na fase aquosa.

Foi efectuada a determinação da equação da recta da curva de calibração, para o cálculo de concentração com os diferentes valores de pH. O método foi validado para o parâmetro de linearidade. A experiência foi efectuada em triplicado e calculada a média aritmética \pm desvio padrão.

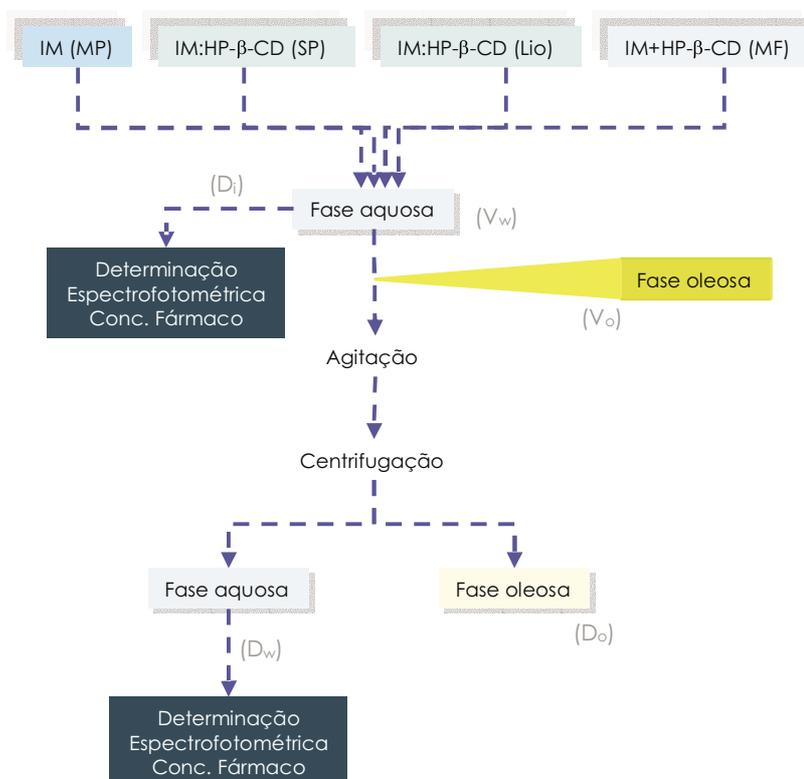


Figura 21. Desenho do estudo do coeficiente de partilha. **MP** - matéria-prima; **SP** - secagem por pulverização; **Lio** - liofilização; **MF** - mistura física; **Di** - Concentração inicial de fármaco na fase aquosa; **Dw** - Concentração final de fármaco na fase aquosa; **Do** - Concentração final de fármaco na fase oleosa; **Vw** - Volume da fase aquosa; **Vo** - Volume da fase oleosa.

O coeficiente de partilha aparente (P^*) foi determinado utilizando a eq. (2) (Buri, 1981; Nakajima et al., 1984) e foi calculado o valor de $\log P^*$:

$$P^* = (D_i - D_w) \times V_w / D_w \times V_o \quad (2)$$

Em que:

D_i = Concentração inicial de fármaco na fase aquosa;

D_w = Concentração final de fármaco na fase aquosa;

$(D_i - D_w)$ = Concentração final de fármaco na fase oleosa (D_o);

V_w = Volume da fase aquosa;

V_o = Volume da fase oleosa.

2.3. Métodos de preparação

Os complexos de inclusão foram obtidos na forma sólida, pelos métodos de secagem por pulverização (SP) e liofilização (Lio), sendo a finalidade de ambas as técnicas a eliminação do solvente das soluções.

2.3.1. Secagem por pulverização

Quantidades estequiométricas 1:1 de IM e HP- β -CD correspondentes a 4 g de IM foram pesadas e dissolvidas respectivamente em etanol a 95% e água purificada. As duas soluções foram misturadas, sob aquecimento em banho-maria a 70 °C.

Procedeu-se à secagem da mistura por pulverização, num *spray-dryer* (Labplant SD05), nas seguintes condições (Lin e Kao, 1989; Lin et al, 1991; Veiga, 1996):

- ❖ Velocidade de fluxo de solução 500 ml/h;
- ❖ Temperatura de entrada 165 °C;
- ❖ Temperatura de saída 87 °C;
- ❖ Pressão de ar de pulverização 1,5 Bar;
- ❖ Velocidade de fluxo de ar 60 m³/h.

2.3.2. Liofilização

Quantidades estequiométricas 1:1 de HP- β -CD e IM correspondentes a 2 g de IM foram pesadas e dissolvidas em 1000 ml de água purificada sob agitação magnética. Foi adicionada amónia a 37%, gota a gota, até completa dissolução da IM.

A solução foi distribuída por seis frascos de cor âmbar e imersa em etanol a -40 °C, durante 30 minutos até completa congelação, tendo seguidamente sido colocada no congelador durante 20h. A solução congelada foi liofilizada em aparelho *Lymph-lock* 6 (Labconco) durante 24h (Habib et al., 1995; Kurozumi et al., 1975; Szejtli e Szente, 1981; Veiga, 1996).

O reagente de Nessler (Merck) foi usado na pesquisa de amónia, não tendo sido encontrados quaisquer resíduos.

2.3.3. Mistura física

A mistura física (MF) foi preparada por incorporação simples de quantidades estequiométricas 1:1 de HP- β -CD e IM (Cabral-Marques, 1990a; Veiga, 1996).

2.3.4. Preparação das amostras de indometacina submetida a processos de secagem por pulverização e liofilização

A IM foi submetida aos mesmos processos que se utilizaram na preparação dos complexos, de forma a estudar a influência daqueles métodos no estado físico do fármaco.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados sob a forma de média aritmética \pm desvio-padrão.

1. ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE FASES

1.1. Diagramas de solubilidade de fases

Considerando a teoria de Higuichi e Connors, o diagrama de solubilidade de fases obtido com o tampão fosfato (Tf) pH 7,0 é do tipo A_N e com o tampão fosfato pH 4,5 e água purificada, do tipo A_L , conforme se pode observar no gráfico da Figura 22.

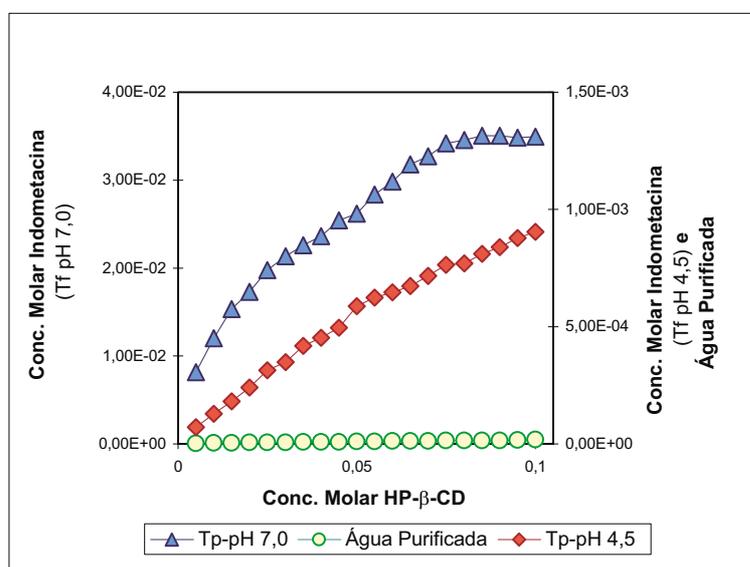
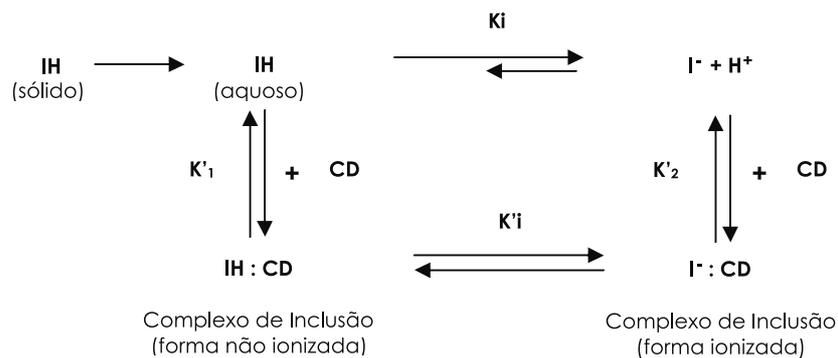


Figura 22. Diagramas de solubilidade de fases da IM com HP-β-CD, a diferentes valores de pH em tampão fosfato e em água purificada. **Tf** - tampão fosfato.

O mesmo tipo de diagramas foi obtido nos estudos de outros autores (Backensfeld et al., 1991; Müller e Brauns, 1985). De acordo com Backensfeld e colaboradores, verifica-se uma diminuição do pH da solução tampão utilizada no seu estudo (Tf pH 7,0), após a adição da HP-β-CD. Esta diminuição é atribuída à baixa capacidade tampão face à concentração de IM resultante do equilíbrio representado na Figura 23.



IH – fármaco na forma não dissociada; I⁻ - fármaco na forma dissociada. Adaptado de Backensfeld et al., 1991.

Figura 23. Modelo cinético do equilíbrio que se estabelece entre as moléculas de complexo com fármaco ionizado e não ionizado.

A concentração de IM observada no eixo das ordenadas é o somatório da solubilidade de saturação e da parte que é complexada pela CD. Se houver uma diminuição do pH da solução com o aumento da concentração de CD, haverá um abaixamento da concentração de saturação da IM devido à influência oposta da constante de dissociação do fármaco ácido. Conseqüentemente, a quantidade total de IM em solução não pode aumentar linearmente.

Para valores superiores de pH, há ainda um ligeiro aumento na concentração de H⁺, mas, para valores mais baixos, o pH inicial mantém-se inalterado, e o comportamento de solubilidade de fase é do tipo A_L. O que também se verifica nos dados experimentais do presente estudo, para o Tf pH 4,5.

1.2. Determinação da constante de estabilidade do complexo

Para os diferentes valores de pH de tampão fosfato e para a água purificada foram obtidas as constantes de estabilidade (K_S) dos complexos. Na Tabela 2 apresentam-se os valores de concentração molar utilizados no cálculo da K_S. Os respectivos valores de declive estão representados graficamente nas Figuras 24, 25 e 26.

Tabela 2. Valores de concentração molar utilizados no cálculo das constantes de estabilidade.

HP- β -CD	Indometacina		
	Tf pH 7,0	Tf pH 4,5	Água Purificada
0,000	0,00257	0,0000457	0,00000181
0,005	0,00814	0,0000705	0,00000237
0,010	0,01204	0,0001280	0,00000331
0,015	0,01537	0,0001820	0,00000437
0,020	0,01731	0,0002410	0,00000533

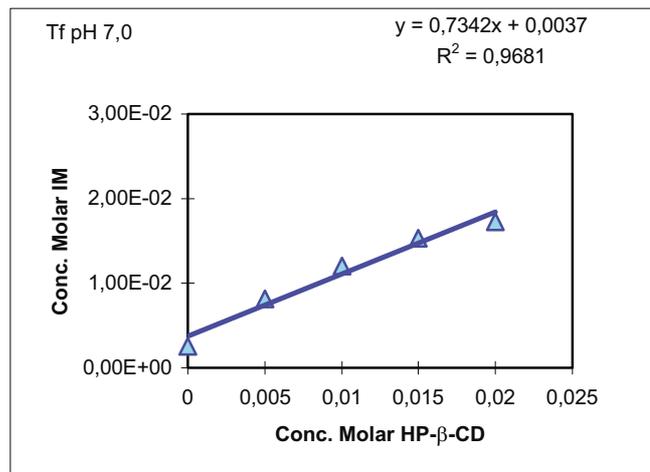


Figura 24. Determinação experimental de S_0 (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em tampão fosfato a pH 7,0.

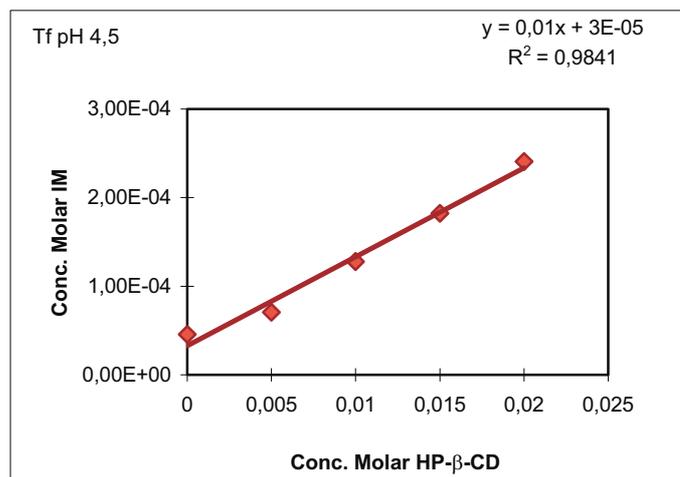


Figura 25. Determinação experimental de S_0 (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em tampão fosfato a pH 4,5.

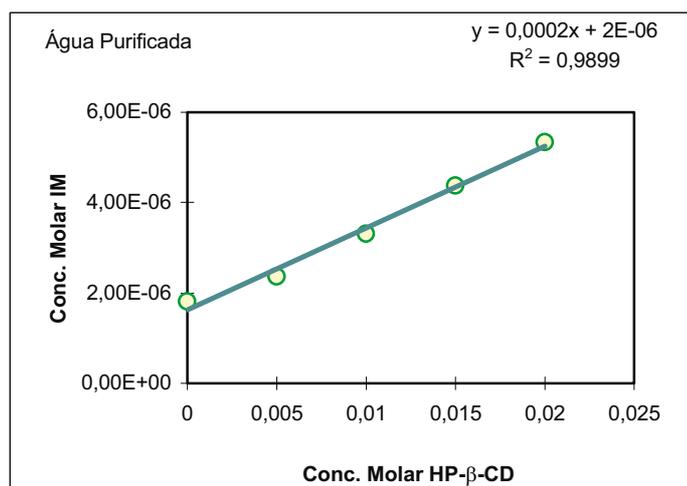


Figura 26. Determinação experimental de S_o (1-Declive) para o cálculo da estabilidade do complexo em água purificada.

As constantes de estabilidade calculadas a partir do declive e da intercepção do diagrama de solubilidade de fases (eq. 1) variam com o valor de pH do tampão e apresentam o menor valor quando é utilizada a água, como se pode observar na Tabela 3.

Tendo em atenção a influência do pH, no efeito que a CD tem no aumento da solubilidade, pode dizer-se que para valores superiores de pH, os valores de saturação de solubilidade e de declive das curvas de solubilidade são maiores. Adicionalmente observa-se um aumento do coeficiente de correlação das curvas com a diminuição de pH, também verificado por Backensfeld e colaboradores (1991).

Tabela 3. Constantes de solubilidade e valores de declive. **CM** - concentração molar.

Meio Diluição	pH	S_o (CM)	K_s (M ⁻¹)	Declive
Tampão Fosfato	7,0	$2,57 \times 10^{-3}$	1074,8	0,7342
Tampão Fosfato	4,5	$4,57 \times 10^{-5}$	221,0	0,01
Água Purificada		$1,81 \times 10^{-6}$	110,5	0,0002

Verifica-se que a constante de estabilidade é influenciada pelo pH do meio, correspondendo uma constante menor ao pH mais ácido, originando assim um complexo mais instável. Este resultado está de acordo com o anteriormente referido na introdução sobre a influência do pH na complexação de fármacos ionizáveis, como é o caso da indometacina (ácido fraco). Os estudos de outros autores revelam que a constante de

estabilidade ($K_{1:1}$) dos complexos de IM calculada a partir do declive e da intercepção do diagrama de solubilidade de fases, é maior na forma não ionizada, com um pH mais básico (Backensfeld et al., 1991; Buri, 1981; Redenti et al., 2000; Stella et al., 1999). Poder-se-á, com base neste pressuposto, e atendendo a que só a forma não ionizada é lipossolúvel, deduzir que, no presente caso, a pH 7,0 estamos perante um complexo predominantemente formado com a IM na forma não ionizada, conseqüentemente mais estável.

O maior valor de K_s regista-se com o tampão fosfato pH 7,0. Este valor de pH é equivalente ao valor do pH do intestino, podendo, com base nos valores encontrados experimentalmente para a IM e nos valores da bibliografia em relação aos ácidos biliares, colocar a hipótese de que haja competição para a formação de complexo com a HP-**b**-CD, entre o deoxicolato (2760 M^{-1}) e o colato de sódio (1000 M^{-1}) com a IM ($1074,8 \text{ M}^{-1}$), provocando o seu deslocamento do complexo para a forma livre e promovendo deste modo a sua absorção (Miyajima et al., 1986).

Os diagramas de solubilidade de fases são muito teóricos para uma aplicação prática directa, pois são estabelecidos depois de ter sido atingido o equilíbrio, após vários dias de agitação. Nesta perspectiva, o estudo da cinética de dissolução dos compostos de inclusão no estado sólido, é um método de eleição, por colocar em evidência, não só a melhoria da solubilidade, mas também a velocidade de dissolução.

1.3. Estequeometria do complexo

De acordo com a teoria de Higuichi e Connors adoptada neste trabalho, os valores de declive obtidos experimentalmente (inferiores a 1) e a análise do gráfico de solubilidade de fases (Figura 22) indicam que a estequeometria dos complexos obtidos é de 1:1.

2. DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE MÁXIMA EM ÁGUA PURIFICADA

Os resultados obtidos evidenciam um aumento da solubilidade da IM em água purificada (Tabela 4), quer por aplicação dos métodos de complexação à IM matéria-prima, quer por obtenção de complexos de inclusão.

Tabela 4. Solubilidade máxima em água purificada. **IM/MP** = matéria-prima; **CSP** = complexo preparado pelo método de secagem por pulverização; **CLio** = complexo preparado por liofilização; **IM/MF** = mistura física.

	IM/MP	IM/SP	IM/Lio	CSP	CLio	IM/MF
Concentração (mg/ml)	$8,62 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$4,08 \times 10^{-3}$	$2,78 \times 10^{-3}$	$7,59 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$

O método de liofilização é o processo que mais contribui para o aumento da solubilidade.

A Figura 27 representa esquematicamente a proporção de aumento de solubilidade que se estabelece entre as várias amostras por influência pela complexação e pela aplicação dos métodos de preparação de complexos à IM.

Em relação à IM matéria-prima, o complexo de inclusão obtido através de liofilização (CLio) é 8,81 vezes mais solúvel, seguido de IM liofilizada (4,73), CSP (3,23), IM submetida a processo de secagem por pulverização (1,36) e por último da mistura física (1,18).

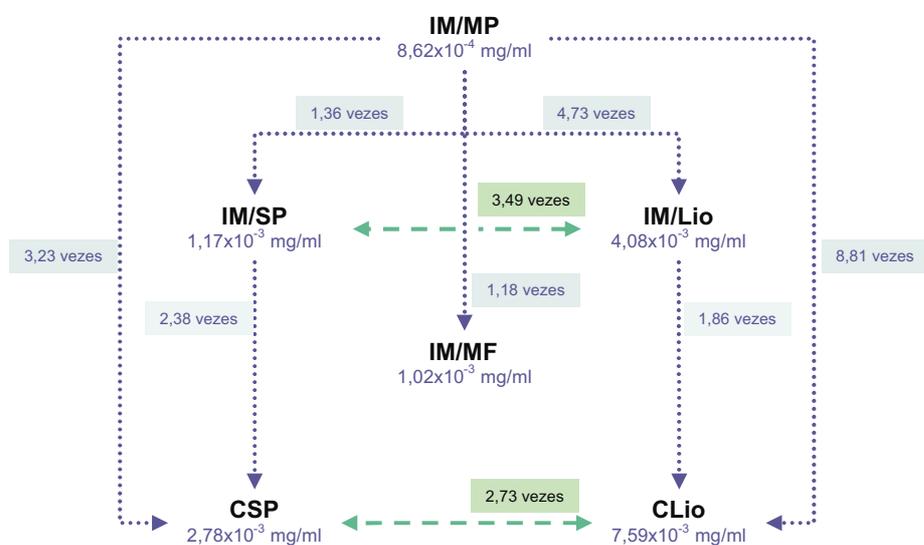


Figura 27. Influência dos métodos de complexação e de preparação de complexos na solubilidade máxima da IM matéria-prima em água purificada. **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/SP** - IM submetida a processo de secagem por pulverização; **IM/Lio** - IM submetida a processo de liofilização; **CSP** - complexo obtido através de secagem por pulverização; **CLio** - complexo obtido através de liofilização; **IM/MF** - mistura física.

O processo de complexação por liofilização confere uma solubilidade 1,86 vezes superior relativamente à IM matéria-prima quando submetida ao mesmo processo, o mesmo acontecendo em relação ao processo de complexação através de secagem por pulverização, que confere uma solubilidade 2,38 vezes superior em comparação com a IM matéria-prima submetida a este processo de complexação.

Os estudos de difractometria de raios-X e calorimetria de varrimento diferencial efectuados comprovam que ocorrem alterações no estado físico da molécula de IM, como evidenciado neste estudo. O processo de liofilização induz à passagem do estado cristalino ao estado amorfo, enquanto que o processo de secagem por pulverização promove a passagem do polimorfo Forma I ao polimorfo Forma II, contribuindo assim para a alteração da solubilidade verificada (Brittain, 2002). Quando se aplicam estes processos à preparação de complexos de inclusão, os produtos finais apresentam um estado amorfo para o CLio e uma diminuição da cristalinidade para o CSP, o que também conduz a um aumento de solubilidade.

A mistura física simples da IM com a HP- β -CD, apresenta melhor solubilidade do que a da IM matéria-prima, o que pode ser explicado pela acção solubilizante local da CD que tem carácter amorfo e pelas proporções variáveis de composto de inclusão que possam existir em equilíbrio (Brittain, 2000; Duchêne e Wouessidjewe, 1990c; Hamada et al., 1975; O'Brien et al., 1984).

Segundo Müller e Brauns (1986), uma HP- β -CD com um grau de SM superior contribui para um maior aumento da solubilidade da IM. De acordo com esta probabilidade, seria útil, em estudos futuros, comparar o efeito solubilizante da HP- β -CD com diferentes graus de SM, na perspectiva de conseguir uma ainda melhor capacidade solubilizante.

3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INDOMETACINA NOS COMPLEXOS

Os valores percentuais do teor de IM nos complexos obtidos por doseamento espectrofotométrico a 319 nm são de:

- ❖ 24,3% por aplicação do método de secagem por pulverização;
- ❖ 17,29% por aplicação do método de liofilização.

Sendo o valor percentual teórico para uma estequiometria 1:1 de 21,58%, os valores encontrados mostram que o complexo de inclusão obtido pelo método de secagem por pulverização tem um teor de IM superior ao do método de liofilização, mantendo-se no entanto ambos numa margem de valores compatível com a estequiometria de 1:1.

A maior percentagem de IM no complexo obtido pelo método de secagem por pulverização pode ser devida à existência de IM adsorvida à superfície da CD (Lin et al., 1991).

4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE COMPLEXAÇÃO NO ESTADO FÍSICO DA INDOMETACINA

4.1. No estado líquido

4.1.1. Espectrofotometria Ultravioleta

A formação de complexos de inclusão induz muitas vezes alterações relativamente pequenas, as quais podem ser observadas no espectro UV das moléculas-hóspedes. As alterações da absorção máxima, quando se formam complexos, podem ser explicadas pelo escudo protector parcial, que a cavidade das CDs confere aos electrões excitáveis (Szejtli, 1988).

Podem ocorrer diversos tipos de alterações na excitabilidade dos electrões de uma molécula, que se traduzem em modificações do seu espectro de absorção. As alterações na intensidade de absorção podem ser do tipo hipercrómico, quando se verifica um aumento de intensidade, ou hipocrómico, quando ocorre uma diminuição; as alterações do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), podem ser do tipo hipsocrómico, quando existe desvio do $\lambda_{\text{máx}}$ para comprimentos de onda menores ou batocrómico quando o desvio é para comprimentos de onda superiores (Raghavan e Joseph, 2002).

O espectro de absorção da indometacina no UV, de acordo com a USP XX, é máximo a 319 nm.

Nos espectros de absorção da Figura 28, observam-se diferentes valores de absorção máxima para a indometacina matéria-prima e após ser tratada pelos métodos utilizados na preparação de complexos.

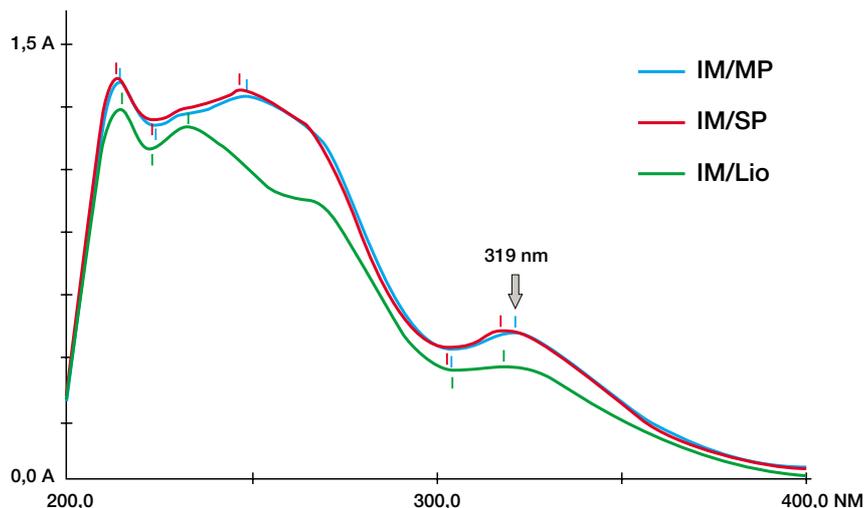


Figura 28. Espectro de absorção no ultravioleta de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/SP** - IM submetida a processo de secagem por pulverização; **IM/Lio** - IM submetida a processo de liofilização.

Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ encontrados experimentalmente para a IM/MP, IM/Lio e IM/SP, são respectivamente de 319,4 nm, 318,4 nm e 318,8 nm.

No espectro da IM/Lio, no que respeita à intensidade de absorção, observa-se um efeito hipocrómico e hipsocrómico mais marcado na zona do pico dos 248 nm, que pode ser atribuído à passagem ao estado amorfo com diminuição da excitabilidade dos electrões, e ao mesmo tempo um efeito hipsocrómico e hipocrómico na zona do $\lambda_{\text{máx}}$, alterando-o para um valor menor mas dentro da gama de valores aceite para a IM (O'Brien et al., 1984).

A análise do espectro da IM/SP, mostra que a alteração da cristalinidade que ocorre na IM submetida a processo de secagem por pulverização, promovendo a sua passagem ao polimorfo Forma II, não tem grande influência no espectro, observando-se somente um ligeiro efeito hipsocrómico do $\lambda_{\text{máx}}$.

Este resultado evidencia que os métodos de secagem utilizados não alteram significativamente o espectro de absorção da IM no que respeita à intensidade e comprimento de onda máximo (319 nm), não influenciando assim as propriedades espectrais da molécula.

4.2. No estado sólido

4.2.1. Espectroscopia de infravermelhos - FTIR

O diagrama do espectro de infravermelhos comprova a manutenção das principais bandas de transmitância específicas da IM após o tratamento pelos dois métodos de complexação (Figura 29).

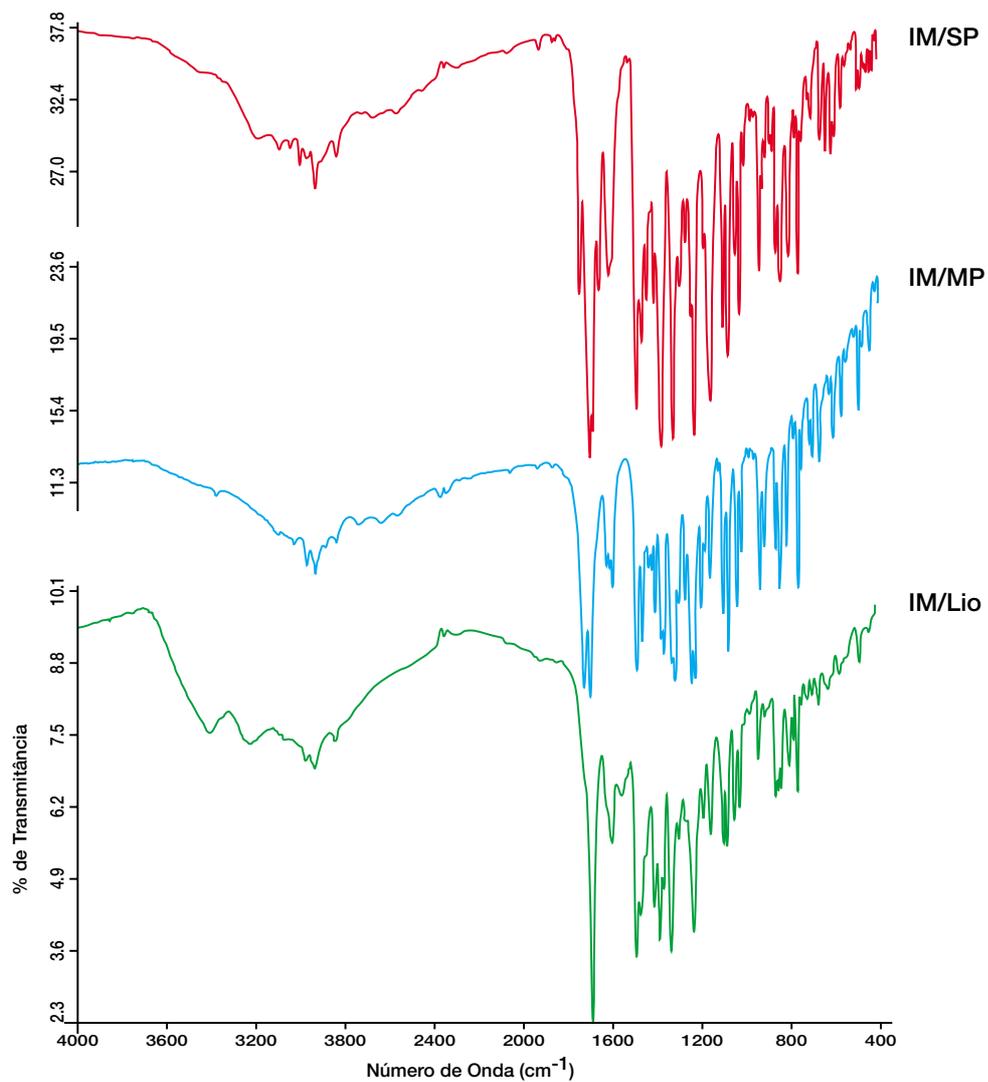


Figura 29. Espectro de infravermelhos (FTIR) de: IM sujeita a processo de liofilização (IM/Lio); IM sujeita a processo de secagem por pulverização (IM/SP); IM matéria-prima tal como recebida (IM/MP).

O espectro de absorção no infravermelho apresenta as principais frequências vibracionais características dos grupos químicos funcionais da IM/MP (O'Brien et al., 1984):

- ❖ Elongação C-H (aromático) e O-H (ácido carboxílico) - 3400-2500 cm^{-1}
- ❖ Elongação C=O - 1715 cm^{-1} ; 1695 cm^{-1}
- ❖ Elongação C=C aromático - 1600 cm^{-1}
- ❖ Deformação O-CH₃ - 1450 cm^{-1}
- ❖ Elongação (C-O) e Deformação O-H - 1230 cm^{-1}
- ❖ Deformação do O-H carboxílico fora do plano - 925 cm^{-1}
- ❖ Deformação de vários C-H fora do plano por aromáticos substituídos - 900-600 cm^{-1}
- ❖ C-Cl - 750 cm^{-1}

Na IM/SP observam-se diferenças na elongação do grupo carbonilo que apontam para a existência de polimorfismo conformacional ou estrutural (Brittain, 2000).

Na IM/Lio as alterações de elongação e deformação do grupo carbonilo, podem ser atribuídas à passagem ao estado amorfo (Brittain, 2000).

A análise destes resultados evidencia influência dos métodos de secagem nos comprimentos de onda dos grupos químicos funcionais, como resultado de alterações da cristalinidade da IM.

4.2.2. Calorimetria de varrimento diferencial

A CVD foi utilizada por ser um método que permite obter, entre outros parâmetros, temperaturas e entalpias de fusão com acuidade e fiabilidade. A estabilidade termodinâmica dos polimorfos e a formação de complexos, podem ser determinadas com base na temperatura e entalpia de fusão dos fármacos (Brittain, 2002).

Quando ocorre uma alteração sob acção do calor, é absorvida energia térmica, ocasionando uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência. Esta diferença é avaliada por um detector, sendo proporcional ao fluxo de calor que se estabelece (expresso em mW) e registado *versus* a temperatura em °C.

Os valores das medidas efectuadas de acordo com a metodologia descrita mostram (Tabela 5 e Figura 30) que os processos de secagem utilizados na preparação

dos complexos induzem alterações no estado da estrutura molecular da IM, levando à obtenção de uma forma polimórfica e à passagem ao estado amorfo (Borka, 1974; O'Brien et al., 1984).

O método de secagem por pulverização transforma a IM matéria-prima correspondente ao polimorfo Forma I, no polimorfo Forma II, enquanto que o método de liofilização provoca a passagem do estado cristalino ao estado amorfo (Kurosumi et al., 1995; Vromans e Schalks, 1994). Este resultado, como anteriormente referido, explica o aumento de solubilidade induzido por estes métodos.

Tabela 5. Picos endotérmicos da IM matéria-prima e após ser submetida a processos de secagem por pulverização e por liofilização. IM/MP - IM matéria-prima; IM/SP - IM submetida a processo de secagem por pulverização; IM/Lio - IM submetida a processo de liofilização.

Amostra	Pico Endotérmico (°C)	Observações
IM/MP	161,37	Pico endotérmico muito intenso (-5,093 mW/mg) correspondente ao polimorfo Forma I (160-161,5 °C).
IM/SP	155,61	Pico endotérmico muito intenso (-6,156 mW/mg) correspondente ao polimorfo Forma II (154-155,5 °C).
IM/Lio	55-57; 92	Sem pico endotérmico nos intervalos de temperatura descritos na bibliografia para os diferentes polimorfos. Aparecimento de picos endotérmicos pouco pronunciados entre 55-57 °C e 92 °C (-0,678 mW/mg).

A observação dos termogramas revela o aparecimento do polimorfo Forma II característico da IM, quando a Forma I da IM é submetida a processos de secagem por pulverização. Tal como descrito na bibliografia, a IM exhibe diferentes polimorfos entre os quais a Forma II, com o pico endotérmico característico situado entre 152 e 155,5 °C (O'Brien et al., 1984).

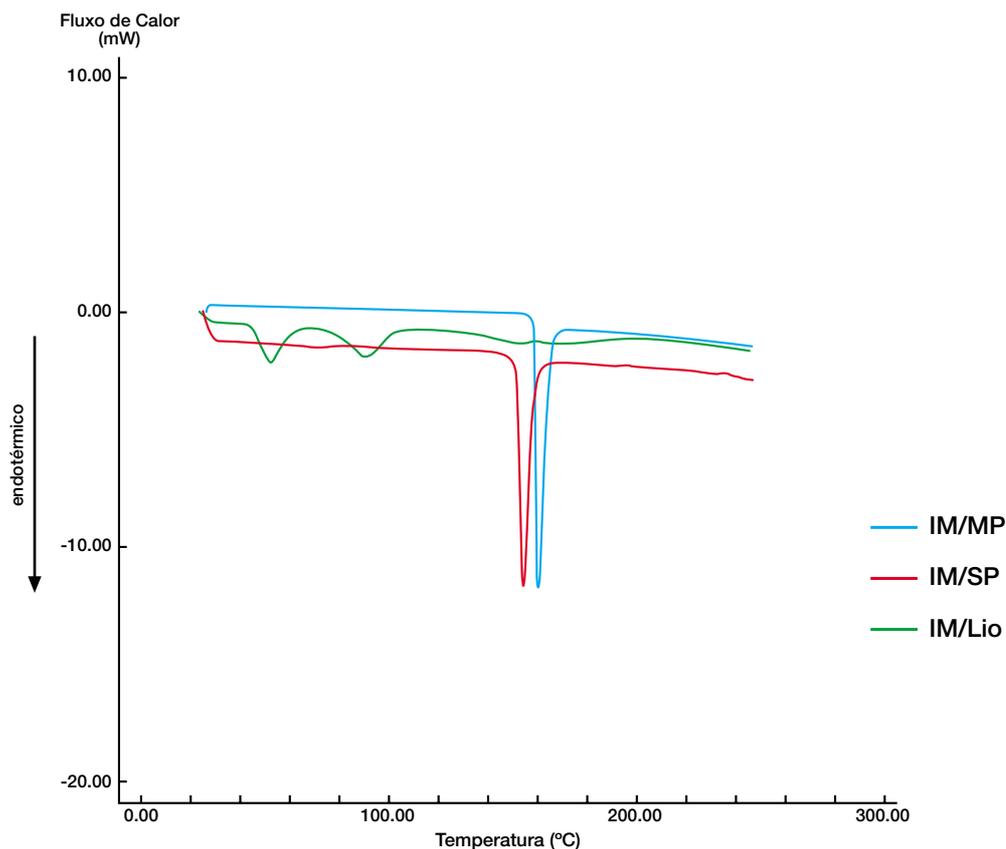


Figura 30. Termogramas de CVD de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/SP** - IM submetida a processo de secagem por pulverização; **IM/Lio** - IM submetida a processo de liofilização.

O processo de liofilização conduz à passagem ao estado amorfo, como referido por alguns autores, e visível no termograma pelo desaparecimento do pico endotérmico, com aparecimento de picos endotérmicos pouco profundos entre 55-57 °C e aos 92 °C. Estes picos evidenciam alguma forma de ordenação das moléculas, o que implica alguma cristalinidade remanescente, a qual, segundo Borka (1974), é característica da forma amorfa. Adicionalmente ao polimorfismo, a IM é também conhecida por formar solvatos com o benzeno e outros solventes, o que poderá também ser uma justificação para os picos observados no termograma da IM submetida a processo de liofilização (Borka, 1974; Lin, 1992; O'Brien, 1984).

4.2.3. Difrração de raios-X

A difrração de raios-X é um dos métodos de análise de referência na identificação de alterações na cristalinidade dos compostos, permitindo identificar polimorfos e produtos que passam ao estado amorfo (Brittain, 2002).

Os padrões de difractometria de raios-X, evidenciam também as modificações da estrutura da IM quando submetida a processos de secagem (Figura 31).

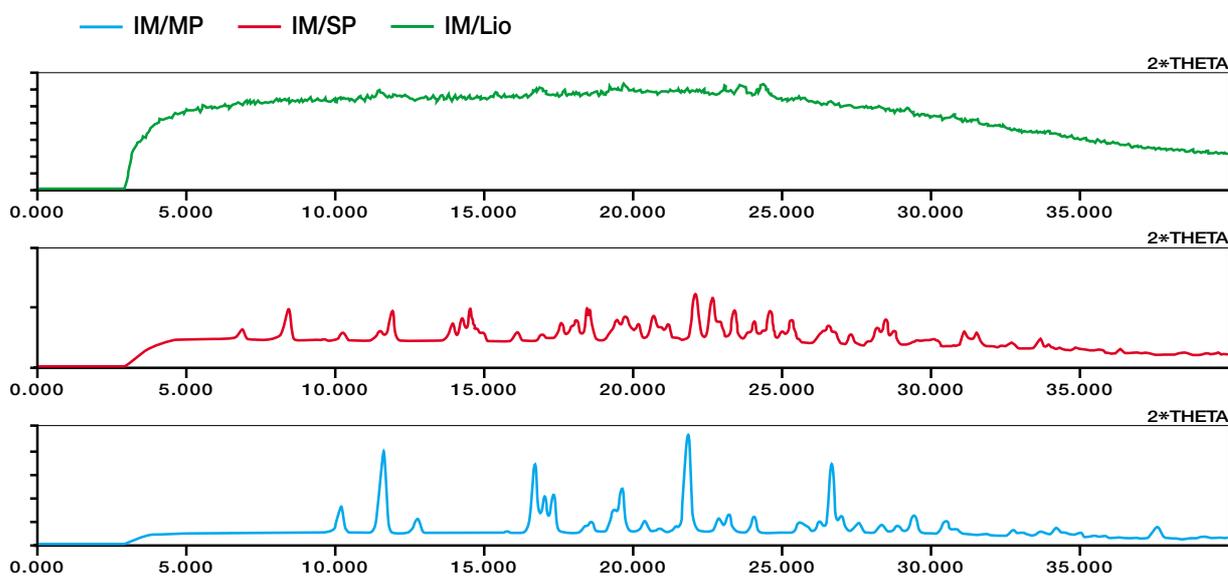


Figura 31. Difractogramas de raios-X de: IM matéria-prima (IM/MP) (polimorfo Forma I); IM submetida a processo de secagem por pulverização (IM/SP) (polimorfo Forma II); IM submetida a processo de liofilização (IM/Lio).

O perfil obtido para a IM matéria-prima, coincide com o perfil do polimorfo Forma I descrito na bibliografia (O'Brien et al., 1984), já anteriormente apresentado na caracterização da IM.

A IM submetida a processo de liofilização apresenta uma estrutura amorfa, como consequência do tratamento por este método. Observa-se contudo que o padrão não é completamente linear, evidenciando alguns picos que indiciam alguma forma de cristalinidade ainda existente. Este resultado está em consonância com o resultado obtido na calorimetria de varrimento diferencial e com o maior aumento de solubilidade verificado quando se submete a IM ao tratamento por este método, sendo 4,73 vezes mais solúvel do que a IM matéria-prima.

Na IM submetida a processo de secagem por pulverização, observa-se uma alteração da cristalinidade. De acordo com a bibliografia (O'Brien et al., 1984), os graus theta (θ) correspondentes aos picos de emissão são sugestivos da obtenção de um outro polimorfo, a Forma II (4,9; 6,9; 8,8; 10,2; 11,4; 11,9; 13,9; 14,2; 14,5; 14,7; 14,9; 16,1; 17,5; 18,0; 18,9; 19,0; 19,7; 20,2; 20,6; 21,1; 22,0; 22,6; 23,4; 24,0; 24,5; 24,9; 25,3; 26,3; 27,2; 28,4; 31,0°). Este resultado está igualmente de acordo com o obtido na calorimetria de varrimento diferencial e com o aumento de solubilidade verificado, quando se submete a IM ao tratamento por este processo.

5. ESTUDO DA INTERACÇÃO DA IM COM A HP- β -CD

A existência de um complexo de inclusão no estado líquido, não garante a existência do mesmo complexo no estado sólido. Deste modo, após a separação do produto no estado sólido, é necessário determinar se existe um verdadeiro complexo ou uma simples mistura física, devendo ser efectuados testes quer no estado líquido, quer no sólido.

5.1. No estado líquido

5.1.1. Espectrofotometria ultravioleta

A observação do espectro de absorção dos complexos obtidos pelos dois métodos utilizados (Figura 32) evidencia a manutenção do pico a 319 nm, característico da IM.

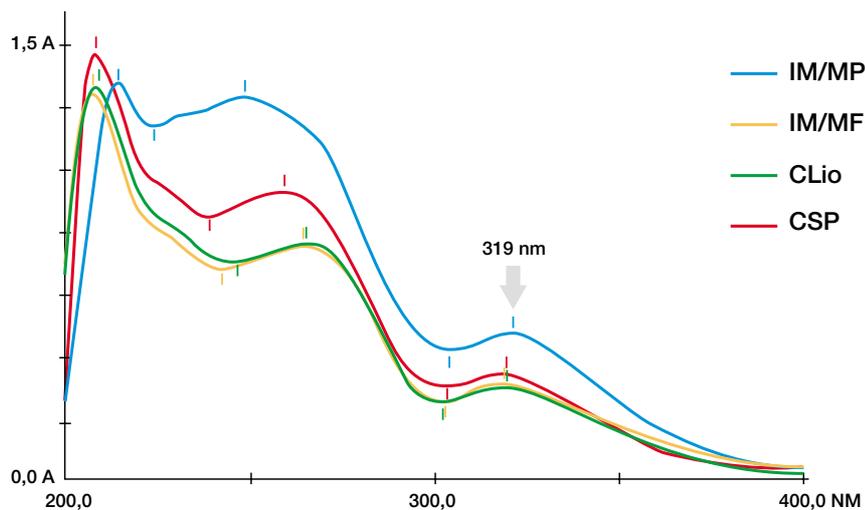


Figura 32. Espectro de absorção no ultravioleta de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/MF** - IM mistura física; **CLio** - complexo obtido através de liofilização; **CSP** - complexo obtido através de processo de secagem por pulverização.

É visível um efeito hipocrómico e hipsocrómico, com zonas mais ou menos marcadas, na intensidade de absorção em todos os produtos ao longo de todo o espectro. Contudo, todos os produtos mantêm o comprimento de onda a 319 nm característico da IM.

Estas modificações induzidas na absorvância são atribuídas primariamente à formação de complexos de inclusão. As alterações na intensidade do pico são assumidas como resultantes de modificações no microambiente do solvente após inclusão do soluto, podendo também ser resultado da transferência da molécula-hóspede do solvente para a cavidade da CD. Isto é razoável dado não haver grupos doadores de prótons dentro da cavidade da molécula da CD (Ismail, 1991; Moyano, 1995; Szejtli, 1989).

Este resultado evidencia que nenhum dos processos de complexação interfere com o λ_{max} da IM, que existem diferenças na excitabilidade dos electrões, podendo a alteração no traçado dos espectros ser sugestiva da formação de complexos (Becirevic-Lacan, 1994; Cabral-Marques, 1994c; Otagiri et al., 1983).

5.2. No estado sólido

5.2.1. Espectroscopia de infravermelhos - FTIR

No diagrama do espectro de infravermelhos do complexo obtido por liofilização (Figura 33), podemos observar uma variação no comprimento da banda de transmitância característica da elongação do grupo carbonilo (1715 cm^{-1} ; 1695 cm^{-1}), da elongação C=C aromático (1600 cm^{-1}), da deformação O-CH₃ (1450 cm^{-1}) e da banda considerada por O'Brien e colaboradores (1984), como sendo possivelmente característica da ligação C-Cl (750 cm^{-1}), mantendo-se as bandas características da ciclodextrina com o método de preparação por liofilização. Observa-se a manutenção das bandas características da HP- β -CD.

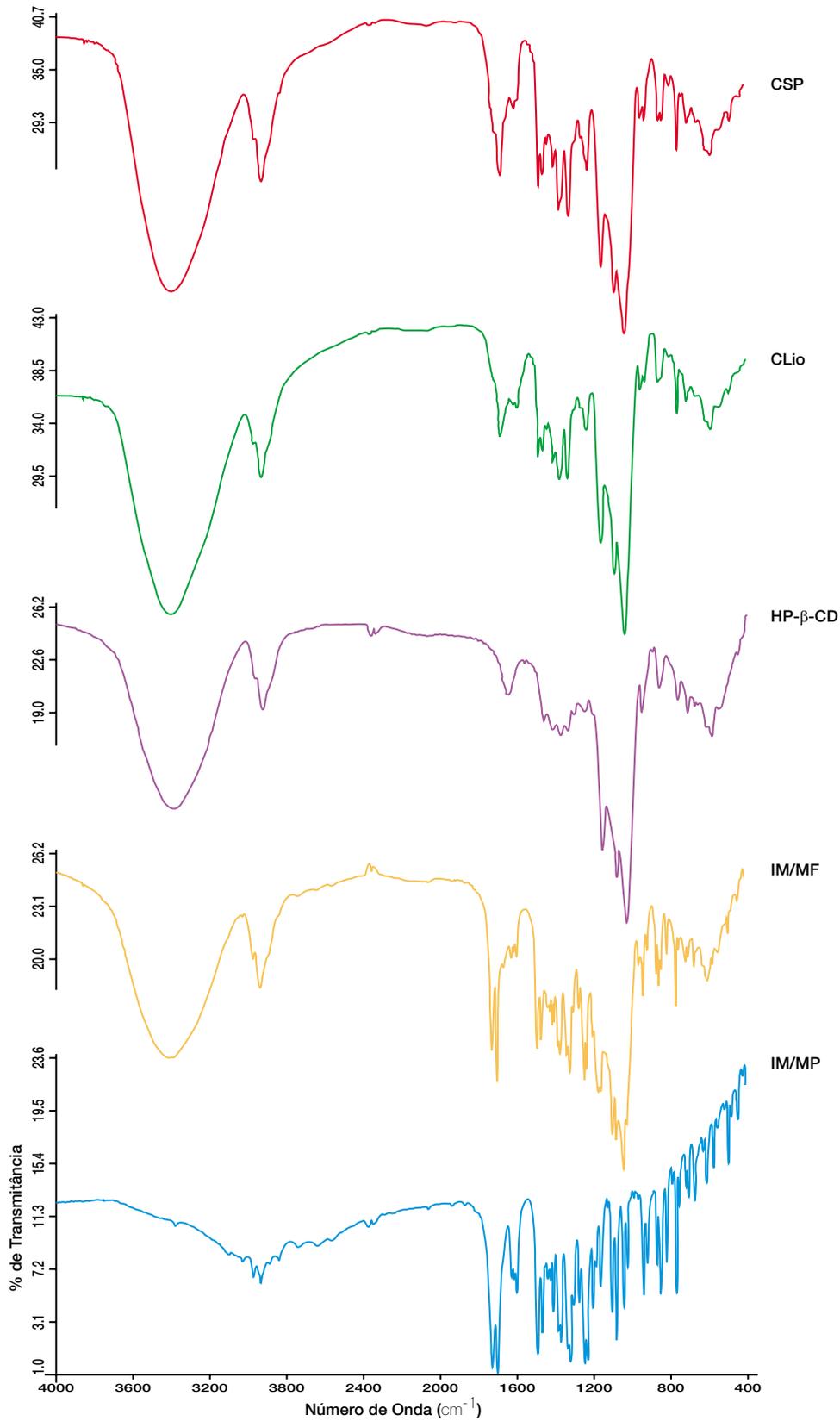


Figura 33. Espectro de infravermelhos (FTIR) de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/MF** - IM mistura física; **CLio** - complexo obtido através de liofilização; **CSP** - complexo obtido através de processo de secagem por pulverização; **HP-b-CD** - hidroxipropil-b-ciclodextrina.

O diagrama obtido para o complexo preparado pelo método de secagem por pulverização, evidencia alterações semelhantes às observadas para o complexo preparado por liofilização.

Por outro lado, a mistura física mostra a presença de bandas características quer da IM quer da HP- β -CD.

Este resultado evidencia a existência de interação entre a IM e a HP- β -CD, reveladora da formação de complexos de inclusão, conquanto não seja possível sugerir qual a parte da IM que sofre inclusão, pois ocorre o desaparecimento de todas as bandas características dos grupos funcionais quer da parte p-clorobenzeno, como referido na bibliografia por alguns autores (Backensfeld et al., 1990 e 1991; Hamada et al., 1975; Kurozumi et al., 1975; Lin et al., 1991; Redenti et al., 2001), quer da parte indol, sugerida por outros (Djedaini et al., 1990).

Para a identificação mais exacta de qual a parte incluída, seria necessário proceder a outros estudos que possibilitassem obter informação sobre a geometria e a estrutura dos compostos de inclusão, como por exemplo a ressonância magnética nuclear ou a modelação computacional.

5.2.2. Calorimetria de varrimento diferencial

Os resultados deste método de avaliação da existência de interação entre a IM e a HP- β -CD encontram-se sintetizados na Tabela 6 e patentes nos termogramas da Figura 34.

Tabela 6. Síntese dos dados da análise por calorimetria de varrimento diferencial da IM mistura física, da hidroxipropil- β -ciclodextrina e dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização e por liofilização.

Amostra	Pico Endotérmico (°C)	Observações
<i>CSP</i>	152,30	Apresenta um pico endotérmico a uma temperatura inferior e de fraca intensidade (-0,1485 mW/mg). Observa-se no termograma a desidratação característica da ciclodextrina, por volta dos 60 °C.
<i>CLio</i>	sem pico	Sem pico endotérmico. Observa-se a desidratação característica da ciclodextrina.
<i>HP-β-CD</i>	sem pico	Observa-se a desidratação característica da ciclodextrina por volta dos 60 °C.
<i>MF</i>	162,49	Apresenta pico endotérmico no intervalo de temperatura característico do polimorfo Forma I, com intensidade relativa (-0,399 mW/mg). Observa-se a desidratação característica da ciclodextrina.

A análise dos termogramas evidencia:

- a. O aparecimento de um pico endotérmico alargado cerca dos 60 °C devido a desidratação, e que é característico da HP- β -CD (Moyano et al., 1994; Veiga et al., 1996), o qual se mantém nos termogramas da IM submetida a processo de liofilização e secagem por pulverização e na mistura física;
- b. O total desaparecimento no complexo preparado através do método de liofilização, do pico endotérmico característico da Forma I (161,37 °C). O desaparecimento pode ser atribuído à formação de um verdadeiro complexo de inclusão (Cabral-Marques et al., 1990). O estado amorfo, evidenciado por difractometria de raios-X (Figura 31), pode, segundo alguns autores (Kurozumi et al., 1975), ser responsável pela ausência do pico endotérmico a 161,37 °C; contudo, observa-se o desaparecimento dos picos endotérmicos pouco profundos entre 55-57 °C e aos 92 °C, obtidos por aplicação do método à amostra de IM/MP, patentes na Figura 26 e ao mesmo tempo o aparecimento do pico endotérmico alargado, cerca dos 60 °C, característico da HP- β -CD, o que leva a deduzir que existe formação de um verdadeiro complexo de inclusão pelo método de liofilização;
- c. Uma grande redução da intensidade do pico endotérmico correspondente ao polimorfo Forma II (-6,156 mW/mg), acompanhada de uma redução de temperatura à qual ocorre o pico (155,61 °C), no complexo preparado através do método de secagem por pulverização. Esta redução da temperatura de ponto de fusão está de acordo com os dados obtidos para a IM submetida a processo de secagem por pulverização, tratando-se neste caso da passagem da IM Forma I, ao polimorfo Forma II, tal como já anteriormente descrito. A intensidade ainda evidenciada com o método de secagem por pulverização, pode ser atribuída à existência de IM adsorvida à superfície da CD. Lin e colaboradores (1991) observaram também a transformação da IM no polimorfo Forma II quando complexada pelo método de secagem por pulverização. Todavia, após lavagem do complexo com acetona, este pico endotérmico desaparece, o que pode ser atribuído à eliminação da IM adsorvida na ciclodextrina, tendo sido comprovada a existência desta na solução de acetona;

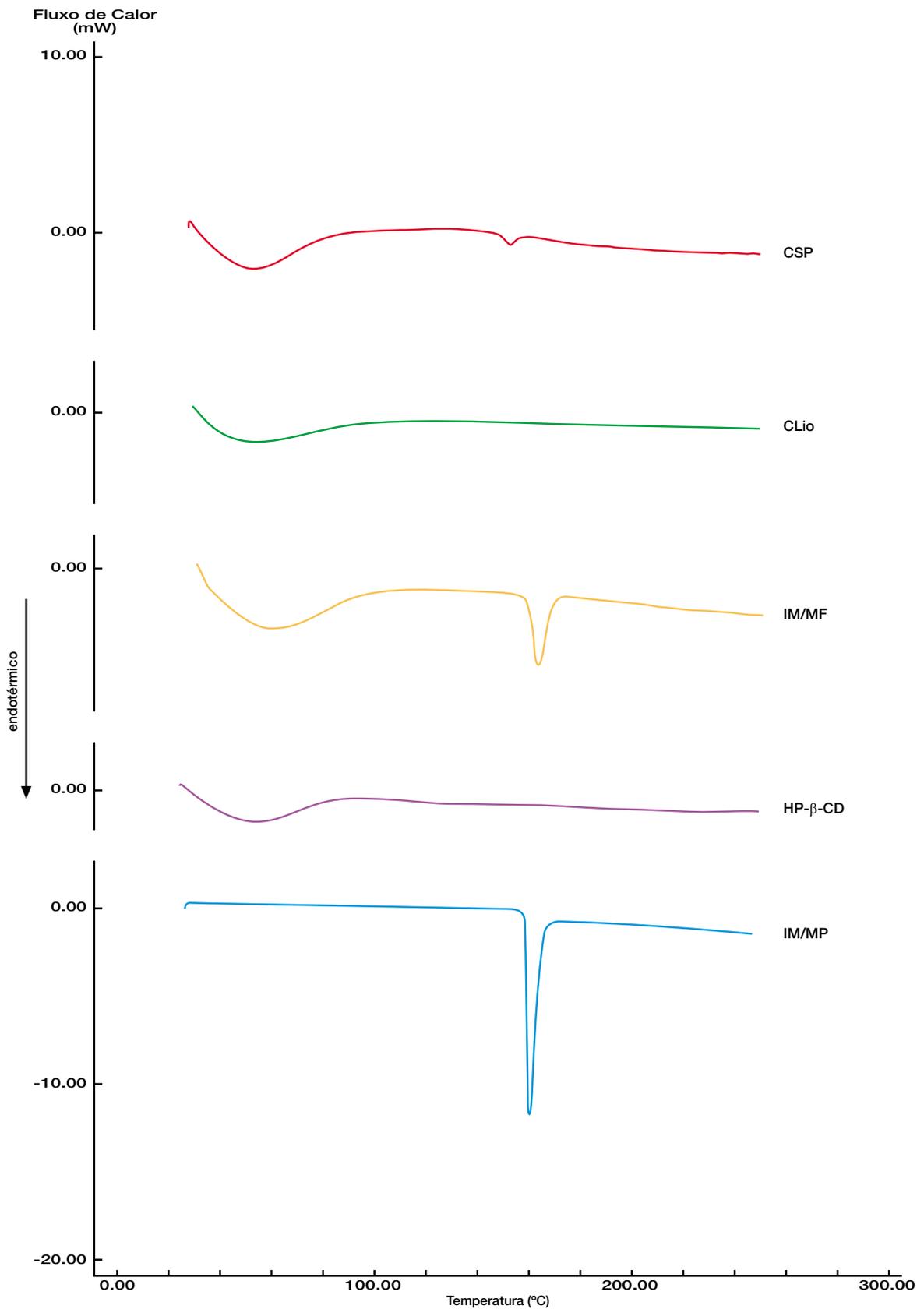


Figura 34. Termogramas de CVD de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/MF** - IM mistura física; **CLio** - complexo obtido através de liofilização; **CSP** - complexo obtido através de processo de secagem por pulverização; **HP-b-CD** - hidroxipropil-b-ciclodextrina.

d. O termograma da mistura física mostra um pico endotérmico a 162,49 °C, o qual, em relação ao pico da IM/MP está deslocado e é de menor intensidade. Observa-se igualmente o aparecimento do pico endotérmico alargado, cerca dos 60 °C, característico da HP- β -CD. Este perfil evidencia a existência de uma interacção fraca entre a IM e a HP- β -CD (Erden e Çelebi, 1988).

Alguns autores referem não ser possível confirmar a formação de complexos de inclusão pelo método de liofilização, devido à passagem ao estado amorfo (Duchêne e Wouessidjewe, 1990c; Veiga et al., 1996). Contudo, nas condições da experiência efectuada, e se tomarmos como termo de comparação os diagramas da IM isolada e sujeita a processo de complexação por liofilização, poderemos comprovar as diferenças acima referidas no item (b.), as quais poderão ser reveladoras da formação de complexo.

Assim, a análise dos resultados obtidos indica a existência de interacção entre a IM e a HP- β -CD, sugestiva da formação de complexos resultantes da inclusão parcial da molécula de IM na HP- β -CD, quer pelo método de liofilização, quer pelo de secagem por pulverização.

5.2.3. Difracção de raios-X

Os difractogramas de raios-X, obtidos para os diferentes produtos em estudo, estão patentes na Figura 35.

Podemos observar que o perfil de HP- β -CD revela a sua estrutura amorfa. A elevação verificada por volta dos 20 ° q assinala a existência de alguma ordenação das moléculas, também evidenciada pelo perfil do termograma da calorimetria de varrimento diferencial.

O perfil da mistura física apresenta picos característicos do polimorfo Forma I (10,2; 11,6; 12,8; 16,7; 17,0; 17,3; 18,6; 19,3; 19,6; 20,3; 20,9; 21,8; 22,9; 23,2; 24,0; 25,5; 26,6; 27,5; 28,3; 28,9; 29,4; 30,4; 33,6; 34,2; 34,8; 37,5°), apresentando os picos menor intensidade. Observa-se também em fundo o perfil de linearidade característico do estado amorfo da HP- β -CD, mantendo mesmo a ligeira elevação próximo dos 20 ° q . Está assim reflectida no perfil, a individualidade dos dois compostos.

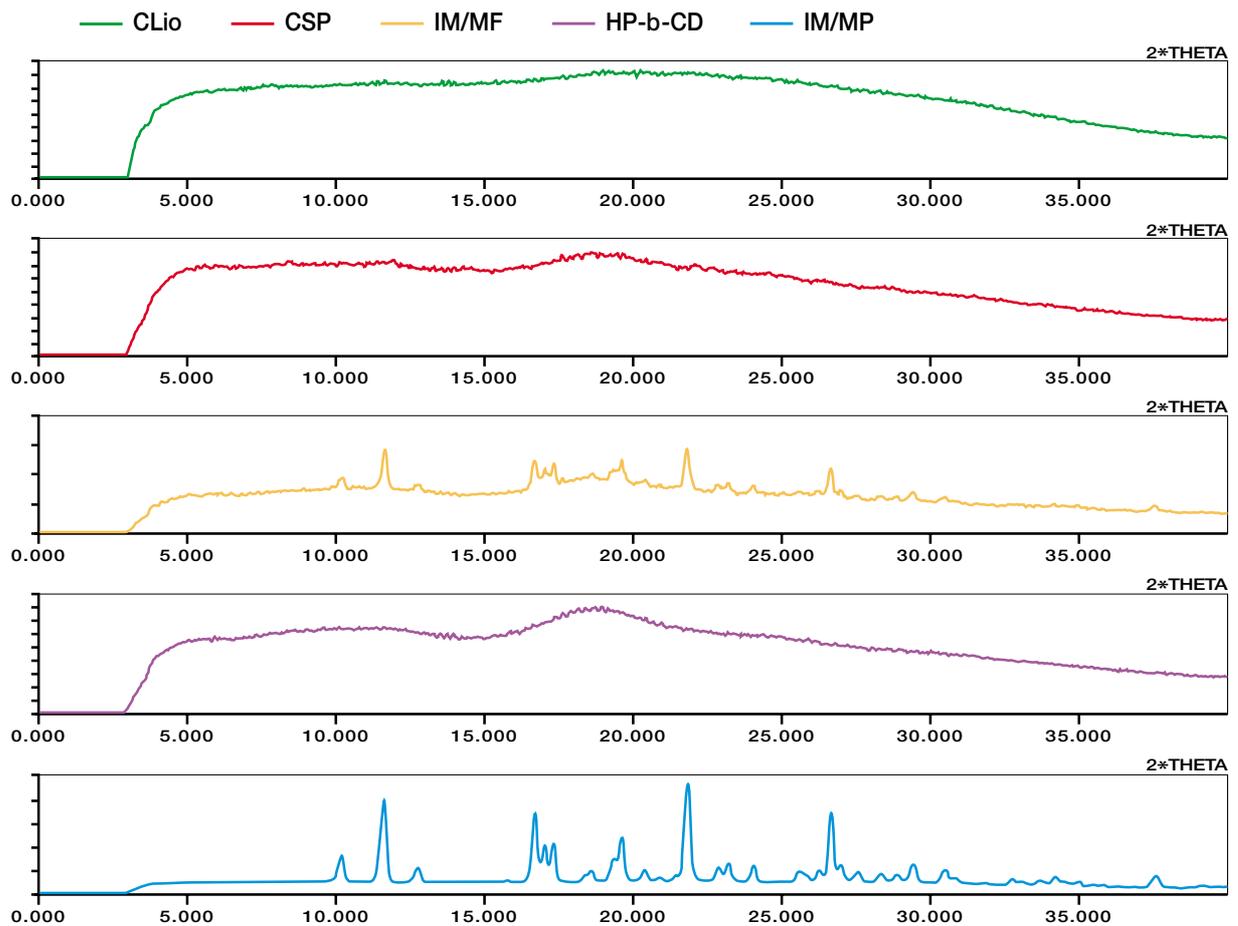


Figura 35. Difractogramas de raios-X de: **IM/MP** - IM matéria-prima; **HP- β -CD** - hidroxipropil- β -ciclodextrina; **IM/MF** -mistura física; **CSP** - complexo de inclusão obtido por processo de secagem por pulverização; **CLio** - complexo de inclusão obtido por processo de liofilização.

Com ambos os métodos de preparação ocorre o desaparecimento dos picos cristalinos, o que é indicativo de compostos no estado amorfo. Contudo, observam-se diferenças nestes dois perfis, apresentando o complexo obtido por liofilização uma linearidade muito maior, denunciando um estado muito mais amorfo. No perfil do complexo obtido por secagem por pulverização observa-se a elevação por volta dos 20 °q, característica da HP- β -CD, apresentando contudo maior linearidade.

A avaliação destes resultados sugere a formação de complexos, evidenciando a existência de interacção entre a IM e a HP- β -CD.

Todavia, a comprovação da formação de complexo no caso do processo de liofilização por alteração dos perfis de excitabilidade, não é tão definitiva como no caso do processo de secagem por pulverização.

Esta incerteza é atribuída ao facto do próprio processo de liofilização já contribuir para modificar o estado cristalino da IM para um estado com um perfil predominantemente amorfo (Figura 27), o que, segundo alguns autores, impede comprovar de uma forma concluyente a formação de complexos (Duchêne e Wouessidjewe, 1990c; Veiga et al., 1996). No entanto, o perfil da IM submetida ao processo de liofilização é diferente do perfil do complexo obtido pelo mesmo processo, mostrando este último uma maior linearidade, a qual é indicativa de um maior estado amorfo. Os dados de solubilidade reflectem também esta diferença, sendo o complexo obtido por liofilização a amostra que apresenta um maior aumento da solubilidade (Tabela 4) da IM, 8,81 vezes mais solúvel, enquanto que a liofilização da IM contribui para aumentar 4,73 vezes a sua solubilidade.

6 - ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

A análise dos resultados é efectuada tendo em mente que:

- ❖ Quando um complexo se encontra em solução, o equilíbrio simultâneo de dissolução e dissociação determina a quantidade de fármaco dissolvido, quer na forma complexada, quer na livre, dependendo o grau de dissociação do complexo da sua constante de estabilidade (a K_s do complexo determinada experimentalmente em tampão fosfato pH 7,0 é de $1074,8 \text{ M}^{-1}$) e das condições de concentração da solução;
- ❖ Existem ainda outros factores que podem influenciar o grau de dissolução, como sejam o método de complexação, a solubilidade da ciclodextrina e a proporção de fármaco/ciclodextrina no complexo, bem como as características físicas do pó.

Parâmetros de dissolução

A Tabela 7 e a Figura 36 apresentam os parâmetros de dissolução estudados:

- ❖ Tempo necessário para dissolver 50 e 90% de IM;
- ❖ Percentagem de IM dissolvida;
- ❖ Eficiência de dissolução aos 5, aos 30 e aos 60 minutos.

Tabela 7. Valores dos parâmetros de dissolução. $t_{50\%}$, $t_{90\%}$ expresso em minutos; **D5**, **D30**, **D60** = percentagem de IM dissolvida aos 5, 30 e 60 minutos \pm desvio-padrão; **ED5**, **ED30** e **ED60** = eficiência de dissolução aos minutos 5, 30 e 60. **IM/MP** - IM matéria-prima; **IM/MF** - IM mistura física; **CSP** - complexo de inclusão obtido por método de secagem por pulverização; **CLio** - complexo de inclusão obtido por método de liofilização.

Amostra	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$	% IM Dissolvida \pm DP			Eficiência de Dissolução		
	min	min	D5	D30	D60	5 min	30 min	60 min
IM/MP	12,5	> 300	18,3 \pm 2,1	81,4 \pm 1,3	87,3 \pm 1,6	8,30	53,67	67,42
CSP	7,0	32	33,6 \pm 1,2	93,2 \pm 2,6	100,0 \pm 0,1	18,97	67,08	80,02
CLio	1,0	1,8	92,6 \pm 1,8	98,9 \pm 1,2	100,0 \pm 0,1	69,24	89,96	95,41
IM/MF	4,5	40	45,5 \pm 3,3	89,0 \pm 1,0	91,2 \pm 1,2	22,96	72,74	80,41

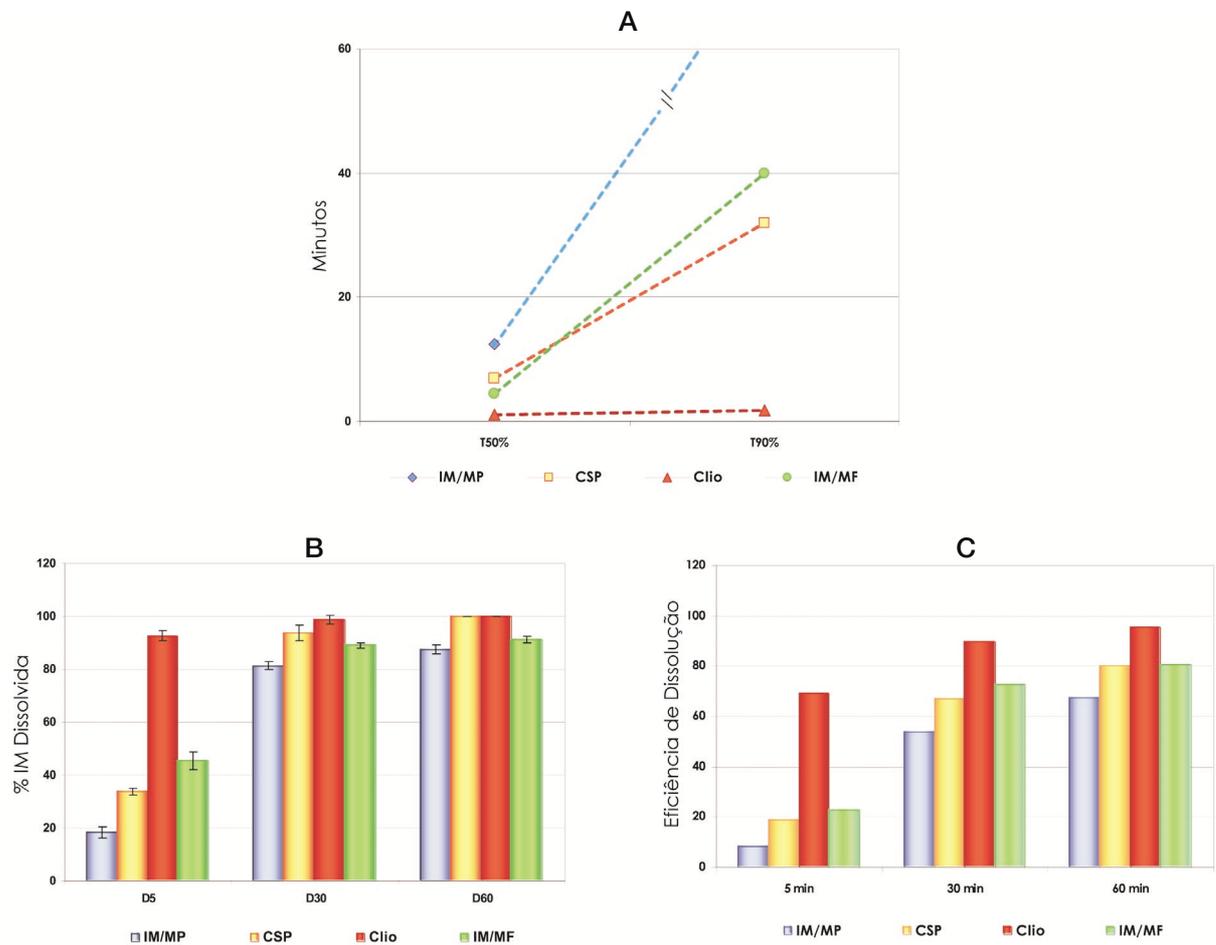


Figura 36. O gráfico **A** representa o tempo necessário para atingir 50% e 90% de fármaco dissolvido; O gráfico **B** compara a percentagem de IM dissolvida aos 5, 30 e 60 minutos \pm desvio-padrão; O gráfico **C** avalia a eficiência de dissolução no minuto 5, 30 e 60.

Perfis de Dissolução

Na Figura 37 encontram-se representados os perfis de dissolução até aos 90 minutos, das várias espécies em análise.

A análise global dos dados permite-nos afirmar que, em função do tempo, o maior aumento de dissolução do pó disperso se observa para a IM complexada por liofilização, no que respeita quer à velocidade de dissolução expressa em termos de tempo necessário para dissolver 50% e 90% da IM - 1 e 1,8 minutos; quer à percentagem de IM dissolvida no tempo - 92,6 ± 1,8%; 98,9 ± 1,2% e 100,01 ± 0,1%; quer ainda à extensão de dissolução avaliada pela eficiência de dissolução - 69,24; 89,96 e 95,41, respectivamente aos 5, 30 e 60 minutos. A análise do perfil de dissolução reflecte também esta situação.

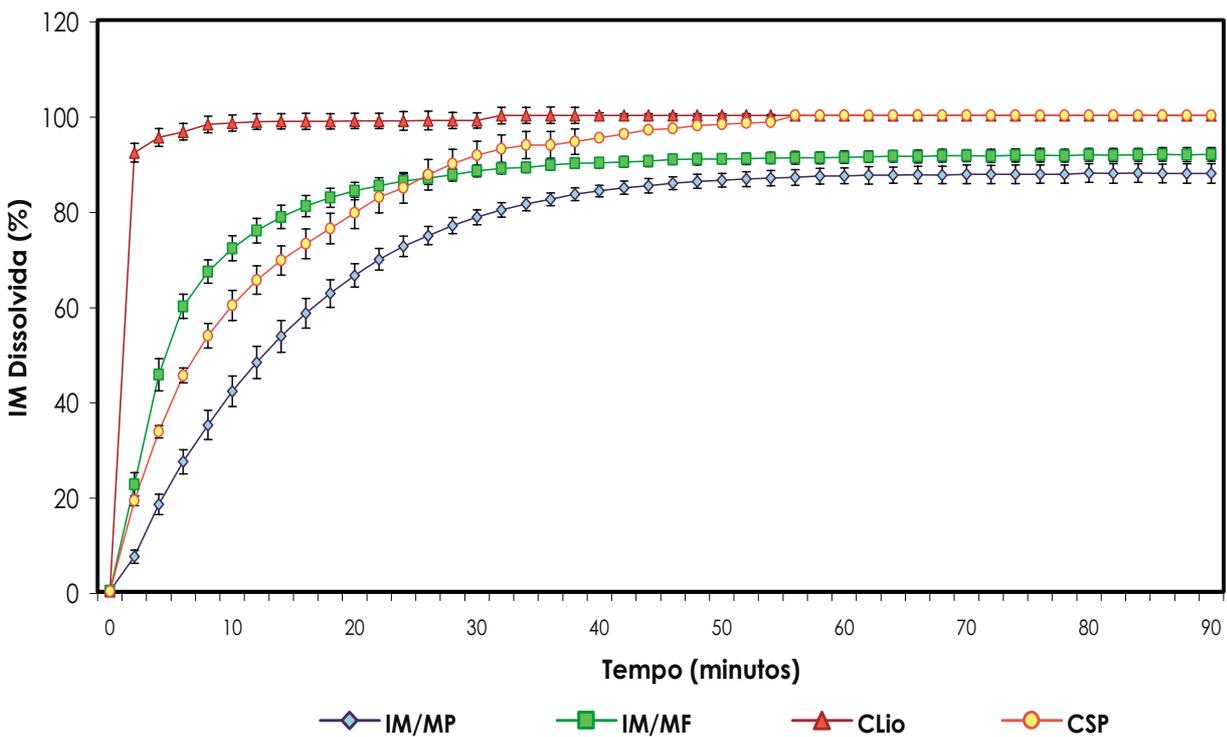


Figura 37. Perfis de dissolução da: **IM/MP** - IM matéria-prima, da **IM/MF** - mistura física e dos complexos de inclusão obtidos por método de secagem por pulverização - **CSP** e por liofilização - **CLio**, até aos 90 minutos em 1000 ml de solução de tampão fosfato pH 7,2, à temperatura de 37 ± 5 °C, com uma velocidade de agitação de 75 rpm, em condições "sink". Cada ponto representa a média dos 6 ensaios efectuados ± desvio-padrão.

Em relação à IM matéria-prima regista-se um aumento da velocidade de dissolução expressa nos valores de semi-vida de dissolução ($t_{50\%}$), de 12,5 vezes para o complexo preparado por liofilização, 1,9 vezes para o complexo preparado por secagem por pulverização e 2,8 vezes para a mistura física.

Conquanto as duas técnicas de preparação exibam 100% de IM dissolvida aos 60 minutos, é a técnica de liofilização que apresenta uma maior eficiência de dissolução neste tempo (95,41), a qual, por sua vez, é 1,42 vezes superior à da IM matéria-prima. Nem a IM, nem a mistura física, atingem os 100% de dissolução durante todo o tempo do ensaio (420 min).

Observa-se um efeito de aumento de alguns parâmetros de dissolução na mistura física em relação à IM matéria-prima e ao complexo obtido por secagem por pulverização. A semi-vida de dissolução ($t_{50\%}$) é superior em relação à IM/MP. A percentagem de IM dissolvida aos 5 minutos e a eficiência de dissolução aos 5 e 30 minutos são ligeiramente ligeiramente superiores em relação à IM/MP e ao CSP.

Nos perfis de dissolução está patente o aumento da percentagem de IM dissolvida, submetida a qualquer dos processos de complexação com a HP- β -CD, quando comparada com a IM matéria-prima. Destaca-se o perfil da IM complexada por processo de liofilização, pela rapidez com que é atingida uma percentagem de 90% de IM dissolvida e o perfil da IM complexada por processo de secagem por pulverização, por serem os únicos a atingir 100% de dissolução.

Os resultados de superior dissolução obtidos para o complexo preparado por processo de liofilização, podem ser atribuídos:

- ❖ A um aumento da solubilidade conferida pelos processos de complexação, evidenciado nos dados de solubilidade máxima obtidos experimentalmente;
- ❖ Ao estado amorfo altamente energético dos produtos liofilizados, o que também ficou demonstrado nos estudos de cristalografia e calorimetria de varrimento diferencial;
- ❖ Às propriedades "tensio-activas" das CDs, que reduzem a tensão interfacial entre o fármaco e o meio de dissolução, levando a uma velocidade de dissolução superior (Yazan e Sumnu, 1994).

A velocidade de dissolução da IM complexada pelo método de secagem por pulverização, apesar de ser superior à da IM matéria-prima, é inferior à do complexo preparado por liofilização, sendo contudo superior após os 30 minutos, atingindo os 100% de IM dissolvida.

Este facto poderá ser atribuído ao método de preparação do complexo, uma vez que as partículas obtidas são de menores dimensões, o que favorece a tendência para formar aglomeração e agregação, bem como maior porosidade e fraca capacidade de flutuação. Os estudos de Lin e Kao (1989) evidenciam esta modificação da estrutura da IM quando submetida a processo de secagem por pulverização, de que é exemplo a Figura 38, com reprodução de imagens de microscopia electrónica de varrimento.

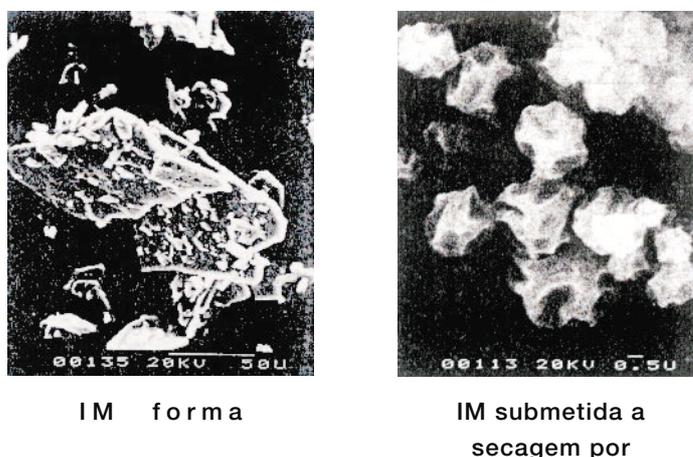


Figura 38. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de cristais de IM forma ácida matéria-prima e após ser submetida a processo de secagem por pulverização. Reproduzido com permissão de Lin e Kao (1989).

Em síntese, pode afirmar-se que a extensão do efeito de aumento de dissolução é dependente do método de preparação dos complexos. O aumento significativo da velocidade e extensão de dissolução dos complexos pode ser atribuído ao aumento da solubilidade do fármaco induzido pela complexação, à diminuição da tensão superficial da IM devido às propriedades molhantes da ciclodextrina ou à marcada redução da cristalinidade dos compostos, o que está em concordância com os resultados de difractivometria de raios-X e calorimetria de varrimento diferencial obtidos experimentalmente, e anteriormente apresentados, que evidenciam a passagem ao estado amorfo e a formas polimórficas.

7 - COEFICIENTE DE PARTILHA

Os resultados são analisados tendo presente os pressupostos anteriormente referidos na introdução (Frijlink et al., 1989; Nakajima et al., 1984; Uekama et al., 1983) e segundo o modelo de distribuição das várias entidades em solução, representado na Figura 14.

Na Figura 39 está patente a influência do pH, aqui visível nos diferentes resultados obtidos no cálculo da concentração molar da IM na fase aquosa, efectuados a partir da medição da absorvância a 319 nm. Confirma-se deste modo a importância deste parâmetro na absorção, distribuição e metabolização de um fármaco em sistemas multicompartimentais caracterizados pela variação descontínua de pH (Buri, 1981; La Rotonda et al., 1988).

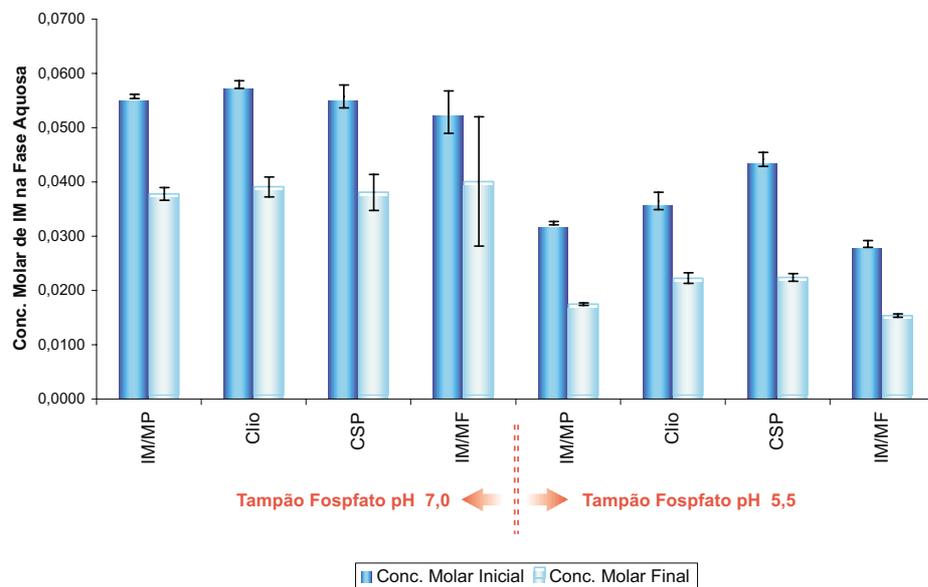


Figura 39. Variação da concentração molar de IM das várias amostras, antes e depois da mistura do sistema binário fase aquosa/fase oleosa. Valor médio de 3 ensaios \pm desvio-padrão.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de coeficiente de partilha aparente (P^*) e $\log P^*$, nas condições do ensaio efectuado, isto é, quando utilizado como fase aquosa o tampão fوسفato pH 7,0 e pH 5,5 e o n-octanol como fase oleosa e com razões de volumes óleo/água (O/A) adequadas.

Tabela 8. Coeficiente de partilha aparente (P^*) determinado em tampão fosfato pH 7,0 e pH 5,5 (fase aquosa). Valores médios de $P^* \pm$ desvio padrão e $\log P$.

Tampão Fosfato	Razão de Volumes (O/A)	Amostras	P^*	$\log P^*$
pH 7,0	1/50 (2ml/100ml)	IM/MP	24,35 \pm 1,46	1,39
		CSP	23,89 \pm 2,77	1,38
		CLio	24,63 \pm 1,90	1,39
		IM/MF	28,29 \pm 0,89	1,45
pH 5,5	1/600 (0,5ml/300ml)	IM/MP	526,05 \pm 1,45	2,72
		CSP	623,08 \pm 2,58	2,79
		CLio	421,59 \pm 1,17	2,62
		IM/MF	557,97 \pm 2,36	2,75

No estudo efectuado com o tampão fosfato pH 7,0, observa-se que as variações no grau de transporte pela adição de CD são muito pequenas, verificando-se alterações mais significativas quando se utiliza o tampão fosfato pH 5,5.

Tendo em consideração os dados experimentais (Tabela 3) de constante de estabilidade do complexo a pH 7,0 ($K_s=1074,8 \text{ M}^{-1}$) e em água purificada ($K_s=110,5 \text{ M}^{-1}$) e de solubilidade máxima em água purificada do CLio ($7,59 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$) e do CSP ($2,78 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$), poderão ser efectuadas algumas considerações:

- ❖ Uma K_s mais baixa implica mais facilidade de deslocação de fármaco do complexo, pelo n-octanol, havendo mais fármaco livre no meio aquoso;
- ❖ Os processos de complexação podem alterar as características de cristalinidade (polimorfismo e passagem ao estado amorfo) das moléculas não complexadas que se encontram livres, de acordo com o modelo de equilíbrio que se estabelece, como foi evidenciado nos estudos experimentais efectuados de calorimetria de varrimento diferencial (Tabela 5 e Figura 26) e difractiva de raios-X (Figura 27). Estas alterações vão por sua vez influenciar a capacidade de solubilização aumentando-a, como já anteriormente referido.

Assim, a conjugação destes dois factores, constante de estabilidade do complexo a diferentes valores de pH e solubilidade do fármaco, no contexto do modelo de distribuição das várias entidades em solução (Figura 11), condiciona o coeficiente de partilha do fármaco.

No meio com pH 5,5 para o CSP, verifica-se uma menor constante de estabilidade e uma menor solubilidade. A conjugação destes dois factores faz com que haja mais fármaco livre resultante da competição com o n-octanol, mas devido a uma menor solubilidade há uma maior transferência de massa para a fase oleosa.

No caso do CLio, apesar da constante de estabilidade ser a mesma, a solubilidade do fármaco é superior, podendo ocorrer uma retenção deste na fase aquosa.

No meio com pH 7,0 será a constante de estabilidade o principal factor a condicionar o coeficiente de partilha, dado que a quantidade de fármaco livre para transferência será menor, não sendo tão significativa a diferença em relação ao processo que se estabelece na ausência da ciclodextrina.

Os resultados obtidos vêm confirmar a teoria anteriormente descrita de que são várias as forças intervenientes neste processo e não é só a fracção livre de fármaco que condiciona o transporte para a fase orgânica, reforçando por outro lado a importância do pH do meio (Fijlink et al., 1989; Nakajima et al., 1984; Uekama et al., 1983; Veiga, 1996).

Este modelo de distribuição das várias entidades em solução explica o fenómeno observado, dado que a fracção livre de fármaco perto da interface, é condicionada pela capacidade do solvente orgânico para deslocar o fármaco do complexo, conquanto esteja também dependente de outros factores, tais como:

- ❖ Relação entre o fármaco e a CD;
- ❖ Constante de estabilidade do complexo F:CD, a qual se reflecte na capacidade de deslocação do fármaco;
- ❖ Concentração de complexo F:CD na fase aquosa - uma concentração elevada de complexo faz com que o solvente orgânico não seja capaz de deslocar o fármaco;
- ❖ Constante de estabilidade do complexo formado com o solvente orgânico, a qual se reflecte igualmente na capacidade de deslocação do fármaco;
- ❖ Solubilidade do solvente orgânico na fase aquosa, condicionando o influxo deste para a fase aquosa.

A conjugação destes factores e o equilíbrio que se estabelece à medida que vão variando as forças em competição, determina a quantidade e velocidade de transporte do fármaco para a fase oleosa.

Contudo, se analisarmos os valores de $\log P^*$ em qualquer dos dois meios, verifica-se que a complexação não exerce uma influência significativa, mantendo-se num limite de valores (1 a 3) que pode ser considerado como óptimo para absorção passiva (Barreto et al., 2002; Panchagnula e Thomas, 2000).

Se ponderarmos que "in vivo" existe uma situação de competição entre os ácidos biliares e o fármaco a nível intestinal (Figura 18), semelhante àquela descrita no modelo de distribuição das várias entidades em solução, poder-se-á considerar, nas condições do estudo efectuado, que a capacidade de difusão transmembranar "in vivo" da IM não é influenciada pela complexação com ciclodextrina, com a vantagem do aumento dos parâmetros de solubilidade e dissolução, que é um dos factores que limita a absorção oral deste fármaco em meio com pH entre 6 e 8, como é o que se observa no TGI de recém-nascidos. ■

Parte II
Estudo Toxicológico

Parte II

Estudo Toxicológico



OBJECTIVO

Entre as técnicas disponíveis para aumentar a solubilidade e a dissolução aquosa de fármacos ácidos e diminuir a toxicidade gástrica causada pela lenta dissolução, encontram-se, entre outras, a obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas, já anteriormente referenciada, e a formação de sais com bases orgânicas ou inorgânicas, com a qual se obtêm igualmente bons resultados, quer na melhoria das características físico-químicas quer no perfil de toxicidade (Erden e Çelebi, 1988; Redenti et al., 2001).

Partindo deste pressuposto, o objectivo primordial do estudo toxicológico é a análise comparativa da capacidade de indução de lesões gástricas da IM na forma ácida e nas formas de sal sódico e de complexo de inclusão, após administração oral a ratos Wistar.

O objectivo secundário deste trabalho é a avaliação da indução de lesão renal e hepática da IM nas várias formas e da HP- β -CD, como meio de comprovar a absorção oral dos produtos em estudo.

1. PRODUTOS EM ESTUDO

- ❖ Indometacina matéria-prima na forma ácida (IMfa);
- ❖ Indometacina sal sódico tri-hidratado comercializado sob o nome de Indocid® (IMss);
- ❖ Indometacina complexada com HP-**b**-CD pelos métodos de:
 - liofilização (Lio);
 - secagem por pulverização (SP);
- ❖ Hidroxipropil-**b**-ciclodextrina (HP-**b**-CD).

1.1. Preparação das amostras para administração

As amostras foram preparadas de acordo com os dados constantes na Tabela 11.

Tabela 11. Doses administradas dos produtos em estudo. **DT** = Dose Terapêutica; **DTx** = Dose Tóxica.

Produto	Dose	Concentração
<i>IMfa e IMss</i>	DTx	2 mg/ml ↔ 30 mg IM em 15 ml água
	DT	46,28 µg/ml ↔ 1 mg IM em 21,6 ml água
<i>CSP</i>	DTx	8,24 mg/ml ↔ 123,6 mg CSP em 15 ml água (2 mg IM/ml)
	DT	190,46 µg/ml ↔ 4 mg CSP em 21 ml água (46,28 µg IM/ml)
<i>CLio</i>	DTx	11,56 mg/ml ↔ 173,4 mg CLio em 15 ml água (2 mg IM/ml)
	DT	267,5 µg/ml ↔ 5,35 mg CLio em 20 ml água (46,28 µg IM/ml)
<i>HP-β-CD</i>	DTx	9,56 mg/ml ↔ 95,6 mg CD em 10 ml água
<i>Água Destilada</i>	Volume	5 µl/g de animal

2. ANIMAIS DE ENSAIO**2.1. Estudos de toxicidade gástrica em modelo animal**

Os estudos em modelo animal mostram que a localização das lesões produzidas pela IM no rato, dependem das condições alimentares ou de jejum (Ammoury et al., 1989; Skeljo et al., 1993). A alimentação contínua induz o desenvolvimento de úlceras, principalmente no antro e no duodeno em ratos, sendo assim um bom modelo para o estudo da indução de efeitos adversos dos AINEs no tracto gastrointestinal superior, por inibição da PGs no estômago do rato (Davis, 1994; Ohno, 1999). O intestino delgado,

por outro lado, é especialmente sensível ao jejum prolongado (Doluisio et al., 1969; Somasundaram et al., 1997), levando conseqüentemente a inferir que o jejum não irá afectar o órgão do TGI que pretendemos estudar, o estômago. Assim, as lesões somente deverão aparecer ao nível do intestino delgado nos ratos mantidos em jejum, e na parte glandular do estômago nos ratos alimentados de forma convencional (Ammoury et al., 1989; Skeljo et al., 1993).

Após administração oral de IM a ratos, em doses que variam entre 2,9 a 20 mg/kg, o pico plasmático é atingido às 3 horas. A IM sofre metabolização hepática e tem uma cinética de eliminação linear, sendo excretada pela urina na forma inalterada e sob a forma de metabolitos conjugados com ácido glucorónico (Harman et al., 1964; Ogiso et al., 1994; Suzuki et al., 1997).

2.2. Amostra

O estudo foi efectuado em 10 grupos de ratos Wistar de ambos os sexos, num total de 135 animais, com peso médio de $224,4 \pm 62,5$ g e de aproximadamente dois meses de idade, tratados de acordo com a legislação em vigor para os estudos em animais de laboratório.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos pelos grupos e alojados em armários biotério (Figura 40) com temperatura e humidade controladas, sujeitos a ciclos de luz “claro-escuro” de 12 horas.



Figura 40. Condições de alojamento dos animais em armários biotério.

Na Tabela 12 são indicados os pesos médios iniciais dos animais dos grupos estudados, as doses utilizadas e o respectivo número de animais.

Tabela 12. Peso médio dos animais \pm desvio-padrão, número de animais por grupo e respectivas doses utilizadas.

Produto Administrado Dose / kg de animal	Grupo	N.º Animais	Peso \pm DP
<i>IMfa - 0,23 mg IM</i>	I	20	250,8 \pm 70,7
<i>IMfa - 10mg IM (Controlo positivo)</i>	II	10	181,5 \pm 14,2
<i>IMss - 0,23 mg IM</i>	III	8	179,4 \pm 25,1
<i>IMss - 0,46 mg IM (Controlo positivo)</i>	IV	7	197,9 \pm 28,1
<i>CLio - 0,23 mg IM</i>	V	20	235,0 \pm 77,9
<i>CLio - 10 mg IM</i>	VI	10	181,5 \pm 17,5
<i>CSP - 0,23 mg IM</i>	VII	20	254,0 \pm 79,1
<i>CSP - 10 mg IM</i>	VIII	10	195,5 \pm 17,2
<i>Água destilada (Controlo negativo) 0,005 ml</i>	IX	10	185,0 \pm 27,4
<i>HP-β-CD - 47,8 mg</i>	X	20	261,9 \pm 38,1

O número de animais é de 10 para as várias formas de IM na dose tóxica e grupo de controlo negativo e de 20 para as várias formas de IM na dose terapêutica e para a ciclodextrina utilizada como controlo das formas complexadas de IM.

O número de animais usados na forma de sal sódico da IM é uma amostra menor por limitação do produto disponível - 8 para a dose terapêutica e 7 para a dose tóxica.

2.3. Via de administração

A via de administração utilizada foi a oral, através de sonda gástrica (Krasna e Lee, 1993).

2.4. Doses utilizadas

Foram administradas duas doses diferentes dos produtos em estudo:

- ❖ Dose Terapêutica (DT) - dose equivalente à utilizada na terapêutica de RN com CA aberto (0,2 mg/kg peso);
- ❖ Dose Tóxica (DTx) - dose referenciada na bibliografia como tendo capacidade

de induzir numerosas lesões da mucosa sem causar mortalidade (10 mg/kg peso) (Ammoury et al., 1993; Somasundaram et al., 1997).

O cálculo da dose equivalente à DT utilizada em RN foi efectuado com base na aplicação do factor de conversão 6, recomendado pela FDA quando o animal em estudo é o rato (acessível em: www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm).

O cálculo da dose de IM existente nos complexos obtidos por cada um dos métodos de complexação foi efectuado a partir da percentagem de IM incluída na HP- β -CD, com base nos resultados do estudo tecnológico, CLio = 17,3% de IM e CSP = 24,3% de IM.

A dose de HP- β -CD foi a mesma da quantidade equivalente à DTx, existente no complexo que a contém em maior percentagem.

Assumiu-se que a dose de IMss a administrar para a dose tóxica, seria o dobro da quantidade equivalente à dose terapêutica, por esta dose ser já considerada como tendo capacidade de indução de toxicidade.

As soluções dos produtos em estudo foram administradas de 24 em 24 horas durante 3 dias consecutivos, por analogia com a frequência de administração da IM para o tratamento farmacológico do CA, num volume de 0,005 ml por g de animal (Ammoury et al., 1993), nas condições indicadas na Tabela 11.

2.5. Condições do ensaio

Retirou-se a alimentação aos animais 18 horas antes do início da primeira administração, tendo sido permitido o livre acesso à água durante todo o ensaio (Ammoury et al., 1989 e 1993; Lin et al., 1994).

Durante o período de ensaio, foi efectuada a monitorização diária do peso (Lin et al., 1994), a observação das fezes para detecção de alterações da cor, do cheiro e da consistência e o registo de dados de mortalidade.

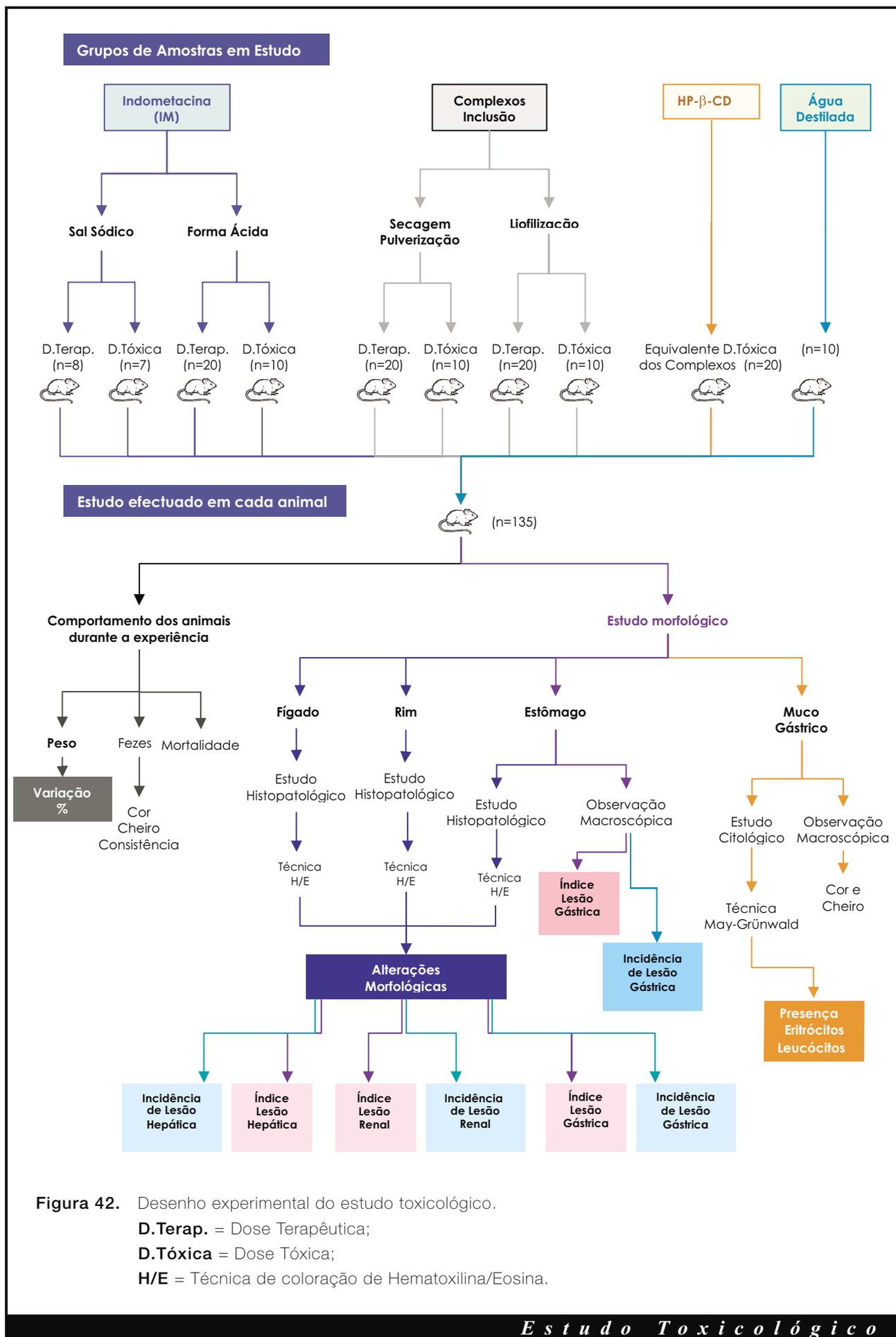


Figura 41. Pesagem dos animais.

Passadas 24 horas após a última administração, os animais foram sacrificados por decapitação (Ammoury et al., 1993) e retirados o estômago, o rim direito e um fragmento do fígado.

2.6. Desenho experimental

A metodologia utilizada no desenho experimental do estudo toxicológico está representada no organograma da Figura 42:



2.7. Técnicas de coloração de tecidos e células

O mecanismo de coloração de tecidos e células está dependente da existência de determinados grupos atómicos nas moléculas, chamados cromóforos, podendo estes ser básicos ou acídicos.

As tintas sintéticas derivadas do benzeno são preparadas de modo a que a sua parte essencial seja acídica (aniónica) ou básica (catiónica) no seu comportamento químico. Combinam-se com os cromóforos para formar compostos com um grupo terminal, que permite efectuar uma união química com os grupos terminais dos tecidos acídicos ou básicos e assim conferir cor.

2.7.1. Hematoxilina/Eosina para identificação de alterações morfológicas gástricas, renais e hepáticas

Para a observação microscópica foram preparadas lâminas com coloração de hematoxilina e eosina. Este método de combinação de coloração é o mais utilizado e o mais importante para estudos de carácter geral. Pode ser utilizado após qualquer tipo de fixação, excepto com o tetróxido de ósmio. A hematoxilina vai colorir o núcleo, enquanto que a contra coloração do citoplasma das células, é dada pela eosina. A heterocromatina do núcleo e o citoplasma das células ricas em ribonucleoproteína, coram de azul. O citoplasma das células com quantidades mínimas de ribonucleoproteína, tende a ter cor rosa/lavanda, enquanto que os eritrócitos maduros e proteínas, que são desprovidas de ácido ribonucleico, coram de vermelho.

Para a preparação das lâminas, os blocos de parafina congelados foram seccionados num micrótomo em fatias de 3 mm, formando fitas ou ténias. Estas são tratadas de acordo com os seguintes passos:

- ❖ Remoção da parafina com xilol;
- ❖ Remoção deste com álcool absoluto;
- ❖ Hidratação do tecido com água;
- ❖ Coloração com hematoxilina;
- ❖ Coloração com eosina;
- ❖ Remoção da água com álcool a 95°, seguido de álcool absoluto;
- ❖ Remoção do álcool com xilol;
- ❖ Colocação na lâmina de observação microscópica, aplicação de gota de resina sintética e colocação de lamela.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de campo claro e fotografadas (Karmeli et al., 1993; Wong et al., 1976).

2.7.2. Técnica de coloração de May-Grünwald-Giemsa para estudo citológico do muco gástrico

As tintas do tipo Romanowsky referenciadas pela *International Conference on Harmonization*, e de que fazem parte as utilizadas neste estudo, têm, como componentes essenciais, uma tinta catiónica que confere uma coloração azul ou azul violeta aos ácidos nucleicos (ADN e ARN), às nucleoproteínas, aos grânulos dos basófilos e, mais debilmente, aos grânulos dos neutrófilos, e outra aniónica que confere uma coloração vermelha ou laranja à hemoglobina e aos grânulos dos eosinófilos.

Técnica utilizada

Foram efectuados esfregaços de muco gástrico, secos ao ar e fixados com metanol por 10 a 20 minutos.

As lâminas foram cobertas com corante May-Grünwald durante três minutos, após o que foi retirado e lavado com água.

Voltaram a cobrir-se as lâminas com corante de Giemsa durante quinze minutos, após o que foram passadas por água e secas à temperatura ambiente.

A observação foi efectuada em microscópio óptico com um aumento de 40x para objectiva seca e de 100x quando é utilizada a imersão (Dacie e Lewis, 1991).

3. MONITORIZAÇÃO “IN VIVO”

3.1. Avaliação do Peso

Para cada animal foi efectuado o cálculo da variação em percentagem de peso face ao peso total do animal (eq. 3), antes e depois do tratamento (Otero-Espinar et al., 1991):

$$\text{Perda de peso (\%)} = ((P_i - P_f) / P_i) \times 100 \quad (3)$$

em que o P_i = Peso inicial = peso do rato 18 horas antes do início da experiência;
 P_f = Peso final = peso do rato no dia em que foi sacrificado, 72 horas após a administração da primeira dose.

Foi estudada a possível relação da variação percentual de peso com a dose administrada e com o índice de lesão morfológico do estômago obtido através da análise histopatológica.

3.2. Avaliação da fezes

As fezes foram avaliadas ao longo do ensaio quanto à cor, cheiro e consistência e registadas como normais ou alteradas.

Foi estudado o significado estatístico da incidência de animais que apresentaram fezes normais e alteradas.

3.3. Avaliação da mortalidade

Durante as 72 horas de duração do ensaio os animais foram observados para registo da possível ocorrência de mortalidade.

4. ESTUDO MORFOLÓGICO

4.1. Avaliação macroscópica da capacidade de indução de lesão pela Indometacina

4.1.1. Estômago

4.1.1.1. Preparação das amostras

O estômago foi aberto ao longo da grande curvatura, pela probabilidade de encontrar lesões nesta zona (Ammoury et al., 1989) e fixado em tabuleiro de dissecação como mostra a Figura 43.

Foi registada a presença de cheiro e a cor do muco. Foram efectuadas colheitas do muco gástrico para efectuar o estudo citológico.

O estômago foi lavado com cloreto de sódio a 0,9% e fotografado com máquina Nikon F2 com anel extensão Fx, colocada a 30 cm da peça (Otero-Espinar et al., 1991).



Figura 43. Rim direito, fragmento do fígado e estômago aberto ao longo da grande curvatura.

4.1.1.2. Avaliação do índice de lesão gástrica. Análise macroscópica

A avaliação do índice de lesão foi efectuada de acordo com uma escala de irritação da mucosa, visível macroscopicamente, com a atribuição dos seguintes graus de gravidade (Adaptado de: Ammouy et al., 1993; Nagarsenker et al., 2000; Nambu et al., 1978; Otero-Espinar et al., 1991):

- 0** - Mucosa normal;
- 1** - Alteração de cor ligeiramente perceptível;
- 2** - Mucosa ligeiramente avermelhada a esbranquiçada, com algumas áreas de irritação definidas; um ponto de lesão;
- 3** - Mucosa vermelha a púrpura ou branca, possibilidade de erosão da superfície; vários pontos de lesão;
- 4** - Mucosa muito vermelha escura a púrpura ou branca a acinzentada; aparência de necrose; ulceração visível; muitos pontos de lesão.

A pesquisa de lesão macroscópica foi efectuada em cada um dos animais e, sempre que se verificou mais do que um tipo de lesão no mesmo animal, foi considerada a lesão mais grave para classificação do índice.

A avaliação do significado estatístico da incidência e gravidade das lesões foi efectuada entre os grupos de intervenção com o controlo (Água destilada) e com o comparador (IMfa DT), para a dose terapêutica e para a dose tóxica.

4.2. Avaliação microscópica da capacidade de indução de lesão pela Indometacina

4.2.1. Estudo citológico do muco gástrico

Foi realizada a colheita de muco gástrico dos diversos grupos de animais sujeitos às várias amostras em estudo, para a preparação de lâminas segundo a técnica descrita, com a finalidade de avaliação do aspecto do muco e da identificação de eritrócitos e leucócitos, indiciadores da ocorrência de hemorragias gástricas e processo inflamatório da mucosa.

As lâminas foram observadas em microscópio com objectiva 40x e efectuada a classificação da gravidade de lesão com base na seguinte escala de identificação de leucócitos e eritrócitos por campo:

- 0** - não se observaram;
- 1** - 1 por campo;
- 2** - 2 a 9 por campo;
- 3** - 10 a 20 por campo;
- 4** - ³ a 20 por campo.

Foi atribuído o índice de lesão correspondente à identificação do maior número de leucócitos ou de eritrócitos observados por campo e registado o número de animais que evidenciam presença de eritrócitos ou de leucócitos.

A avaliação do significado estatístico da incidência e gravidade das lesões foi efectuada entre os grupos de intervenção com o comparador (IMfa DT), para a dose terapêutica e para a dose tóxica.

4.2.2. Estudo histopatológico de fragmentos da mucosa gástrica

4.2.2.1. Preparação das amostras

Foram efectuados vários cortes transversais do estômago ao nível do corpo, do fundo e do antro, nos locais onde havia evidência macroscópica de lesão. Os fragmentos foram colocados em caixas próprias, como mostra a Figura 44 e fixados para preservação em formol neutro tamponado com fosfatos (pH=7.2)¹.

¹ Formol neutro tamponado com fosfatos (pH=7.2) - método de preparação:

HCHO 40% - 250ml; Na₂HPO₄ - 16,25g; NaH₂PO₄.H₂O - 10g; H₂O - 2250ml; ajustar pH a 7,2.

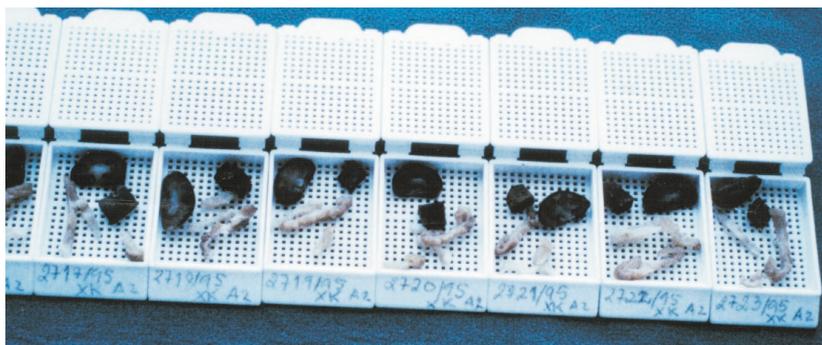


Figura 44. Fragmentos do rim e do fígado e das zonas de lesão do estômago, preparados para estudo histológico.

O método de fixação deve preservar e endurecer os tecidos com o mínimo de distorção das estruturas físicas, das características químicas e das propriedades de coloração. Independentemente da qualidade de execução da técnica, ocorrerá sempre morte de células e alteração de tecidos que resultarão em artefactos que deverão ser identificados por microscopia.

Os tecidos foram embebidos em parafina, após a fixação, para posterior conservação. Esta técnica consiste nos seguintes passos:

- ❖ Remover o excesso de fixante com água;
- ❖ Desidratar com álcool absoluto;
- ❖ Diafanizar os tecidos com xilol;
- ❖ Embeber os tecidos em parafina à temperatura de fusão (58-60 °C);
- ❖ Solidificar por arrefecimento.

Os blocos de parafina com os tecidos embebidos são depois cortados por microtomia para aplicação da técnica de coloração hematoxilina/eosina anteriormente descrita, a fim de identificar alterações morfológicas.

4.2.2.2. Avaliação do índice de lesão gástrica. Análise histopatológica

O cálculo do índice de lesão gástrica no estudo morfológico foi efectuado de acordo com uma escala de gravidade de lesão, visível microscopicamente, com a atribuição dos seguintes graus de gravidade:

- 0 - Aspecto morfológico normal;
- 1 - Congestão vascular e/ou edema;
- 2 - Exulceração ou pequena úlcera única;
- 3 - Mais do que uma úlcera ou uma só úlcera muito extensa ou pequenas áreas de necrose ou de hemorragia;
- 4 - Necrose extensa ou grande hemorragia.

A pesquisa de lesão morfológica foi efectuada em cada um dos animais e, sempre que se verificou mais do que um tipo de lesão no mesmo animal, foi considerada a lesão mais grave para classificação do índice.

A avaliação do significado estatístico da incidência e gravidade das lesões foi efectuada entre os grupos de intervenção com o controlo (Água destilada) e com o comparador (IMfa DT), para a dose terapêutica e para a dose tóxica.

Foi igualmente avaliado o significado estatístico do valor do risco de lesão de todos os grupos face ao controlo (Água destilada) e face ao comparador (IMfa DT) e entre complexos na dose terapêutica.

4.2.3. Estudo histopatológico de fragmentos do fígado e do rim

Existe evidência na literatura consultada de que a IM tem capacidade de induzir lesão hepática e renal quando administrada por via sistémica (Biscarini, 2000a e 2000b; Chamaa et al., 2000; Cuzzolin, 2001; Fowlie, 1996; Kaplowitz, 2002; Ojala et al., 2001; Pezzati et al., 1999; Romagnoli et al., 1997; Zimmerman, 1999a e 1999b).

Com base neste facto, coloca-se a hipótese de que a IMfa administrada, sob a forma livre e sob a forma de complexos de inclusão (CLio e CSP), tem capacidade semelhante de indução de lesão hepática e renal, tanto na dose terapêutica como na dose tóxica.

Pretende-se, por outro lado, averiguar se existe diferença na capacidade de indução de lesão nestes órgãos pela indometacina na forma ácida e na forma de sal sódico.

4.2.3.1. Rim

4.2.3.1.1. Preparação das amostras

Após recolha do rim direito, este foi lavado com cloreto de sódio 0,9%, aberto longitudinalmente, fixado em tabuleiro de dissecação, fotografado e preparado para estudo histopatológico. Fragmentos transversais do rim foram colocados em caixas próprias

(Figura 40) e fixados em formol neutro tamponado com fosfatos (pH=7.2).

Os tecidos foram conservados em parafina e preparadas lâminas com coloração de hematoxilina/eosina, pela técnica anteriormente descrita.

4.2.3.1.2. Avaliação do índice de lesão renal. Análise histopatológica

O cálculo do índice de lesão renal no estudo morfológico foi efectuado de acordo com uma escala de gravidade de lesão, visível microscopicamente, com a atribuição dos seguintes graus de gravidade:

- 0** - Normal;
- 1** - Unicamente lesões tubulares ou circulatórias;
- 2** - Lesões glomerulares atingindo poucos glomérulos;
- 3** - Destruição de glomérulos ou lesões que atingem muitos glomérulos.

A pesquisa de lesão morfológica foi efectuada em cada um dos animais e, sempre que se verificou mais do que um tipo de lesão no mesmo animal, foi considerada a lesão mais grave para classificação do índice.

A avaliação do significado estatístico da incidência e gravidade das lesões foi efectuada entre os grupos de intervenção face ao comparador (IMfa DT) para a dose terapêutica e para a dose tóxica e entre complexos na dose terapêutica.

4.2.3.2. Fígado

4.2.3.2.1. Preparação das amostras

Após recolha de um fragmento do fígado, este foi lavado com cloreto de sódio 0,9%, fotografado e preparado para estudo histopatológico. Fragmentos transversais do fígado foram colocados em caixas próprias (Figura 40) e fixados em formol neutro tamponado com fosfatos (pH=7.2).

Os tecidos foram conservados em parafina e preparadas lâminas com coloração de hematoxilina/eosina, pela técnica anteriormente descrita.

4.2.3.2.2. Avaliação do índice de lesão hepática. Análise histopatológica

O cálculo do índice de lesão hepática no estudo morfológico foi efectuado de acordo com uma escala de gravidade de lesão, visível microscopicamente, com a atribuição dos seguintes graus de gravidade:

- 0** - Normal;
- 1** - Lesões inflamatórias e/ou circulatórias;
- 2** - Alterações degenerativas ou tinturais, sem fibrose e sem necrose;
- 3** - Fibrose sem formação de nódulos, ou focos de necrose, ou formação pré-neoplásica evidente;
- 4** - Cirrose ou necrose extensa ou neoplásica.

A pesquisa de lesão morfológica foi efectuada em cada um dos animais e, sempre que se verificou mais do que um tipo de lesão no mesmo animal, foi considerada a lesão mais grave para classificação do índice.

A avaliação do significado estatístico da incidência e gravidade das lesões foi efectuada entre os grupos de intervenção face ao comparador (IMfa DT) para a dose terapêutica e para a dose tóxica e entre complexos na dose terapêutica.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística utiliza-se para interpretar os resultados de experiências sobre acontecimentos que, em princípio, obedecem a leis estritas, mas são susceptíveis de ser modificadas por factores desconhecidos, ou seja, o acaso.

Considerando que todo o diagnóstico é o resultado de um cálculo de probabilidades, feito conscientemente ou não, a estatística é o único método que permite ter um julgamento sobre as grandezas aleatórias, graças a regras precisas que assentam em bases lógicas e matemáticas. Geralmente em ciências da saúde, quando as probabilidades são inferiores a 5%, ou seja, há menos de 5 possibilidades em 100 de suceder um determinado resultado, é considerado como sendo estatisticamente significativo.

O termo estatisticamente significativo, em análise estatística, quer unicamente significar que o valor de "p" é inferior a um valor de alfa previamente definido (probabilidade de que o teste estatístico rejeite incorrectamente a hipótese nula), assumindo deste modo um teor inteiramente distinto do utilizado normalmente em linguagem corrente. Consequentemente, um resultado estatisticamente significativo pode não ser, necessariamente, importante ou de interesse biológico ou clínico, o que impõe que os resultados não sejam avaliados autonomamente.

Numa análise estatística, os valores observados podem ser classificados quanto à escala numérica utilizada como: *intervalares*, se os valores tomam qualquer grandeza dentro de um intervalo finito ou infinito; *ordinais*, se os valores poderem ser postos por ordem ou terem uma escala de grandeza; *nominais*, se os valores podem ser associados a um código na forma de um número, sendo este simplesmente uma legenda (por exemplo: sim=1; não=2); *rácio*, quando os valores tomam qualquer grandeza dentro de um intervalo finito ou infinito e incluem um zero absoluto.

O desenho estatístico deste estudo experimental engloba a análise estatística descritiva de variáveis, seguida de análise estatística inferencial onde, por um lado, se comparam variáveis, sendo o objectivo principal testar se a diferença prevista pela hipótese experimental é significativa, e, por outro lado, se tentam estabelecer relações entre as variáveis, sendo o objectivo principal averiguar da influência de umas sobre o resultado de outras e, no caso de existir, qual o grau de interacção.

A estatística descritiva utilizada na caracterização das variáveis deste estudo, está sistematizada na Tabela 13.

Tabela 13. Estatística descritiva utilizada na caracterização das amostras.

Caracterização de amostras			
Objectivos	Meios		
Parâmetros de localização	Média	Mediana	
Parâmetros de dispersão	Desvio-padrão	Assimetria	Coefficiente de variação
Distribuição de dados	Tabelas de frequência	Histogramas	Gráficos
Teste de aderência à Normalidade	Kolmogorov-Smirnov		

Os parâmetros de localização (medidas de tendência central) são indicadores que permitem obter uma primeira ideia de como se distribuem os dados, fornecendo informação sobre o valor, ou faixa de valores da variável, que ocorrem mais tipicamente.

Os parâmetros de dispersão são medidas da variação de um conjunto de dados em torno da média, ou seja, da maior ou menor variabilidade dos resultados obtidos, permitindo identificar até que ponto os resultados se concentram ou não, ao redor da tendência central de um conjunto de observações.

A avaliação das variáveis quanto à aderência à normalidade determina o tipo de teste estatístico que deve ser utilizado. Os testes de aderência são procedimentos para a identificação de uma distribuição de probabilidade, a partir de um conjunto de frequências, usando a Lei dos Grandes Números. Essencialmente, calcula-se a viabilidade da diferença entre uma distribuição de frequência relativa acumulada observada, e aquela que seria de esperar, a partir de uma determinada distribuição de probabilidade, geralmente a Curva Normal. Uma distribuição de frequência pode ser tida como pertencente a um dado tipo de distribuição, se o teste de aderência mostrar uma probabilidade de mais de 5% da diferença entre as duas, ser devida ao acaso.

O teste de aderência à normalidade de Kolmogorov-Smirnov utilizado neste estudo foi escolhido por ser um teste adequado para amostras com número superior a 50 e aplicável a variáveis com escala intervalar.

Na análise da distribuição da variável é ainda de ter em consideração a assimetria, sendo esta considerada grave quando a razão entre o valor de assimetria e o seu erro-padrão for superior a 2, exigindo nesse caso a utilização de métodos estatísticos não paramétricos.

Para o estudo da comparação de variáveis foram utilizados métodos paramétricos e não paramétricos, considerando como significativos, valores de significância bilateral inferiores a 0,05, ou a 0,01 quando aplicável.

Os métodos paramétricos foram utilizados sempre que as amostras revelaram aderência à normalidade através da análise dos histogramas e do resultado do teste de Kolmogorov-Smirnov, bem como dos dados do coeficiente de variação e da assimetria.

O método de ANOVA a um factor foi utilizado na comparação de mais de duas variáveis independentes, de escala intervalar e, sempre que se verificou diferença significativa, foi determinada a Menor Diferença Significativa (LSD) entre os diversos pares de grupos.

O teste t de Student foi utilizado para comparar as médias de duas variáveis independentes, de escala intervalar. Nestes dois métodos de comparação de médias, a diferença foi considerada significativa para $p < 0,05$.

Os métodos de análise não paramétricos não utilizam os valores numéricos directamente, mas sim os postos que eles ocupam numa série de dados ordenados por valores crescentes, série essa que reúne num só conjunto os dados de todas as amostras que vão ser comparadas. Se as várias amostras comparadas provierem da mesma população (amostras iguais), a média dos postos correspondentes a cada amostra será aproximadamente igual. Se tal não ocorrer, as amostras pertencerão provavelmente a populações diferentes, ou seja, são diferentes entre si.

Dos métodos não paramétricos, o teste de Wilcoxon foi utilizado para variáveis emparelhadas (duas medidas efectuadas no mesmo animal em tempos diferentes), de escala intervalar e distribuição não normal, sendo considerado significativo para $p < 0,01$.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para o estudo do índice de lesão por permitir comparar três ou mais variáveis independentes de escala ordinal. Sempre que para um valor de H, se observou diferença significativa, seguiu-se a aplicação do teste U de Mann-Whitney, para determinar entre que pares de grupos se verifica essa diferença, uma vez que este teste é aplicável à comparação de duas variáveis independentes de escala ordinal. Foi considerada uma diferença significativa para $p < 0,05$.

O teste de Cochran aplica-se quando os "n" elementos de uma mesma amostra são estudados segundo métodos diferentes de avaliação, sendo os dados experimentais apresentados numa escala nominal. O objectivo é determinar se os resultados dos diferentes métodos de avaliação serão equivalentes. A filosofia do teste considera que, se os diversos métodos produzem efeitos semelhantes sobre os elementos que compõem a amostra, a distribuição de valores nos vários métodos comparados será aproximadamente igual, tornando-se deste modo possível definir se a proporção de respostas é a mesma. Este método foi utilizado para comparar os resultados da análise de incidência de lesão, entre grupos de procedimentos experimentais cuja finalidade seja medir o mesmo tipo de lesão, e deste modo avaliar a concordância dos resultados. Foi considerada uma diferença significativa para $p < 0,05$.

Os testes de relação entre variáveis permitem estudar o comportamento de duas ou mais variáveis ao mesmo tempo, procurando detectar uma possível relação proporcional coerente entre a variação de uma em função da variação da(s) outra(s). A fim de avaliar se existe relação de variação entre duas variáveis emparelhadas com escala intervalar ou ordinal e sem aderência à normalidade, foi utilizado o método de Correlação de Spearman (r), sendo considerada uma diferença significativa para $p < 0,01$. O valor de r explica em que percentagem é que a causa vai contribuir para a consequência e varia entre -1 e +1:

- $r = 0$ significa que não existe qualquer correlação entre as variáveis
- $0 > r > -1$ significa uma correlação de variação no mesmo sentido
- $-1 > r > 0$ significa uma correlação de variação no sentido inverso
- $r = 1$ significa uma correlação perfeita
- $r = -1$ significa uma correlação perfeita negativa ou inversa.

A correlação entre a variação de uma variável em relação à variação de outra, é tanto mais significativa quanto mais próxima for de +1 (correlação positiva) ou de -1 (correlação negativa).

A maneira mais correcta de interpretar o valor da equação da recta de regressão linear que se obtém (R), é através do cálculo do quadrado de R; a este valor também se chama coeficiente de determinação. O valor de R² multiplicado por 100, corresponde à percentagem de uma variável que pode explicar a variação da outra. A interpretação deve também ser ponderada através da análise do gráfico de dispersão e pelo valor de p.

A ferramenta de cálculo utilizada no processamento de dados, nos estudos anteriormente referidos, foi o SPSS 11.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*), para o Windows.

Para o estudo da comparação da incidência de lesão optou-se por analisar a relação entre as variáveis nominais de presença e ausência de lesão, através da taxa de incidência ou risco relativo (RR) e da diferença de risco ou risco absoluto (RA). A ferramenta de cálculo utilizada no processamento dos dados deste estudo foi o RevMan 4.2.2 (*Review Manager*) da *Cochrane Collaboration*, para o Windows (última actualização em 2 de Junho de 2003) (Acessível em: <http://www.cochrane.org/software/download.htm>).

Este método de análise permite efectuar o cálculo da incidência (risco) de lesão dos grupos de intervenção face ao controlo ou ao comparador, possibilitando assim a comparação da probabilidade da ocorrência de um acontecimento entre os dois grupos.

O cálculo é efectuado a partir da construção de uma tabela de contingência de 2x2, onde se colocam nas células os valores de frequência do acontecimento em estudo, sendo o factor colocado nas linhas e o acontecimento colocado nas colunas (Tabela 14). Para dados recolhidos a partir de estudos prospectivos, a coluna superior representa usualmente o grupo em ensaio, sendo a linha inferior utilizada para o controlo ou para comparador. Na coluna da esquerda colocam-se os sujeitos que apresentam o acontecimento em estudo e na coluna da direita os que apresentam ausência.

Tabela 14. Tabela de contingência de 2x2 normalmente utilizada para a análise de dados de estudos prospectivos.

		Acontecimento		Total animais	Incidência de lesão	Risco Relativo	Risco Absoluto
		Presença Lesão	Ausência Lesão				
Factor	Produto Ensaio	a	b	a+b	$\frac{a}{a+b}$	$\frac{\left(\frac{a}{a+b}\right)}{\left(\frac{c}{c+d}\right)}$	$\left(\frac{a}{a+b}\right) - \left(\frac{c}{c+d}\right)$
	Produto Controlo	c	d	c+d	$\frac{c}{c+d}$		

O cálculo do risco relativo para o produto em ensaio é efectuado através da equação $[a/(a+b)]/[c/(c+d)]$, onde $[a/(a+b)]$ é a incidência de lesão no grupo em ensaio, a qual, multiplicada por 100, representa a percentagem de animais tratados com o produto em ensaio que têm presença de lesão, face ao total de animais do grupo. A incidência de lesão no grupo controlo é $[c/(c+d)]$. Quando o valor nas células for zero e causar problemas com o cálculo computacional dos efeitos ou do erro-padrão, é adicionado um valor de 0,5 a todas as células, para esse estudo (Cochrane Reviewers' Handbook, 2003).

A hipótese nula (H_0) é a de que as variáveis são independentes, isto é, os rácios são iguais a 1 (igualdade entre o numerador e o denominador), sendo a incidência de lesão idêntica nos dois grupos. Esta hipótese não se rejeita se o valor 1 pertencer ao intervalo de confiança (IC) a 95%. Se não pertencer ao IC, conclui-se que o factor e o acontecimento não são independentes.

Para a determinação do intervalo de confiança calcula-se o erro-padrão (EP) do logaritmo do risco relativo (RR) através da equação (4):

$$EP\{\ln(RR)\} = \sqrt{1/a + 1/c - 1/(a+b) - 1/(c+d)} \quad (4)$$

O valor obtido é multiplicado por 1,96 (uma vez que o IC é a 95%), após o que é subtraído e adicionado ao valor de RR, obtendo-se deste modo os limites do IC.

Quando o valor de RR é superior a 1 sugere um efeito prejudicial, enquanto que um valor inferior a 1 sugere um efeito benéfico. Foi igualmente efectuado o cálculo do significado estatístico da diferença entre os dois grupos através do teste exacto de Fisher, sendo considerado significativo bivariado para um valor de $p < 0,05$. A escolha do teste de Fisher em detrimento do qui-quadrado deve-se às limitações ao uso deste com amostras de número inferior a 20 ou quando a frequência esperada na tabela 2x2 é inferior a 5. Este teste tem ainda a vantagem de calcular o valor exacto de "p" (Pestana e Gageiro, 2003).

Na expressão gráfica do risco relativo cada linha horizontal representa o intervalo de confiança de cada estudo, ou seja, o intervalo no qual as proporções de eventos seriam verificadas em 95% das vezes, se o mesmo estudo fosse repetido 100 vezes, representando assim o efeito do tratamento. Os limites do intervalo de confiança permitem determinar o benefício máximo e mínimo de um tratamento em relação a outro.

O gráfico é dividido por uma linha vertical que marca o efeito nulo, isto é, o

risco relativo é igual a 1, significando que o efeito do tratamento foi igual nos dois grupos que são objecto de comparação. À esquerda do eixo vertical estão os resultados que apresentaram um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador ou ao controlo. Quando a linha horizontal cruza a linha vertical, significa que o resultado não é estatisticamente significativo ($p > 0,05$), em outras palavras, o acaso pode ser responsável pela diferença encontrada.

O cálculo da diferença de risco, isto é, o risco absoluto é efetuado através da expressão $RA = (a/(a+b)) - (c/(c+d))$.

Para a determinação do intervalo de confiança calcula-se o erro-padrão (EP) do risco absoluto (RA) através da equação (5):

$$EP(RA) = \sqrt{ab/(a+b)^3 + cd/(c+d)^3} \quad (5)$$

O valor obtido é multiplicado por 1,96 (uma vez que o IC é a 95%), após o que é subtraído e adicionado ao valor de RA, obtendo-se deste modo os limites do IC.

Os métodos estatísticos seleccionados para este estudo encontram-se sistematizados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Desenho da análise estatística. Comparação de variáveis.

Objectivos	N.º Variáveis	Escala Numérica	Distribuição	Métodos	Valor da Significância
Peso inicial e Peso final	2 Emparelhadas	Intervalar	Não Normal	Wilcoxon	0.01
Varição percentual de peso por grupo	3 ou mais Independentes	Intervalar	Normal	ANOVA a 1 factor	0.05
	2 Independentes	Intervalar	Normal	Menor Diferença Significativa (LSD)	
Varição percentual de peso e Dose	2 Independentes	Intervalar	Normal	Teste t de Student	0.05
Varição percentual de peso e Índice de Lesão Estômago	3 ou mais Independentes	Ordinal	Não Normal	Kruskal-Wallis	0.05
	2 Independentes	Ordinal	Não Normal	Mann-Whitney	
Índice de Lesão por grupo	3 ou mais Independentes	Ordinal	Não Normal	Kruskal-Wallis	0.05
	2 Independentes	Ordinal	Não Normal	Mann-Whitney	
Índice de Lesão e Dose	2 Independentes	Ordinal	Não Normal	Mann-Whitney	0,05
Incidência de Lesão por grupo	2 Independentes	Nominal	Não Normal	Risco Relativo	0.01
Incidência de Lesão por teste	3 ou mais Emparelhadas	Nominal	Não Normal	Cochran	0.05

Tabela 16. Desenho da análise estatística. Relação entre variáveis.

Objectivos	N.º Variáveis	Escala Numérica	Distribuição	Métodos	Valor da Significância
<i>Peso inicial e Peso final</i>	2 Emparelhadas	Intervalar	Não Normal	Correlação de Spearman	0,01
<i>Variação percentual de peso por grupo</i>	2 Emparelhadas	Intervalar	Não Normal	Correlação de Spearman	0,01
<i>Índice de Lesão</i>					
<i>Estômago e Variação percentual peso</i>	2 ou mais Emparelhadas	Ordinal	Não Normal	Correlação de Spearman	0,01

Em última análise, a escolha do teste estatístico adequado depende do número de situações experimentais, do número de variáveis que estão a ser controladas e do tipo de medida utilizada para analisar uma variável dependente.

O objectivo fundamental da análise estatística é testar se a diferença prevista pela hipótese experimental é significativa, ou se, pelo contrário, se deve aceitar a hipótese nula de que as diferenças detectadas são devidas a flutuações na performance dos animais.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

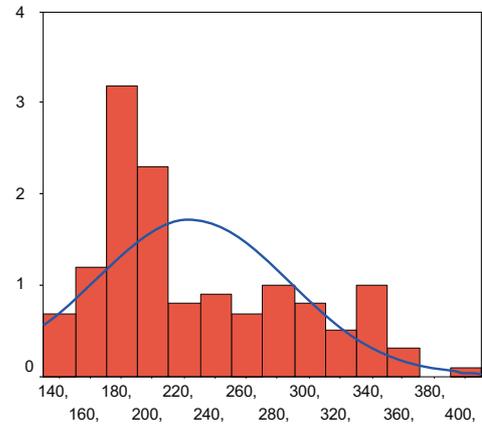
Caracterização de variáveis

As medidas de tendência central e de dispersão e variabilidade estudadas, encontram-se sistematizadas da seguinte forma:

Peso Inicial

Média	224,35	5,378 Erro-Padrão
		62,492 Desvio-Padrão
IC 95%	Inferior 213,71	
	Superior 234,99	
Média Podada a 5%	221,76	
Mediana	200	
Variância	3905,21	
Mínimo	130	
Máximo	400	
Amplitude variação	270	
Espaço interquartilico	100	
Coefficiente de skewness	0,718	0,209 Erro-Padrão

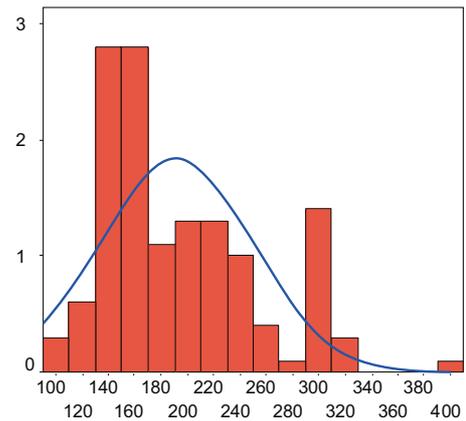
Frequência



Peso Final

Média	191,33	5,029 Erro-Padrão
		58,435 Desvio-Padrão
IC 95%	Inferior 181,39	
	Superior 201,28	
Média Podada a 5%	188,53	
Mediana	170	
Variância	3414,63	
Mínimo	100	
Máximo	390	
Amplitude variação	290	
Espaço interquartilico	82	
Coefficiente de skewness	0,874	0,209 Erro-Padrão

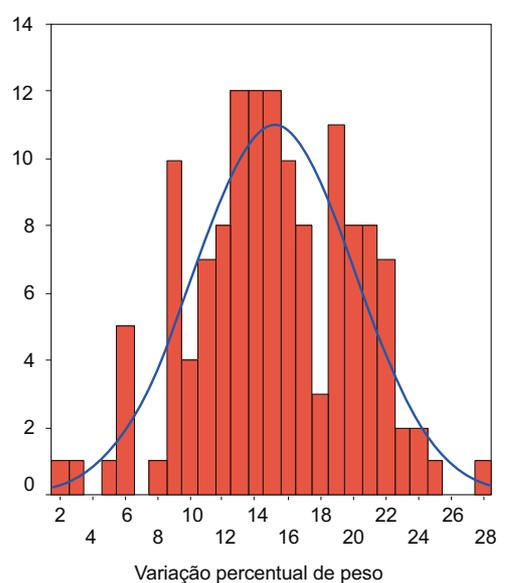
Frequência



Variação percentual de peso

Média	15,14	0,419 Erro-Padrão
		4,878 Desvio-Padrão
IC 95%	Inferior 14,31	
	Superior 15,97	
Média Podada a 5%	15,22	
Mediana	14,81	
Variância	23,79	
Mínimo	2,04	
Máximo	27,59	
Amplitude variação	25,55	
Espaço interquartilico	7,21	
Coefficiente de skewness	-0,16	0,209 Erro-Padrão

Frequência



Os parâmetros ponderados como critérios de selecção do tipo de teste paramétrico ou não paramétrico, com base na aderência à normalidade das variáveis de peso, englobaram o cálculo da medida da assimetria (coeficiente de skewness/erro-padrão), do coeficiente de variação CV [(desvio-padrão/média) x 100] e do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

A análise dos resultados da estatística descritiva e respectivos histogramas da variável de peso inicial, permite afirmar que se verifica uma assimetria positiva, uma vez que o valor calculado, 3,4, é superior a 1,96 ("z" - valor crítico de uma distribuição gaussiana para um IC a 95%). Verifica-se que existe uma dispersão média com um CV = 27,85% (15%<CV<30%), tendo o teste K-S comprovado que pode ser posto em causa o pressuposto da normalidade ($p=0,000$) para $p<0,05$.

Para a variável de peso final pode afirmar-se que se verifica uma assimetria positiva, uma vez que o valor calculado, 4,2, é superior a 1,96. Verifica-se que existe uma dispersão elevada com um CV = 30,5% (CV>30%), tendo o teste K-S comprovado que pode ser posto em causa o pressuposto da normalidade ($p=0,000$) para $p<0,05$.

Para a variável da variação percentual de peso pode afirmar-se que se verifica uma simetria, uma vez que o valor calculado, -0,049, está dentro do intervalo -1,96 a 1,96. Verifica-se que existe uma dispersão elevada com um CV = 32,22% (CV>30%), tendo o teste K-S comprovado que o pressuposto da normalidade não é posto em causa ($p=0,200$), para $p<0,05$, sendo deste modo pouco provável que a população não tenha normal.

Escolheram-se deste modo testes não paramétricos para o estudo do peso inicial e final e testes paramétricos para o estudo da variação percentual de peso.

1. MONITORIZAÇÃO DO PESO

Os animais estiveram sujeitos a jejum durante o período da experiência, aproximadamente 90 horas, com livre acesso à água. As condições de jejum da experiência conduzem a uma diminuição de peso e a lesões ao nível do intestino delgado (Doluisio et al., 1969; Somasundaram et al., 1997).

A monitorização efectuada durante o estudo revelou uma diminuição de peso em todos os grupos, como pode ser observado na Tabela 17 e na Figura 45.

Tabela 17. Variação de peso por grupos. Valores médios \pm desvio-padrão e mediana. %PP - variação percentual de perda de peso.

Produto	Peso Inicial (g)		Peso Final (g)		Perda de Peso (%PP)	
	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana
Água destilada (n=10)	185,0 \pm 27,4	182,5	152,6 \pm 24,1	145,0	17,51 \pm 3,37	18,2
IMfa DT (n=20)	250,8 \pm 70,7	252,5	221,0 \pm 64,9	222,5	12,14 \pm 3,06	11,9
DTX (n=10)	181,5 \pm 14,2	175,0	158,5 \pm 12,5	156,5	12,64 \pm 2,62	13,4
IMss DT (n=8)	179,4 \pm 25,1	175,0	150,0 \pm 21,7	142,5	16,35 \pm 3,21	16,4
DTX (n=7)	197,9 \pm 28,1	185,0	171,4 \pm 31,8	160,0	13,49 \pm 7,38	15,8
CLio DT (n=20)	235,0 \pm 77,9	232,5	201,5 \pm 77,9	202,5	15,95 \pm 6,32	15,4
DTX (n=10)	181,5 \pm 17,5	187,5	150,0 \pm 18,6	147,5	17,52 \pm 3,43	17,0
CSP DT (n=20)	254,0 \pm 79,1	247,5	222,3 \pm 73,9	230,0	13,08 \pm 4,11	12,4
DTX (n=10)	195,5 \pm 17,2	197,5	165,0 \pm 21,5	160,0	15,80 \pm 5,36	16,5
HP- β -CD DTX (n=20)	261,9 \pm 38,1	274,5	213,7 \pm 27,5	221,5	18,04 \pm 4,25	19,1
Total	224,4 \pm 62,5	200,0	191,3 \pm 58,4	170,0	15,14 \pm 4,9	14,8

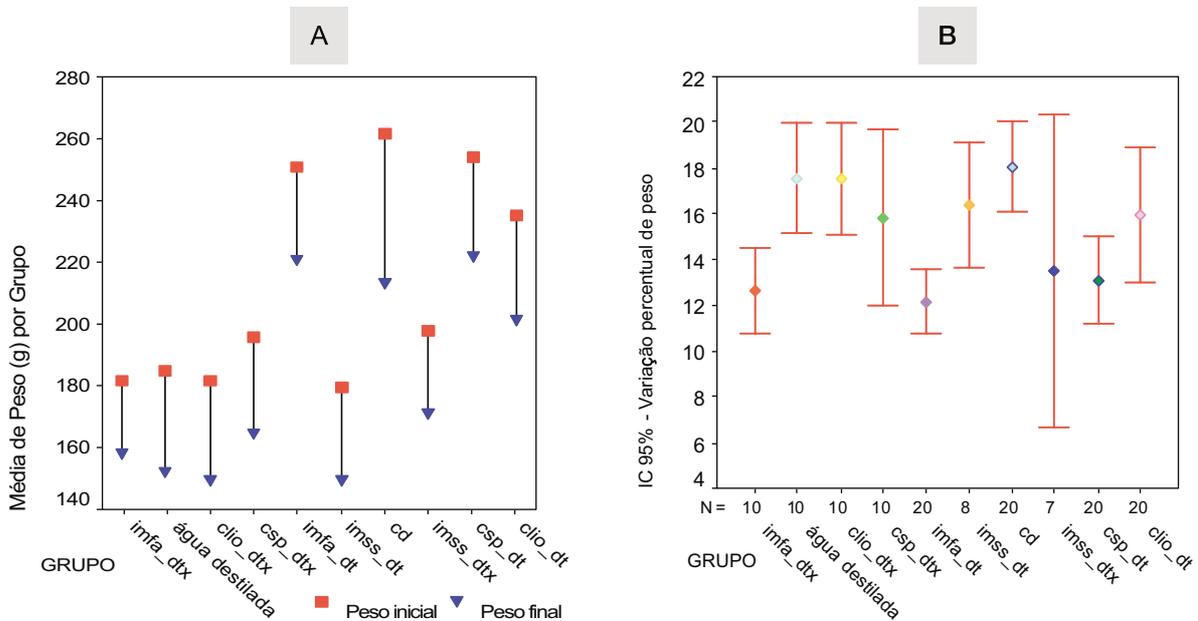


Figura 45. Representação gráfica da variação de peso.
A - Variação entre peso inicial e peso final.
B - Valores médios da variação percentual de peso, calculados para um intervalo de confiança de 95%.

Para estudar o comportamento do peso dos animais antes e depois do tratamento, efectuaram-se comparações e correlações entre o peso inicial e o peso final, no total dos animais e por grupos de produtos.

O objectivo de usar um desenho experimental emparelhado é o de controlar a variabilidade da experiência. Alguns factores não controlados na experiência afectarão igualmente as medidas antes e depois da experiência, não afectando conseqüentemente a diferença entre o antes e o depois. Analisando portanto só as diferenças, com um teste emparelhado corrigem-se essas fontes de variabilidade. Se o emparelhamento for efectivo, espera-se que as medidas antes e depois variem em simultâneo.

Uma vez que estas variáveis não apresentam aderência à normalidade, foram utilizados testes não paramétricos de comparação, teste de Wilcoxon e de correlação, coeficiente de Spearman, aplicáveis para amostras emparelhadas.

A comparação entre as variáveis através do teste de Wilcoxon, mostra que existe uma diminuição significativa de peso inicial em todos os animais ($p=0,000$). O mesmo teste foi aplicado para avaliar em quais dos grupos de produtos se verifica uma variação de peso mais significativa tendo-se concluído que é significativa em todos os grupos para $p<0,01$.

O resultado do teste de correlação de Spearman apresenta um valor de $r=0,976$; $p=0,000$, a qual é significativa. Pode assim concluir-se que existe uma forte associação linear positiva, o que significa que o peso final é directamente proporcional ao peso inicial, havendo uma variação simultânea, como se pode verificar através da observação do diagrama de dispersão da Figura 46.

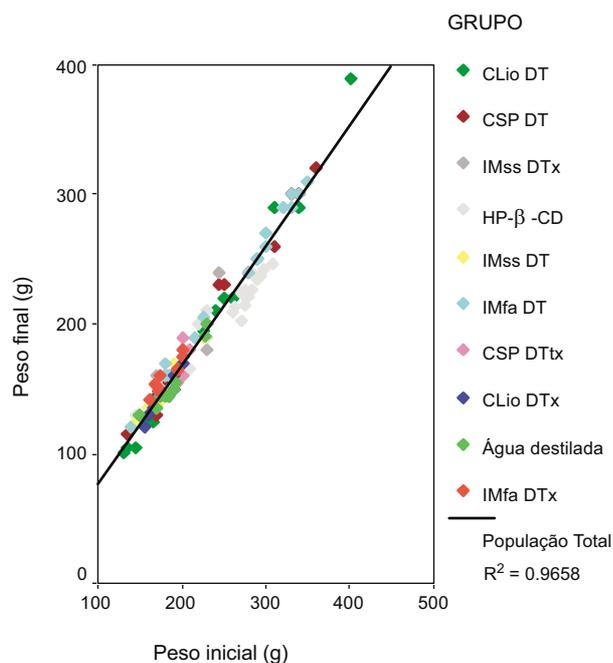


Figura 46. Diagrama de dispersão da correlação entre peso inicial e peso final.

As hipóteses que se podem colocar para explicar a variação de peso em função da intervenção efectuada são de o peso poder variar em função do tipo de produto administrado, da dose utilizada ou do índice de lesão provocado pelos produtos administrados. Esta última hipótese será avaliada no estudo histopatológico do estômago. A variável utilizada para testar estas hipóteses foi a de variação percentual de peso.

Comparação da variação percentual de peso por grupos de produtos

Na análise estatística destes resultados foi utilizado o teste de ANOVA a 1 factor por se tratar de uma variável com distribuição normal, obtendo-se como resultado uma diferença significativa entre os diversos grupos ($p=0,001$), para $p<0,05$.

À posteriori (*post hoc*) foi utilizado o teste da menor diferença significativa (LSD), para determinar entre que pares de grupos se situa a diferença. Optou-se por utilizar o teste LSD que calcula as comparações entre grupos utilizando sucessivos testes t, não sendo deste modo efectuado ajustamento do grau de erro associado a múltiplos testes, dado que se pretende comparar cada par de grupos de uma forma independente. Considera-se uma diferença significativa para $p<0,05$.

Os pares de grupos entre os quais se verifica diferença significativa são descritos na Tabela 18.

Tabela 18. Pares de grupos entre os quais se verifica diferença significativa ($p < 0,05$) de variação percentual de peso.

Pares de Grupos		Valor da Significância (p)
IMfa DT	Água destilada	0,003
	CLio DTx	0,003
	CLio DT	0,009
	CSP DTx	0,038
	IMss DT	0,027
	HP- β -CD	0,000
IMfa DTx	Água destilada	0,017
	CLio DTx	0,017
	HP- β -CD	0,002
CLio DT	CSP DT	0,046
	IMfa DT	0,009
CLio DTx	IMfa DT	0,003
	CSP DT	0,012
CSP DT	Água destilada	0,012
	CLio DTx	0,012
	HP- β -CD	0,001
	CLio DT	0,046
CSP DTx	IMfa DT	0,038
IMss DT	IMfa DT	0,027
IMss DTx	HP- β -CD	0,023
Água destilada	IMfa DTx	0,017
	IMfa DT	0,003
	CSP DT	0,012
HP-β-CD	IMfa DTx	0,002
	IMfa DT	0,000
	IMss DTx	0,023
	CSP DT	0,001

A análise destes dados não permite estabelecer uma relação de causalidade face aos produtos em estudo, uma vez que tanto estes como os produtos de controlo, água destilada e ciclodextrina, apresentam variações significativas de perda percentual de peso.

Comparação da variação percentual de peso por dose utilizada

Foi efectuado o reagrupamento dos animais por dose. A aplicação do teste t de Student à análise das médias da variação percentual de peso, revela que a diferença entre os dois grupos, dose terapêutica e dose tóxica, não é significativa ($p=0,806$), para $p<0,05$.

A Figura 47 representa graficamente a variação percentual de peso entre os dois grupos, podendo observar-se que são os animais da dose terapêutica que apresentam uma variação superior, apesar da diferença ser reduzida (0,23%).

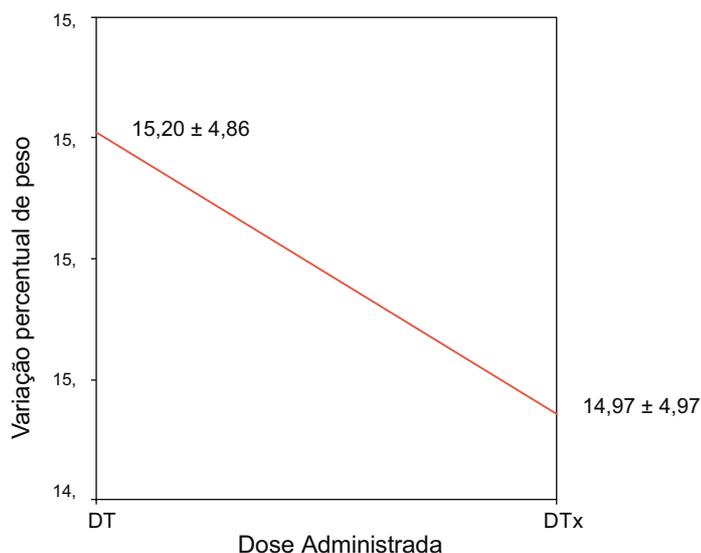


Figura 47. Variação percentual de peso face à dose administrada.

Tendo em consideração as variáveis em causa e para as condições do estudo, pode concluir-se que a dose não teve influência na variação percentual de peso.

2. OBSERVAÇÃO DAS FEZES

As fezes foram observadas ao longo do ensaio, tendo-se verificado o escurecimento destas, assim como o aparecimento de cheiro fétido, nos grupos de animais aos quais foi administrado IM, quer na forma ácida quer na forma de sal sódico, em ambas as doses.

Estes dados são sugestivos da presença de sangue e de alterações da flora bacteriana do tracto gastrointestinal.

Na Figura 48 pode observar-se a distribuição de frequência de animais que apresentam fezes normais e alteradas.

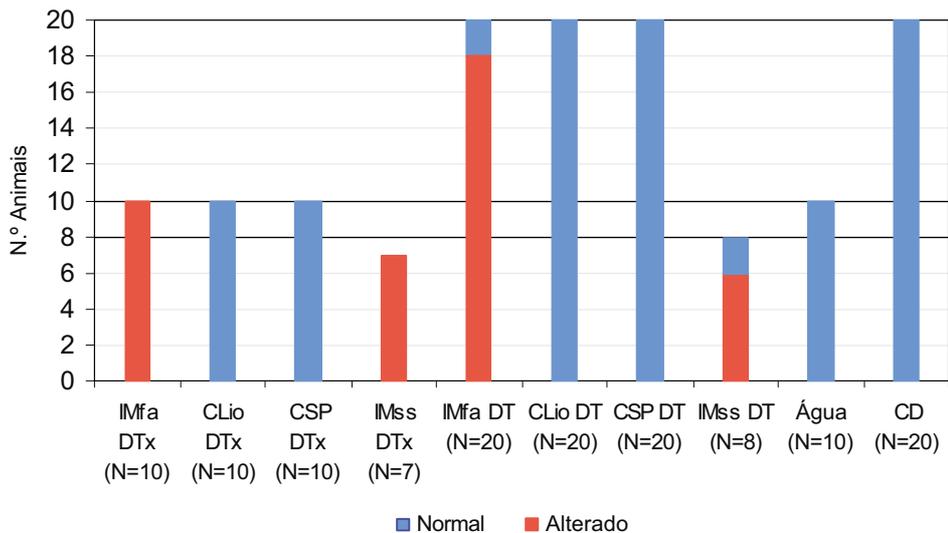


Figura 48. Frequência de animais que apresentam fezes normais e alteradas.

A avaliação da incidência através do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa diferença de risco de lesão revelador da ocorrência de hemorragia. Na Tabela 19 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste ao estudo da observação macroscópica do aspecto das fezes.

Verifica-se para todas as formas e doses de complexos (Tabela 19) uma diferença significativa em relação ao comparador, a IMfa na dose terapêutica ($p=0,000$) para $p<0,05$, o que torna pouco provável que a relação observada seja devida a uma coincidência da randomização da amostra. Tendo em consideração as condições do ensaio e o número de animais estudados, a análise estatística dos resultados permite afirmar que, em relação aos animais tratados com IMfa DT, os animais tratados com os dois complexos na dose terapêutica têm 2,7% de probabilidade de apresentarem fezes com aspecto alterado e que para a dose tóxica dos complexos a probabilidade é de 5,2%.

Uma vez que os dados estudados incluem os efeitos da randomização da amostra, o verdadeiro risco relativo não é provavelmente o mesmo que o valor calculado a partir dos dados experimentais. Todavia, poderemos estar 95% seguros de que o intervalo de confiança (IC) contém o verdadeiro risco relativo. A observação dos dois extremos do IC revela valores sempre inferiores a 1, o que implica uma probabilidade

Tabela 19. Incidência de animais que apresentam aspecto alterado das fezes, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **N** - Normal; **A** - Alterado; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Aspecto (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto (IC 95%)		
		A	N		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,540	10 18	0 2	1,111	-0,1	-0,09	0,29
CLio DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	0 18	20 2	0,027 ⁽¹⁾	0,857	-1,05	-0,75
CLio DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	0 18	10 2	0,052 ⁽¹⁾	0,836	-1,09	-0,71
CSP DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	0 18	20 2	0,027 ⁽¹⁾	0,857	-1,05	-0,75
CSP DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	0 18	10 2	0,052 ⁽¹⁾	0,836	-1,09	-0,71
IMss DT (PE) IMfa DT (PC)	0,555	6 18	2 2	0,833	0,15	-0,48	0,18
IMss DTx (PE) IMfa DT (PC)	1,000	7 18	0 2	1,111	-0,1	-0,12	0,32

*Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

de risco sempre inferior à do comparador (Figura 49), sugerindo assim um efeito benéfico.

Em termos de risco absoluto regista-se uma redução de 85,7% para a dose terapêutica dos complexos e 83,6% para a dose tóxica.

No respeitante ao risco relativo da IMss em ambas as doses utilizadas, verifica-se que a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p=0,555$ para a dose terapêutica e $p=1,000$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem, todavia, concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o IC a 95% inclui a hipótese nula (Figura 49), ou seja, que os produtos têm igual efeito, estendendo-se os limites entre valores representativos de uma associação negativa ($RR < 1$) e valores representativos de uma associação positiva ($RR > 1$). A análise dos limites do IC não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo num maior número de animais para chegar a uma conclusão.

Quanto à análise do risco absoluto há uma redução de 15% para a dose terapêutica e uma aumento de 10% para a dose tóxica.

Para a dose tóxica da IMfa verifica-se uma diferença não significativa ($p=0,540$), observando-se um risco relativo equivalente ao da dose tóxica da IMss e evidenciando um aumento do risco absoluto de 10% de apresentar alteração das fezes.

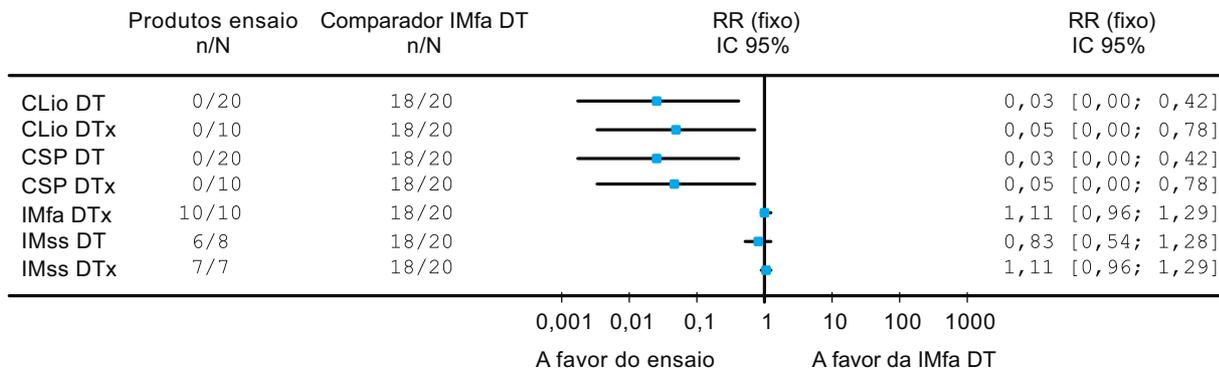


Figura 49. Representação gráfica do risco relativo para o estudo das fezes.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 49) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

No que respeita à IM na forma de sal sódico, em ambas as doses utilizadas, verifica-se que as linhas representativas do IC cruzam a linha vertical do efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é semelhante nos grupos que são objecto de comparação, o que também é evidenciado pelo facto do valor de p ser superior a 0,05 (Tabela 19).

Uma vez que neste indicador de presença de lesão ao nível gástrico se recorre a um método observacional do aspecto das fezes, os resultados devem ser corroborados por outros métodos de maior acuidade. Deste modo, este indicador será confrontado com a observação da presença de sangue na mucosa e com a análise citológica do muco gástrico para avaliação da presença de eritrócitos.

3. MORTALIDADE

Durante o período de tratamento, 96 horas, não houve registo de morte de qualquer animal em nenhum dos grupos.

4. ESTUDOS EFECTUADOS NO ESTÔMAGO

4.1. Avaliação macroscópica

A observação macroscópica revela em alguns animais, com maior incidência nos grupos da Indometacina não complexada, alteração edematosa do aspecto da mucosa, cor avermelhada e a presença de sangue. As lesões encontradas foram do tipo úlcera e sufusões hemorrágicas.

A síntese dos resultados da observação macroscópica efectuada no estômago, patente na Tabela 20, é expressa em número de animais que apresentam alterações face ao número total de animais de cada grupo.

Tabela 20. Resultados da observação macroscópica efectuada no estômago em todos os grupos de animais, apresentados sob a forma de proporção de animais com lesão em relação ao n.º total de animais e índice de lesão gástrica macroscópico (**ILGM**) máximo observado para os animais de cada grupo.

Produto	Dose	Observação Macroscópica			
		Presença Sangue	Mucosa Normal	Presença Lesões	ILGM Máximo
<i>IMfa</i>	DT	13/20	4/20	8/20	4
	DTx	8/10	2/10	6/10	4
<i>IMss</i>	DT	3/8	3/8	4/8	2
	DTx	4/7	3/7	3/7	3
<i>CLio</i>	DT	0/20	15/20	0/20	1
	DTx	0/10	8/10	0/10	1
<i>CSP</i>	DT	0/20	17/20	0/20	1
	DTx	0/10	9/10	0/10	1
<i>Água Destilada</i>	0,005ml/Kg	0/10	0/10	0/10	—
<i>HP-β-CD</i>	DTx	0/20	0/20	0/20	—

4.1.1. Indometacina não complexada

4.1.1.1. Tipos de lesão induzidos pela indometacina forma ácida

No grupo da dose terapêutica, 50% dos animais evidenciam a presença de sangue, 60% apresentam a mucosa edemaciada ou muito escura e 30% têm lesões múltiplas. Estes resultados estão patentes na Figura 50, correspondente a uma amostra do tipo de lesões provocadas em um dos animais deste grupo.

Nos animais do grupo da dose tóxica, 80% apresentam pequenas sufusões hemorrágicas, 90% alterações da mucosa tipo edemaciada e 60% têm úlceras. A Figura 51 é representativa de um exemplo de lesão de um dos animais deste grupo.



Figura 50. Análise macroscópica. Lesões múltiplas no estômago de um animal ao qual foi administrada IMfa, dose terapêutica.



Figura 51. Análise macroscópica. Lesões múltiplas no estômago de um animal ao qual foi administrada IMfa dose tóxica.

4.1.1.2. Tipos de lesão induzidos pela indometacina sal sódico

Os animais do grupo ao qual foi administrada a dose terapêutica, apresentam lesões do tipo exemplificado na Figura 52, com uma incidência de 37,5% que evidenciam a presença de sangue, 62,5% apresentam a mucosa edemaciada ou muito escura e 50% têm lesões múltiplas.

Nos animais do grupo ao qual foi administrada dose tóxica, 57% apresentam pequenas sufusões hemorrágicas, 71,4% têm alterações da mucosa e em 57% existem úlceras, como se exemplifica na Figura 53.



Figura 52. Análise macroscópica. Mucosa edemaciada e algumas lesões no estômago de um animal ao qual foi administrada IMss, dose terapêutica.



Figura 53. Análise macroscópica. Mucosa edemaciada e algumas lesões no estômago de um animal ao qual foi administrada IMss, dose tóxica.

4.1.1.3. Índice de lesão da indometacina não complexada

O maior grau de lesão, índice 3 e 4, observa-se nos animais aos quais foi administrada IM forma ácida. Isto é devido, em parte, à baixa solubilidade do fármaco nas condições de pH do estômago e a um contacto com a mucosa por um período de tempo maior. Como consequência, ocorre uma alta concentração local, a qual leva a uma irritação da parede e a ulceração.

O menor grau de lesão provocado pela forma de sal, índices 2 e 3, relativamente à forma ácida, pode ser devido a uma solubilidade superior desta forma em relação à forma ácida, diminuindo assim o tempo de contacto com o fármaco não dissolvido (Nagarsenker et al., 2000).

4.1.2. Indometacina complexada

4.1.2.1. Tipos de lesão induzidos pela indometacina complexada

Observa-se uma diminuição da incidência e da gravidade da lesão em todos os parâmetros analisados, ou mesmo sem evidência de lesão, tanto nos animais do grupo da dose terapêutica, como nos do grupo da dose tóxica. Na Tabela 20 resumem-se os dados da proporção de animais com evidência de lesão face ao número total de animais

e nas Figuras 54, 55, 56 e 57, apresentam-se imagens representativas de animais destes grupos, sem evidência de lesão, antes e depois da preparação para estudo histopatológico.



Figura 54. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CSP, dose terapêutica.



Figura 55. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CSP, dose tóxica.



Figura 56. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CLio, dose terapêutica.



Figura 57. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada CLio, dose tóxica.

Os únicos animais que apresentaram evidência macroscópica de lesão pertencem ao grupo da IM complexada por SP, utilizada na dose terapêutica, que apresenta alterações da mucosa ligeiramente edemaciada em dois dos 20 animais estudados (Figura 58).



Figura 58. Análise macroscópica. Mucosa ligeiramente edemaciada e evidência de lesão no estômago de um dos dois animais do grupo da IM complexada por SP.

A estabilidade dos complexos formados com a IM e a competição para formação de complexos por parte de moléculas endógenas existentes no TGI (colesterol e ácidos biliares, entre outros), depende da constante de estabilidade dos respectivos complexos formados. Do mesmo modo, o permanente equilíbrio entre as moléculas livres de IM e de ciclodextrina e as moléculas de complexo de inclusão, bem como a hipótese já anteriormente referida da existência de IM adsorvida à superfície da CD no complexo preparado pelo método de secagem por pulverização, pode concorrer para não conferir protecção completa.

Por outro lado o refluxo do conteúdo duodenal pode voltar a expor a mucosa gástrica em contacto com a IM já liberta do complexo nesta fase do TGI, podendo também contribuir como co-factor de lesão (Somasundaram et al., 1997).

Estes resultados são confirmados pela presença de eritrócitos no estudo citológico e pelos dados do estudo histológico nos mesmos animais.

4.1.2.2. Índice de lesão da indometacina complexada

A capacidade de complexação implica que as partículas de fármaco estão solubilizadas, não ocorrendo assim a sua adesão à parede do estômago durante o período de trânsito gástrico, reduzindo deste modo o efeito de irritação local.

Os estudos de dissolução efectuados na Parte I evidenciam o aumento da eficácia de dissolução com o fármaco complexado, o que contribui também para a diminuição de fármaco sob a forma cristalina em contacto com a mucosa.

A lesão remanescente, mesmo com fármaco complexado, com um grau de gravidade classificado como ligeiro (grau 1 - Alteração de cor ligeiramente perceptível) pode ainda ser devida ao efeito sistémico do fármaco, por inibição da síntese das PGs (PGI_2 e PGE_2) as quais têm uma acção protectora da mucosa gástrica (Nagarsenker et al., 2000).

4.1.3. Água destilada e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Nestes dois grupos de animais não se observou evidência macroscópica de qualquer tipo de lesão, como está patente na Tabela 20 e nas Figuras 59 e 60, exemplificativas de órgãos de animais destes grupos.



Figura 59. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada água destilada.



Figura 60. Análise macroscópica. Estômago sem evidência de lesão num animal ao qual foi administrada ciclodextrina.

4.1.4. Análise comparativa da presença de lesão gástrica macroscópica

4.1.4.1. Aspecto da mucosa

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa diferença de risco de lesão indiciador de processo inflamatório. Na Tabela 21 encontram-se sistematizados os resultados da realização do teste aplicado ao estudo da avaliação macroscópica do aspecto da mucosa gástrica.

Tabela 21. Incidência de animais que apresentam alteração do aspecto da mucosa gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **A** - Alterado; **N** - Normal; **RA** - Risco Absoluto **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Mucosa (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto (IC 95%)		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE)	1,000	8	2	1,000	0,00	-0,30	0,30
IMfa DT (PC)		16	4				
CLio DT (PE)	0,001*	5	15	0,313	-0,600	-0,90	-0,30
IMfa DT (PC)		16	4				
CLio DTx (PE)	0,004*	2	8	0,250	-0,550	-0,81	-0,29
IMfa DT (PC)		16	4				
CSP DT (PE)	0,000*	3	17	0,187	-0,650	-0,88	-0,42
IMfa DT (PC)		16	4				
CSP DTx (PE)	0,000*	1	9	0,125	-0,700	-0,96	-0,44
IMfa DT (PC)		16	4				
IMss DT (PE)	0,371	5	3	0,781	-0,175	-0,55	0,20
IMfa DT (PC)		16	4				
IMss DTx (PE)	0,328	4	3	0,714	-0,229	-0,63	0,18
IMfa DT (PC)		16	4				

*Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

• ⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Verifica-se para todas as formas e doses de complexo (Tabela 21) uma diferença significativa em relação à IMfa DT, para um valor de $p < 0,05$. Tendo em consideração as condições do ensaio e o número de animais estudados, a análise estatística dos resultados permite afirmar que, em relação aos animais tratados com IMfa DT, os animais

tratados com o CSP na dose terapêutica 18,7%, apresentam menor probabilidade de alteração da mucosa (Tabela 21), do que o CLio na dose terapêutica 31,3%. Em termos de risco absoluto, observa-se que é o CSP, em ambas as doses que apresenta maior redução.

No que se refere à IMss nas duas doses utilizadas, verifica-se uma diferença não significativa em relação à IMfa DT, $p=0,371$ para a dose terapêutica e $p=0,328$ para a dose tóxica. Os dados não permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o IC a 95% inclui a hipótese nula (Figura 61), A análise dos limites do IC não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo num maior número de animais.

Quanto ao risco absoluto, a IMss regista uma redução de 17,5% para a dose terapêutica e de 22,9% para a dose tóxica.

Para a dose tóxica da IMfa verifica-se uma diferença não significativa ($p=1,000$) evidenciando um risco relativo semelhante de ocorrência de processo inflamatório.

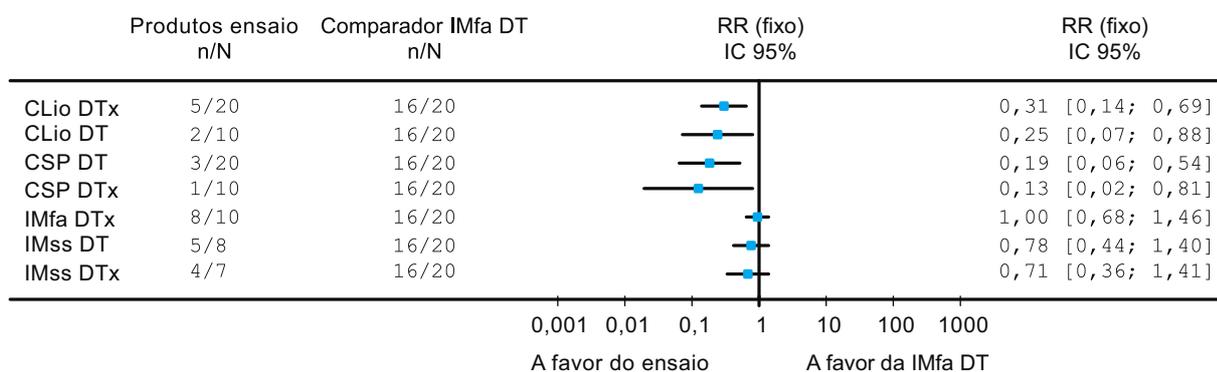


Figura 61. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da alteração do aspecto da mucosa gástrica.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 61) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

4.1.4.2. Presença de sangue

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa diferença de risco de lesão que evidencie a ocorrência de hemorragia. Na Tabela 22 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste realizado ao estudo da observação macroscópica da presença de sangue na mucosa gástrica.

Tabela 22. Incidência de animais que apresentam presença de sangue na mucosa gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **A** - Ausência; **P** - Presença; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Sangue (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto (IC 95%)		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,675	8 13	2 7	1,231	0,150	0,787	1,924
CLio DT (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	0 13	20 7	0,037 ⁽¹⁾	-0,619	0,002	0,583
CLio DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	0 13	10 7	0,071 ⁽¹⁾	-0,598	0,005	1,081
CSP DT (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	0 13	20 7	0,037 ⁽¹⁾	-0,619	0,002	0,583
CSP DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	0 13	10 7	0,071 ⁽¹⁾	-0,598	0,005	1,081
IMss DT (PE) IMfa DT (PC)	0,231	3 13	5 7	0,577	-0,275	0,223	1,493
IMss DTx (PE) IMfa DT (PC)	1,000	4 13	3 7	0,879	-0,079	0,429	1,802

*Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

• ⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Verifica-se para todas as formas e doses de complexos uma diferença significativa em relação à IMfa DT ($p=0,001$) para um valor de $p < 0,05$. Tendo em consideração as condições do ensaio e o número de animais estudados, a análise estatística dos resultados permite afirmar que, em relação aos animais tratados com IMfa DT, os animais

tratados com CLio DT e CSP DT têm 3,7% de probabilidade de apresentarem evidência de sangue na mucosa gástrica, com uma redução de risco absoluto de 61,9%.

No que respeita à IMss em ambas as doses utilizadas, verifica-se que a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p=0,231$ para a dose terapêutica e $p=1,000$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto afirmar-se com 95% confiança que os produtos têm igual efeito. A análise dos limites do IC (Figura 62) não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo numa amostra maior.

A IMss na dose terapêutica apresenta uma redução de risco absoluto (27,5%) que é inferior à de qualquer dos complexos na dose terapêutica (Tabela 22).

Para a dose tóxica da IMfa verifica-se uma diferença não significativa ($p=0,675$) semelhante à obtida para a IMss DT, evidenciando um aumento do risco relativo e absoluto (15%) de apresentar sangue na mucosa, sinal de hemorragia.

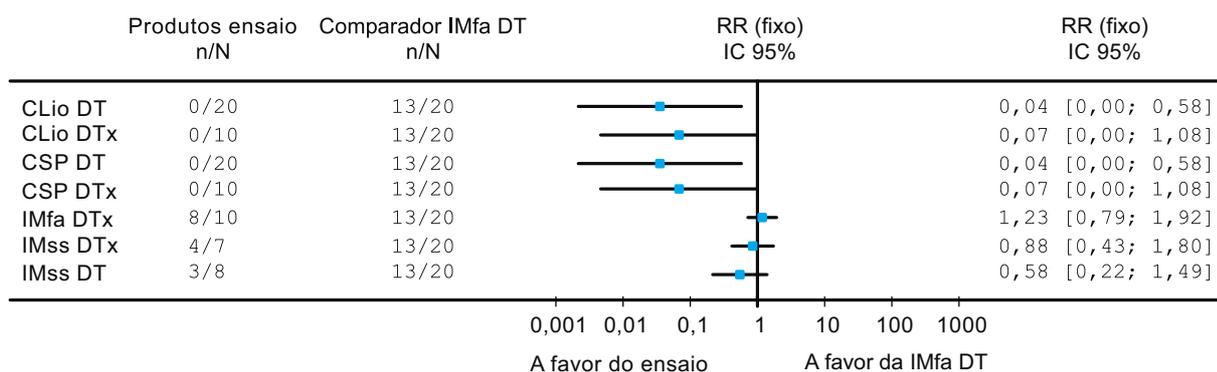


Figura 62. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de sangue na mucosa gástrica.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 62) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC das formas de complexo na dose terapêutica cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador, mesmo para as doses tóxicas, cujo limite superior do IC apresenta um efeito nulo ($RR=1,081$).

No que respeita à IM na forma de sal sódico, em ambas as doses utilizadas se verifica que as linhas representativas do IC cruzam a linha vertical do efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é semelhante.

4.1.4.3. Incidência e índice de lesão

Íncidência de lesão

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa uma diferença de risco de lesão que evidencie a existência de úlceras. Na Tabela 23 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste ao estudo da avaliação da lesão macroscópica do estômago.

Tabela 23. Incidência de animais que apresentam lesão macroscópica do estômago, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **P** - Presença; **A** - Ausência; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Lesão (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto (IC 95%)		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT (PC)	1,000	8 17	2 3	0,941	-0,050	-0,34	0,24
CLio DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	5 17	15 3	0,294	-0,600	-0,85	-0,35
CLio DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	2 17	8 3	0,235	-0,650	-0,94	-0,36
CSP DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	3 17	17 3	0,176	-0,700	-0,92	-0,48
CSP DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	1 17	9 3	0,118	-0,750	-0,99	-0,51
IMss DT (PE) IMfa DT (PC)	0,606	6 17	2 3	0,882	-0,100	-0,44	0,24
IMss DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,580	5 17	2 3	0,840	-0,136	-0,51	0,23

*Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Verifica-se para todas as formas e doses de complexos uma diferença significativa em relação à IMfa na dose terapêutica, o que torna pouco provável que a relação observada seja devida a uma coincidência da randomização da amostra. Tendo em

consideração as condições do ensaio e o número de sujeitos estudados, a análise estatística dos resultados permite afirmar que, em relação aos animais tratados com IMfa DT, os animais tratados com CLio DT têm 29,4% de probabilidade de apresentarem evidência de sangue na mucosa gástrica, enquanto que com o CSP DT tem uma probabilidade de 17,6%.

A análise do risco absoluto evidencia uma maior redução para o CSP em ambas as doses relativamente às doses de CLio (Tabela 23).

Em relação à IMss nas duas doses utilizadas, verifica-se que a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p=0,606$ para a dose terapêutica e $p=0,580$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o intervalo de confiança a 95% inclui a hipótese nula. A análise dos limites do IC (Figura 63) não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo num maior número de animais. No que se refere ao risco absoluto verifica-se sómente uma redução de 10% para a dose terapêutica e de 13,6% para a dose tóxica (Tabela 23).

Para a dose tóxica da IMfa verifica-se uma diferença não significativa ($p=1,000$) para um valor de $p<0,05$.

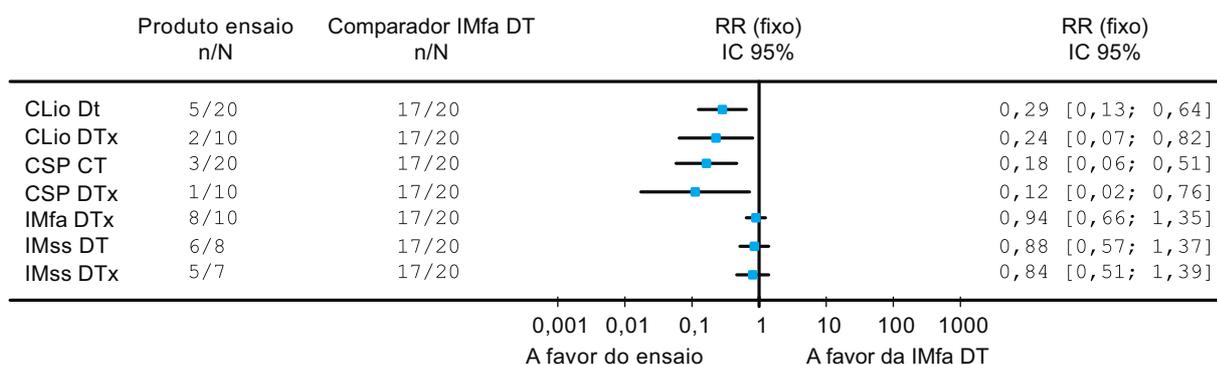


Figura 63. Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão macroscópica da mucosa gástrica.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 63) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

No que respeita à IM na forma de sal sódico, em ambas as doses utilizadas se verifica que as linhas representativas do IC cruzam a linha vertical do efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é semelhante nos grupos que são objecto de comparação, não evidenciando benefícios em relação à IMfa DT.

Índice de lesão

A análise estatística dos resultados do índice de lesão macroscópico da mucosa gástrica foi efectuada através do teste de Kruskal-Wallis, tendo sido obtido um valor de $H=30,646$ para a dose terapêutica e de $H=16,996$ para a dose tóxica, apresentando ambos uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 ($p=0,000$). A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney foram obtidos os valores de p da Tabela 24.

Tabela 24. Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão gástrica na avaliação macroscópica. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Terapêutica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
<i>Nível de significância (p)</i>	0,916	0,000*	0,000*	0,001*	0,004*	0,435
Pares de Grupos (Dose Tóxica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
<i>Nível de significância (p)</i>	0,210	0,001*	0,003*	0,010*	0,026*	0,542

Os valores de p obtidos evidenciam diferenças significativas entre as formas de complexo e a IM na forma ácida e na de sal sódico, quer na dose terapêutica, quer na dose tóxica.

A IMfa e a IMss não apresentam diferença significativa para a dose terapêutica ou para a dose tóxica, o mesmo se verificando quando se comparam os complexos entre si, na dose terapêutica ou na dose tóxica.

4.2. Estudo Histopatológico

4.2.1. Alterações morfológicas

A observação microscópica dos cortes do estômago revelou a presença dos seguintes tipos de alterações morfológicas: úlcera, hemorragia, congestão vascular, necrose, edema, exulceração e infiltrado inflamatório.

Na Tabela 25 apresenta-se uma síntese dos resultados da observação microscópica dos cortes de tecido estudados. Os resultados são expressos em número de animais nos quais se detectou a presença de alterações morfológicas (Am), face ao número total de animais (At) de cada grupo e a proporção relativa (PR).

Tabela 25. Síntese dos resultados do índice de lesão gástrica (**ILGm**) do estudo histopatológico.

Am = n.º de animais com alteração morfológica;

At = n.º total de animais;

PR = Proporção entre Am e At (**Am/At**);

PR(ILM) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão máximo (**IL M**) e o n.º total de animais (**AIL M/At**);

PR(IL m) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão mínimo (**IL m**) e o n.º total de animais (**AIL m/At**).

		Estudo Histológico				
		Alterações Morfológicas ao nível Gástrico				
Produto	Dose	Presença (Am/At = PR)	IL M (PR = AIL M/At)	IL m (PR = AIL m/At)		
<i>Mfa</i>	DT	17/20 (0,85)	4	2/20 (0,10)	1	8/20 (0,40)
	DTx	10/10 (1,00)	3	6/10 (0,60)	2	4/10 (0,40)
<i>Mss</i>	DT	4/8 (0,50)	4	1/8 (0,125)	2	2/8 (0,25)
	DTx	4/7 (0,57)	4	1/7 (0,142)	1	1/7 (0,142)
<i>CLio</i>	DT	5/20 (0,25)	1	5/20 (0,25)	—	—
	DTx	2/10 (0,20)	1	2/10 (0,20)	—	—
<i>CSP</i>	DT	2/20 (0,10)	1	2/20 (0,10)	—	—
	DTx	1/10 (0,10)	1	1/10 (0,10)	—	—
<i>Água Destilada</i>	0,005ml/Kg	0/10 (0,00)	—	—	—	—
<i>HP-β-CD</i>	DTx	0/20 (0,00)	—	—	—	—

4.2.1.1. Indometacina não complexada

4.2.1.1.1. Indometacina forma ácida

Este grupo apresenta lesões morfológicas na parede do estômago. Nos animais submetidos à administração do fármaco na dose terapêutica observam-se sobretudo exulcerações (Figura 64) e algumas úlceras (Figura 65), por vezes profundas.

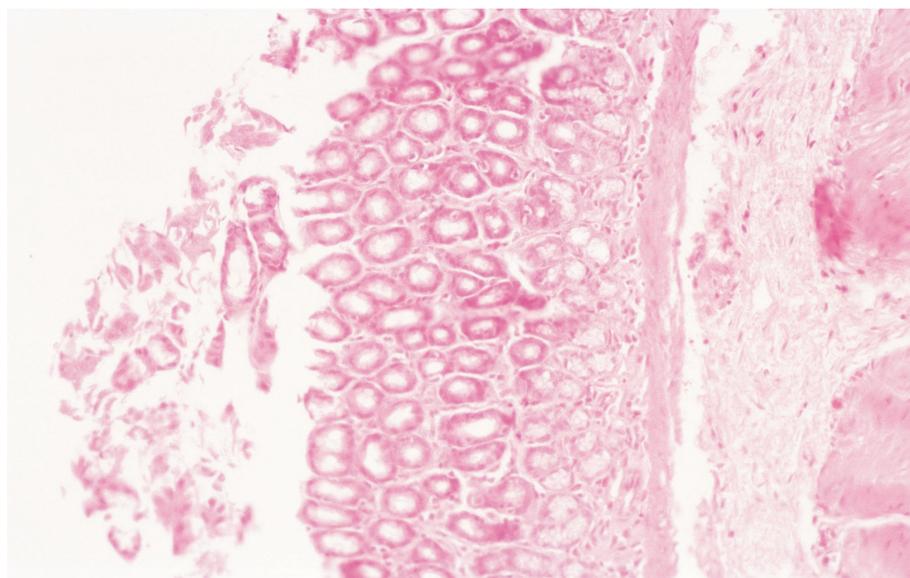


Figura 64. Análise histopatológica - Perda da camada superficial da mucosa - exulceração. IMfa dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

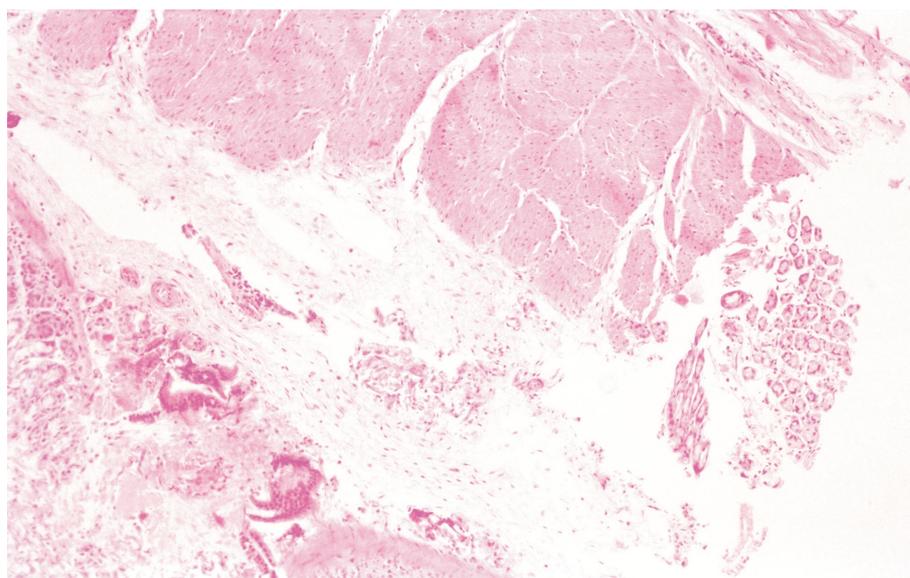


Figura 65. Análise histopatológica - Úlcera. IMfa dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Nos animais submetidos à administração do fármaco em dose tóxica, além das lesões observadas no subgrupo anterior, verifica-se com frequência a presença de hemorragias extensas, necrose da parede e infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleadas, de que se apresentam exemplos nas Figuras 66 e 67.

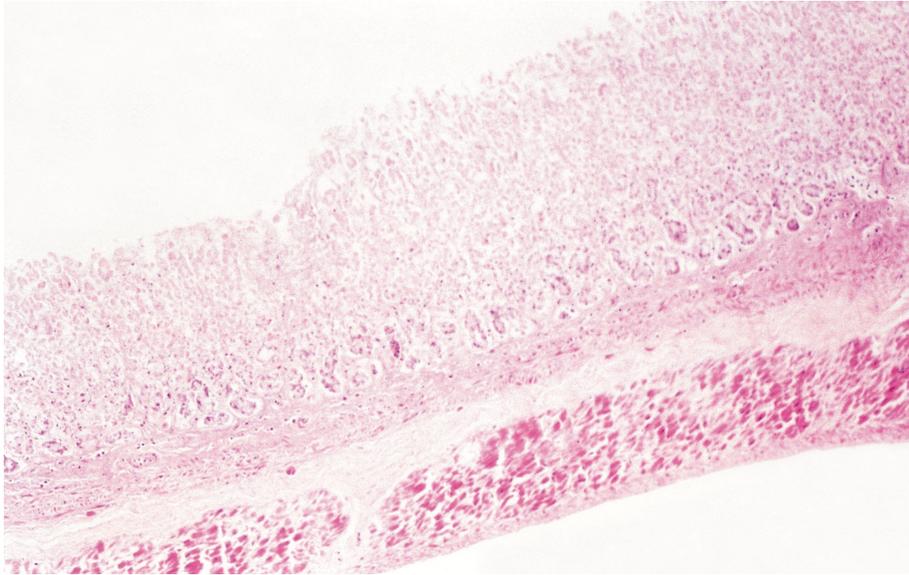


Figura 66. Análise histopatológica - Área extensa de necrose da mucosa. IMfa dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

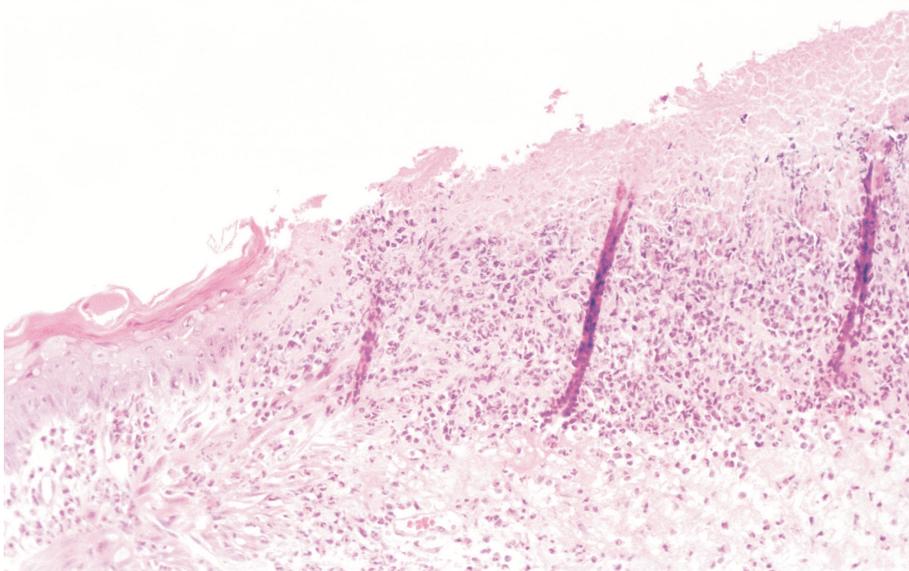


Figura 67. Análise histopatológica - Área extensa de necrose do corpo com infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Observa-se igualmente alteração do corpo com vacuolização, infiltrado inflamatório e perda de epitélio malpighiano e queratina (Figuras 68 e 69).

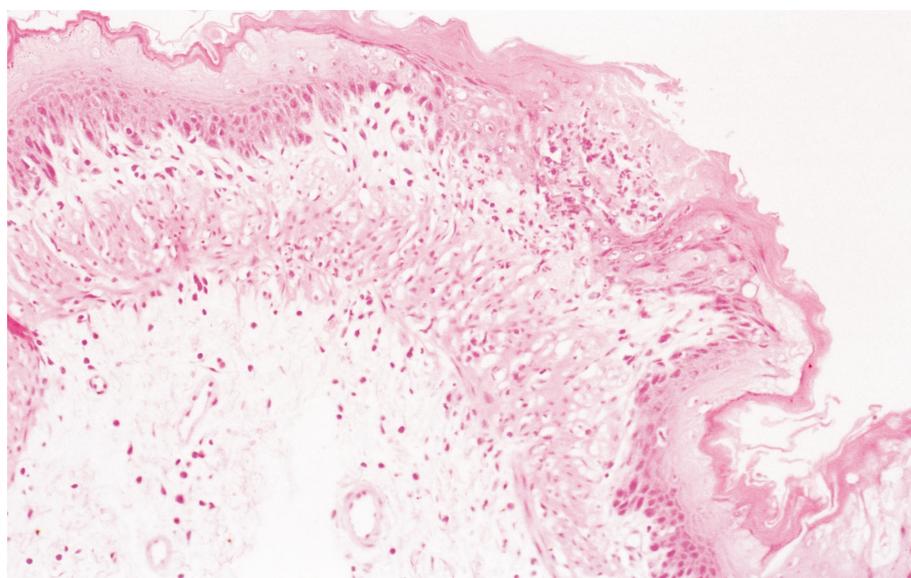


Figura 68. Análise histopatológica - Alterações do corpo com vacuolização, perda do epitélio malpighiano e de queratina, observando-se também infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

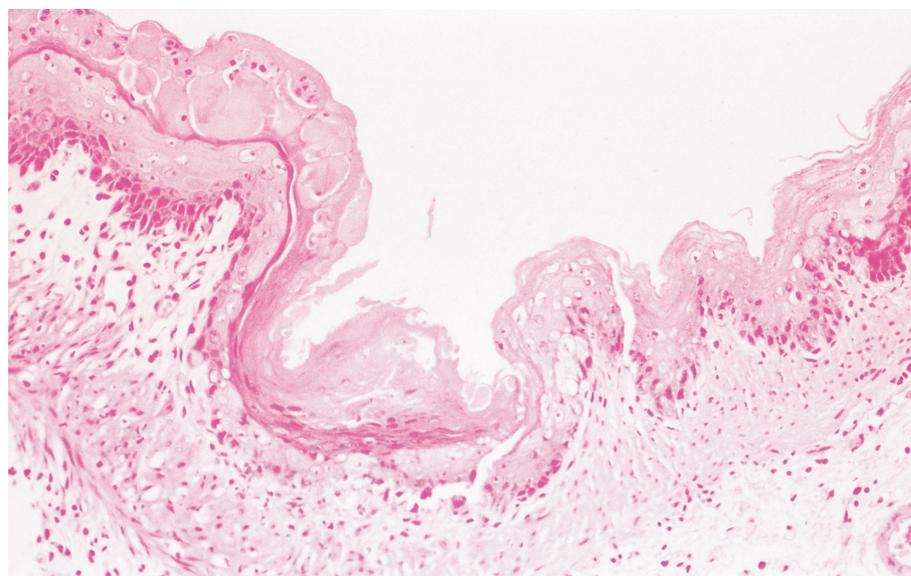


Figura 69. Análise histopatológica - Alterações do corpo com vacuolização, perda do epitélio malpighiano e de queratina, observando-se também infiltrado inflamatório. IMfa dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

4.2.1.1.2. Indometacina sal sódico

Este grupo regista também o aparecimento de lesões morfológicas na parede do estômago semelhantes às observadas no grupo da IM forma ácida.

Nos animais submetidos à administração do fármaco na dose terapêutica observam-se sobretudo exulcerações (Figura 70) e algumas úlceras (Figura 71), em regra menores do que no grupo da IM forma ácida.

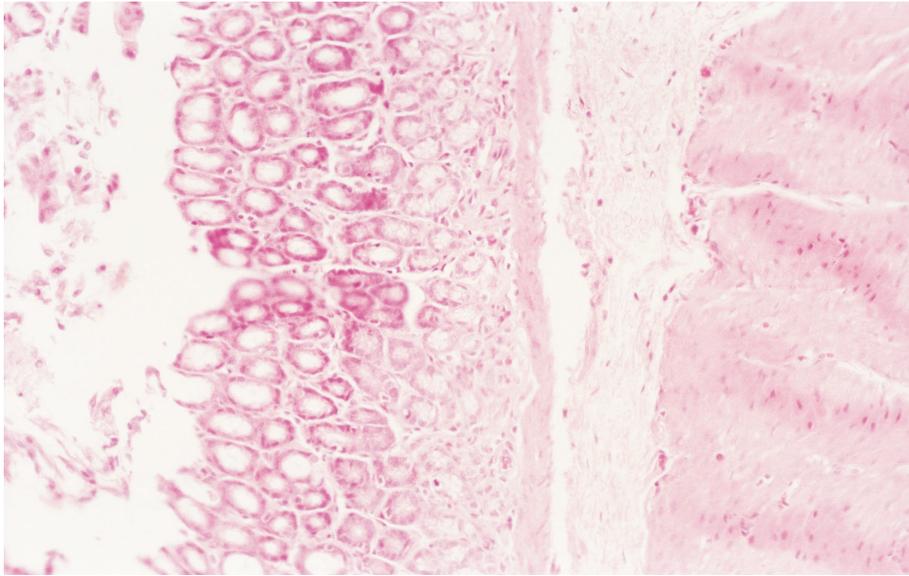


Figura 70. Análise histopatológica - Perda da camada superficial da mucosa - exulceração. IMss dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

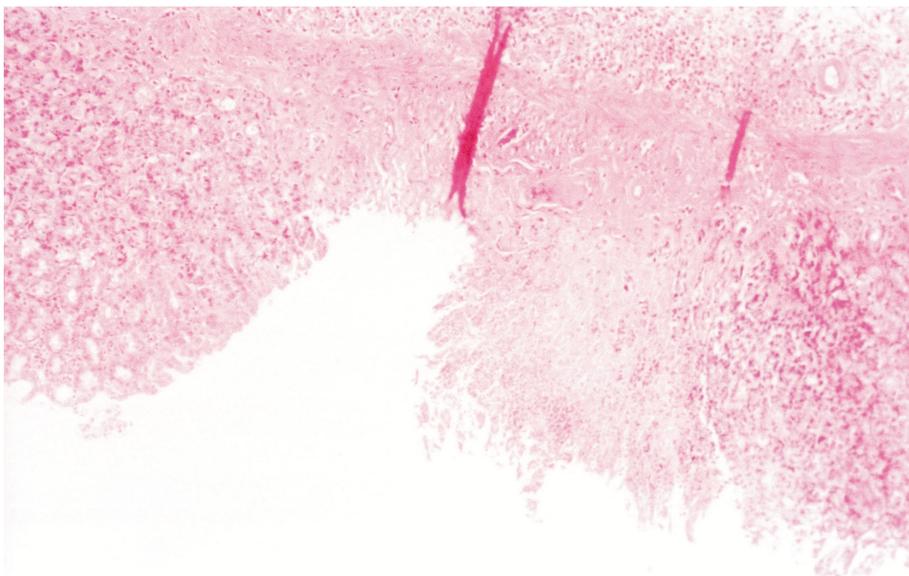


Figura 71. Análise histopatológica - Úlcera. IMss dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Nos animais submetidos à administração do fármaco em dose tóxica, além das lesões observadas no subgrupo anterior, verifica-se do mesmo modo na dose tóxica do grupo da IM forma ácida (Figura 72) a presença de hemorragias extensas, necrose da parede e infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleadas.

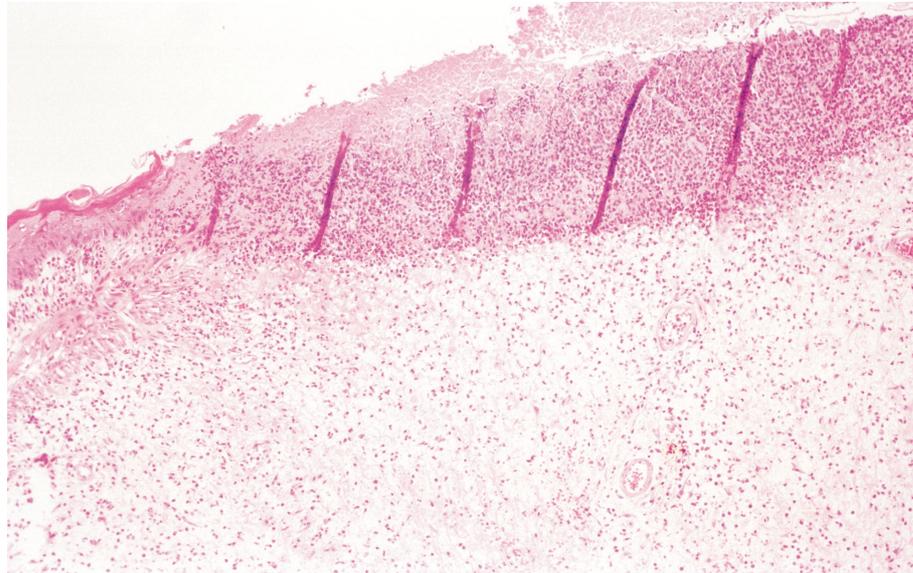


Figura 72. Análise histopatológica - Área extensa de necrose da mucosa com infiltrado inflamatório. IMss dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

A diminuição da gravidade das lesões (Tabela 26 e Figura 79) pode em parte ser atribuída ao facto da forma de sal sódico conferir maior solubilidade ao fármaco, diminuindo assim o tempo de contacto da forma cristalina sólida com a mucosa gástrica.

4.2.1.2. Indometacina complexada

A observação microscópica dos cortes da mucosa, efectuados no estômago dos animais dos dois grupos de doses administradas, não evidencia a existência de lesão gástrica (Figuras 73 e 74) na maior parte dos animais, excepto num animal submetido à administração de complexo preparado por processo de secagem por pulverização na dose terapêutica, tendo-se observado uma pequena úlcera.

Observa-se o aparecimento de ectasia vascular em dois animais aos quais foi administrado CSP dose terapêutica e num animal na dose tóxica, ambos os eventos classificados com um índice de lesão de grau 1 (congestão vascular e/ou edema).

Dos animais aos quais foi administrado CLio dose terapêutica, identificou-se a ocorrência de ligeiro edema da submucosa em cinco animais e em dois animais da dose tóxica, tendo a lesão sido classificada com um índice de gravidade de 1.

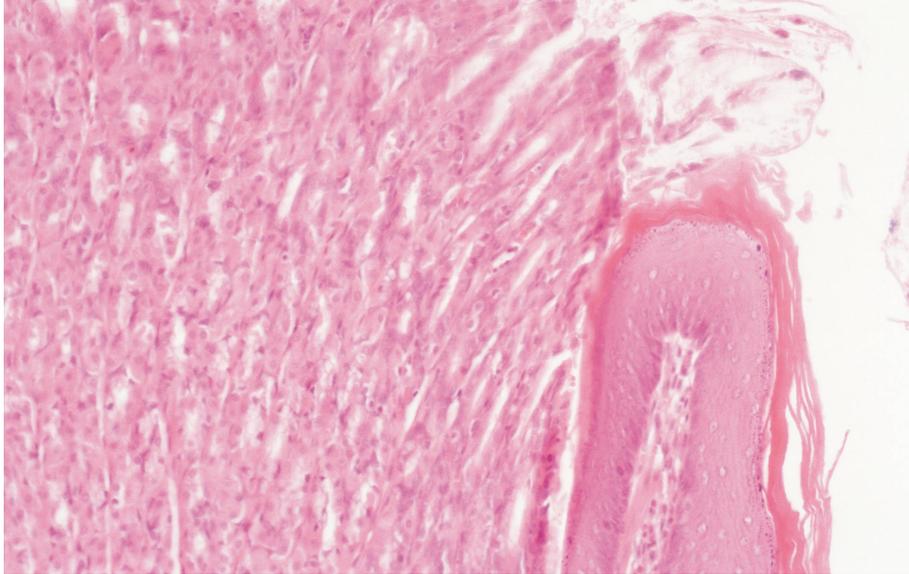


Figura 73. Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas (IM CLio). Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

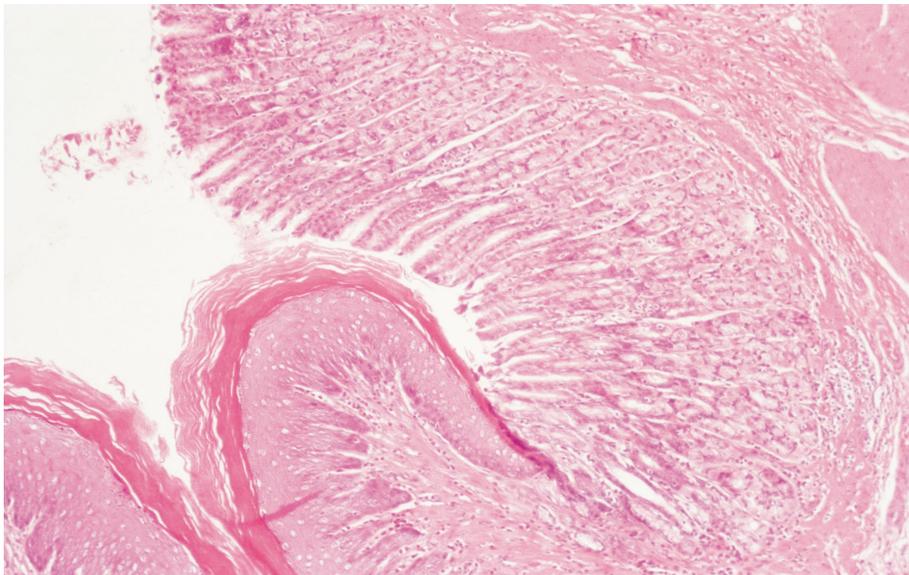


Figura 74. Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas (IM CSP). Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Este efeito pode ser atribuído ao efeito sistêmico da IM por inibição das PGs ao nível gástrico, à possível existência de IM em solução resultante do equilíbrio existente entre a IM, a CD e o complexo.

4.2.1.3. Água destilada e hidroxipropil-b-ciclodextrina

A observação microscópica dos cortes da mucosa, efectuados no estômago dos animais dos dois grupos nas doses administradas, não evidencia a existência de lesão gástrica (Figuras 75 e 76), confirmando os dados da avaliação macroscópica, de que são exemplo as Figuras 59 e 60.

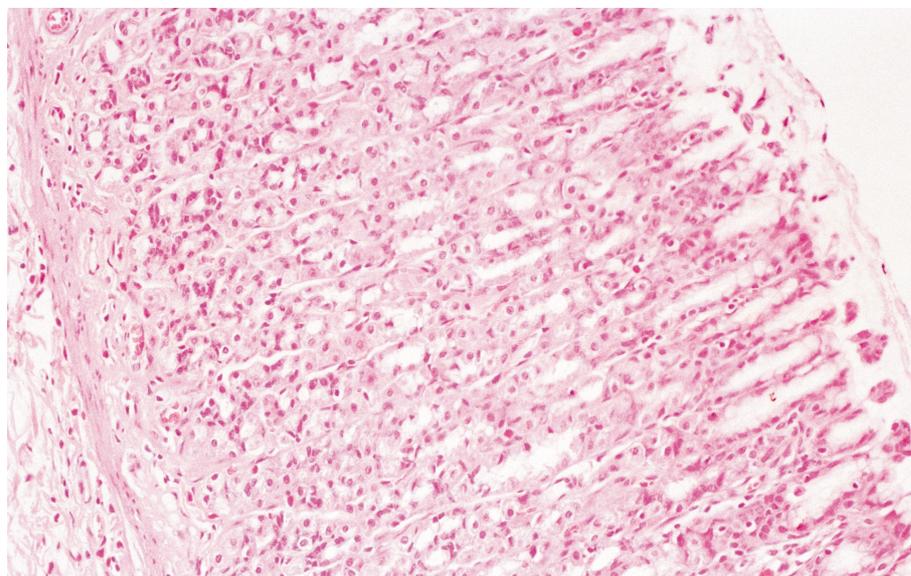


Figura 75. Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. Água destilada. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

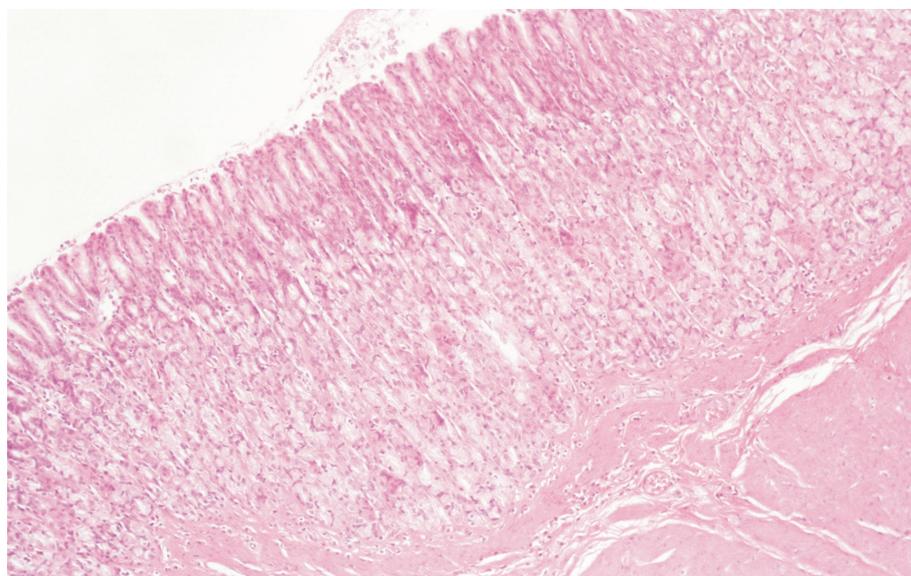


Figura 76. Análise histopatológica - Estômago com uma histologia sem alterações significativas. HP-**b**-CD. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

A ausência de lesão morfológica gástrica nos animais do grupo da HP-**b**-CD, evidencia que a sua administração por via oral, nas condições do ensaio, é segura.

4.2.2. Índice de lesão gástrica. Análise histopatológica

A Tabela 26 sistematiza a proporção de animais que evidenciam qualquer tipo de alteração morfológica para cada grupo de produtos.

Tabela 26. Proporção de animais que evidenciam alterações morfológicas do estômago no estudo histopatológico.

Produto	Dose	Evidência Alterações Morfológicas	Proporção de Animais com Alteração Morfológica
<i>IMfa</i>	DT	17/20	0,85
	DTx	10/10	1,00
<i>IMss</i>	DT	4/8	0,50
	DTx	4/7	0,57
<i>CLio</i>	DT	5/20	0,25
	DTx	2/10	0,20
<i>CSP</i>	DT	2/20	0,10
	DTx	1/10	0,10
<i>Água Destilada</i>	0,005ml/Kg	0/10	0,00
<i>HP-β-CD</i>	DTx	0/20	0,00

Nas Figuras 77 e 78 estão representados os resultados da observação microscópica do estômago, com descrição do número de animais em cada grupo, nos quais se detectou algum dos tipos de lesão e respectivo índice de lesão, na dose terapêutica e na dose tóxica.

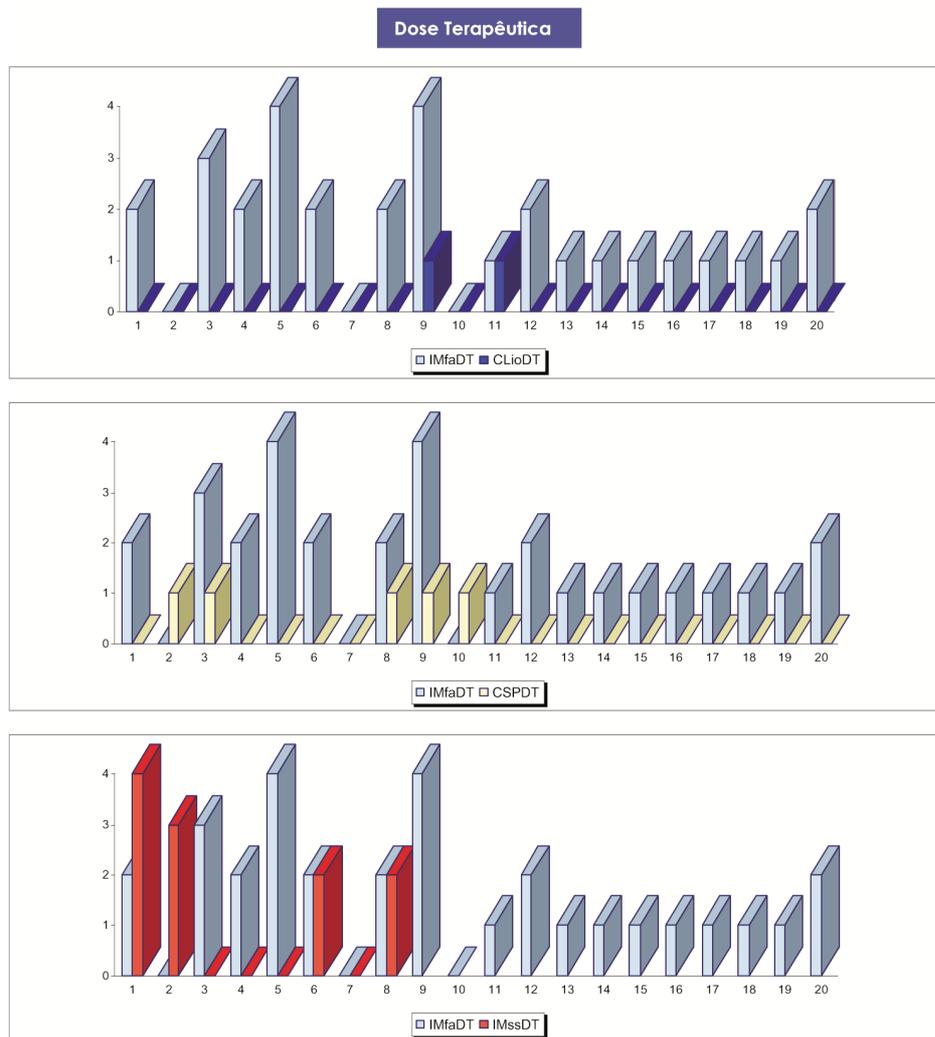


Figura 77. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível gástrico, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1 - Congestão vascular ou edema;
- 2 - Exulceração ou pequena úlcera única;
- 3 - Mais do que uma úlcera ou uma só úlcera muito extensa ou pequenas áreas de necrose ou de hemorragia;
- 4 - Necrose extensa ou grande hemorragia.

Eixo x = animais de cada grupo.

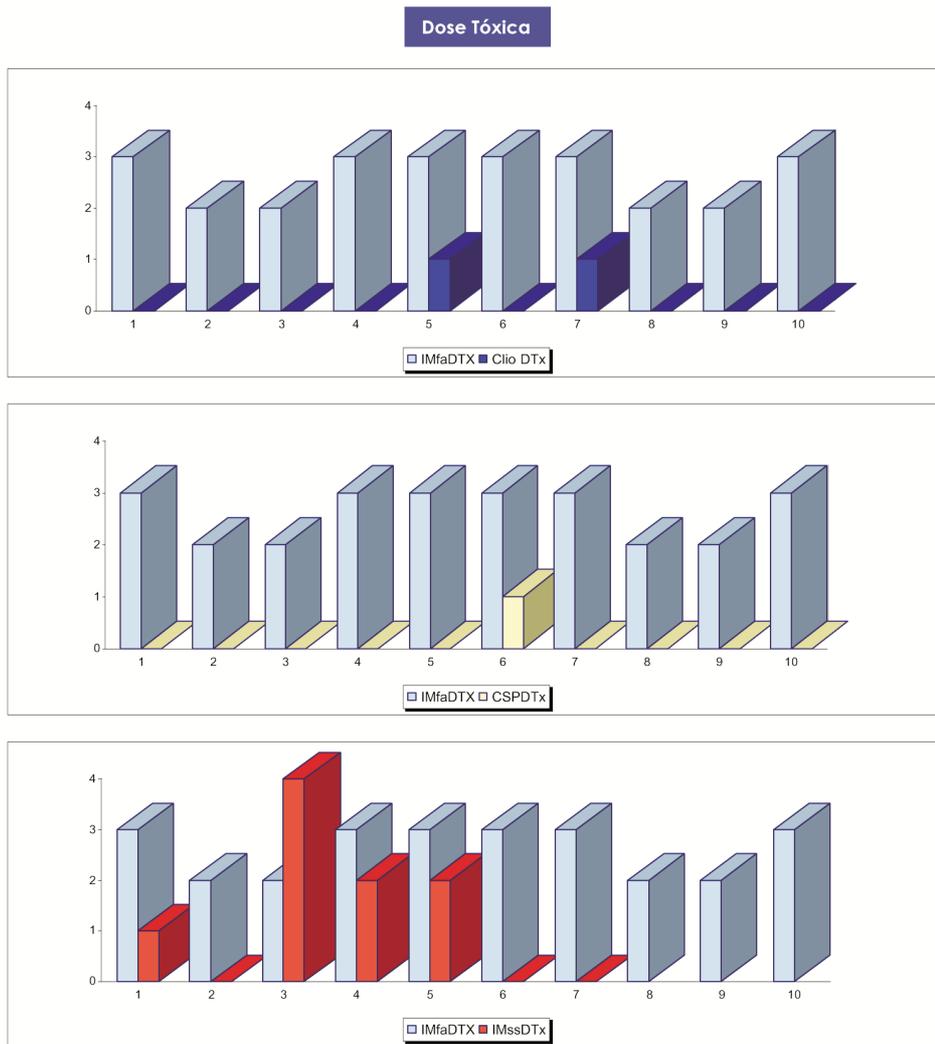


Figura 78. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível gástrico, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1 - Congestão vascular ou edema;
- 2 - Exulceração ou pequena úlcera única;
- 3 - Mais do que uma úlcera ou uma só úlcera muito extensa ou pequenas áreas de necrose ou de hemorragia;
- 4 - Necrose extensa ou grande hemorragia.

Eixo x = animais de cada grupo.

Os resultados evidenciam uma redução significativa da incidência de lesão, bem como da sua gravidade. O tipo de lesão classificado de grau 1, observado nos animais aos quais foi administrada IM sob a forma de complexos, é considerado como sendo leve e reversível.

A redução da incidência pode ser confirmada pela análise dos dados da Tabela 27 e da Figura 79.

Tabela 27. Redução de evidência de alteração morfológica, em proporção de animais, no estudo histopatológico. **GC** = Grupo controle; **GI** = Grupo intervenção; **PPAL** = Proporção de animais com lesão; **GC/GI** = Redução de animais com lesão.

Dose Utilizada	GC	PPAL	GI	PPAL	GC/GI
Terapêutica (DT)	IMfa	0,85	IMss	0,50	1,7
		0,85	CLio	0,25	3,4
		0,85	CSP	0,10	8,5
Tóxica (DTx)	IMfa	1,00	IMss	0,57	1,7
		1,00	CLio	0,20	5,0
		1,00	CSP	0,10	10,0

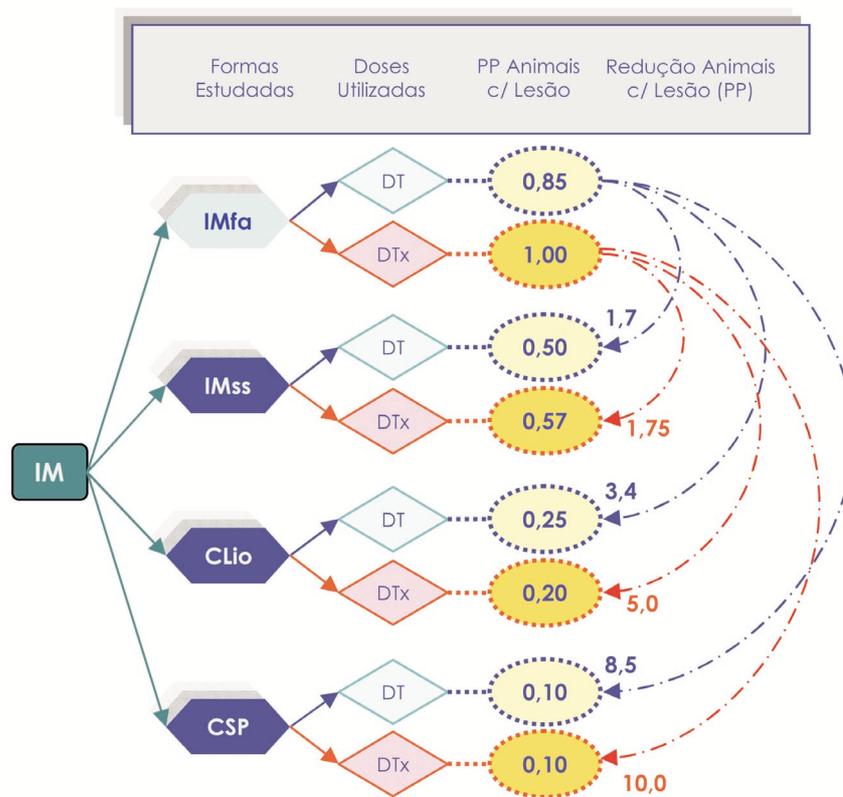


Figura 79. Análise comparativa da redução de evidência de alteração morfológica, em proporção de animais, no estudo histopatológico.

PP = proporção de animais;
DT = Dose Terapêutica;
DTx = Dose Tóxica.

A maior redução de proporção de animais com lesão observa-se no grupo do CSP, quer na dose terapêutica (8,5), quer na tóxica (10,0), seguida do grupo do CLio na dose terapêutica (3,4) e tóxica (5,0). As reduções verificadas para o grupo da IMss são menos significativas e são equivalentes (1,7) quer para a dose terapêutica, quer para dose tóxica.

4.2.3. Análise comparativa de lesão gástrica

4.2.3.1. Incidência de lesão entre produtos

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica. Comparam-se as diversas formas de complexo entre si e também face ao controlo, que é a água destilada.

O objectivo é determinar em que produtos se observa diferença de risco de lesão morfológica da mucosa gástrica. Na Tabela 28 encontram-se sistematizados os resultados da realização do teste aplicado ao estudo da incidência de lesão morfológica.

Tabela 28. Estudo histopatológico. Incidência de animais que apresentam lesão morfológica gástrica, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **P** - Presença; **A** - Ausência; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Lesão (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto (IC 95%)		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,532	10 17	0 3	1,176	0,150	-0,05	0,35
CLio DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	5 17	15 3	0,294	-0,600	-0,85	-0,35
CLio DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,001*	2 17	8 3	0,235	-0,650	-0,94	-0,36
CSP DT (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	2 17	18 3	0,118	-0,750	-0,95	-0,55
CSP DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	1 17	9 3	0,118	-0,750	-0,99	-0,51
IMss DT (PE) IMfa DT (PC)	0,142	4 17	4 3	0,588	-0,350	-0,73	-0,03
IMss DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,290	4 17	3 3	0,672	-0,279	-0,68	0,12
<i>CSP DT (PE)</i> <i>CLio DT (PE)</i>	0,407	2 5	18 15	0,400	-0,150	-0,38	0,08
<i>CLio DT (PE)</i> <i>CSP DT (PE)</i>	0,407	5 2	15 18	2,500	0,150	-0,08	0,38

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Verifica-se para todas as formas e doses de complexos uma diferença significativa em relação à IMfa DT ($p=0,000$), o que torna pouco provável que a relação observada seja devida a uma coincidência da randomização da amostra. Tendo em consideração as condições do ensaio e o número de animais estudados, a análise estatística dos resultados permite afirmar que, em relação aos animais tratados com IMfa DT, os animais tratados com CLio DT têm 29,4% de probabilidade de apresentarem lesão e que para o CSP DT a probabilidade é de 11,8%. O risco absoluto é reduzido em 75% para o CSP DT e em 60% para o CLio DT.

Relativamente à IMss em ambas as doses utilizadas, verifica-se que a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p=0,290$ para a dose terapêutica e $p=0,407$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o intervalo de confiança a 95% inclui a hipótese nula, ou seja, que os produtos têm efeito semelhante. A análise dos limites do IC (Figura 80) não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo numa amostra maior. A redução de risco absoluto observado para a IMss DT (35%) é menor do que a observada para as formas de complexo na dose terapêutica ou na dose tóxica.

Para a dose tóxica da IMfa verifica-se uma diferença não significativa ($p=0,532$).

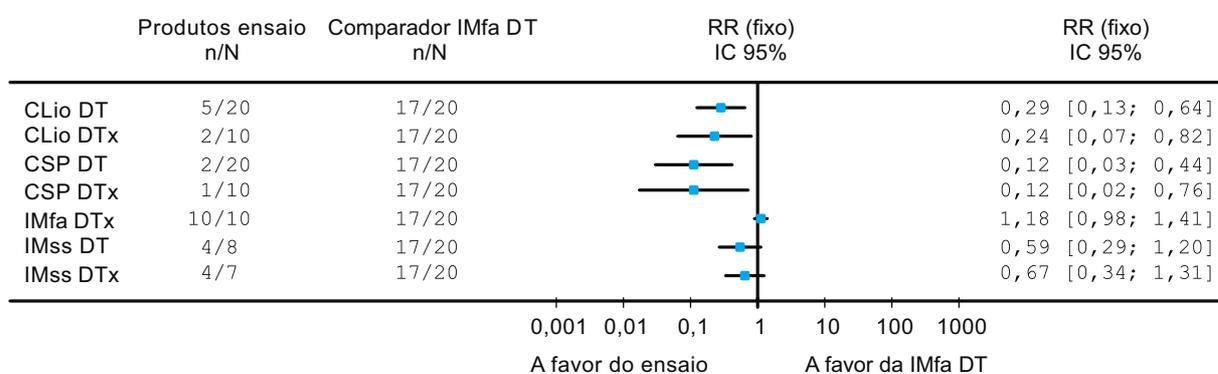


Figura 80. Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão gástrico, por análise histopatológica. Comparação entre os diferentes produtos e a IMfa DT.

A expressão gráfica do risco relativo face à IMfa DT (Figura 80) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

No que respeita à IM na forma de sal sódico, em ambas as doses utilizadas verifica-se que as linhas representativas do IC cruzam a linha vertical do efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é ligeiramente mais benéfico em relação à IMfa DT.

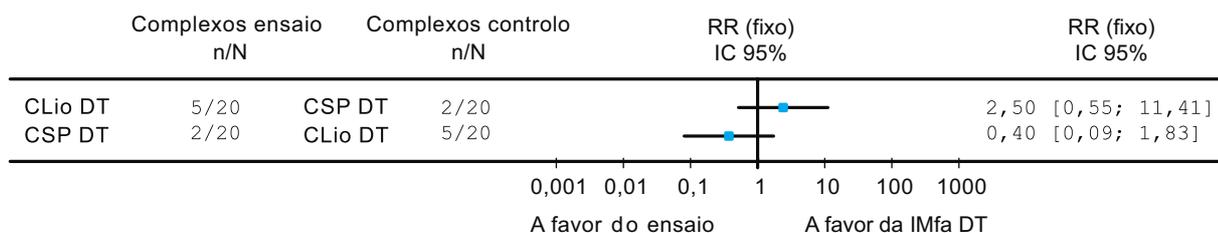


Figura 81. Representação gráfica do risco relativo para o estudo do índice de lesão gástrico, por análise histopatológica. Comparação entre complexos.

No gráfico da Figura 81 poder-se-á constatar que é o CSP DT que apresenta um efeito mais benéfico relativamente ao CLio DT.

Tabela 29. Estudo histopatológico. Estudo da incidência de animais tratados com as formas de complexo face ao controlo (água destilada), valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **P** - Presença; **A** - Ausência; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Lesão (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto IC a 95%		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
CLio DT (PE) Água (PC)	0,140	5 0	15 10	5,76 ⁽¹⁾	0,25	0,03	0,47
CLio DTx (PE) Água (PC)	0,474	2 0	8 10	5,00 ⁽¹⁾	0,20	-0,08	0,48
CSP DT (PE) Água (PC)	0,540	2 0	18 10	2,62 ⁽¹⁾	0,10	-0,09	0,29
CSP DTx (PE) Água (PC)	1,000	1 0	9 10	3,00 ⁽¹⁾	0,10	-0,14	0,34
IMfa DT (PE) Água (PC)	0,000*	17 0	3 10	18,33 ⁽¹⁾	0,85	0,65	1,05
IMfa DTx (PE) Água (PC)	0,000*	10 0	0 10	21,00 ⁽¹⁾	1,00	0,83	1,17
IMss DT (PE) Água (PC)	0,023*	4 0	4 10	11,00 ⁽¹⁾	0,50	0,15	0,85
IMss DTx (PE) Água (PC)	0,015*	4 0	3 10	12,38 ⁽¹⁾	0,57	0,21	0,94

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Verifica-se em todos os complexos um efeito de risco relativo e absoluto aumentados, não apresentando no entanto diferenças significativas (Tabela 29).

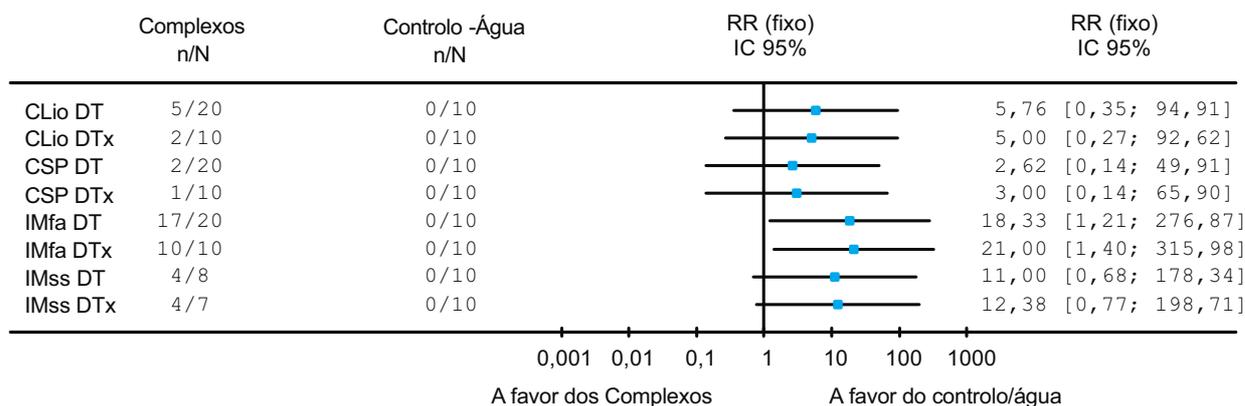


Figura 82. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da comparação do índice de lesão entre os produtos estudados e a água como controlo.

Quanto à IMss e IMfa observa-se uma diferença significativa, com risco relativo e absoluto muito superiores ao dos complexos (Tabela 29).

Observa-se na representação gráfica do risco relativo (Figura 82) que todos os produtos cruzam a linha do efeito nulo. Todavia, no caso dos complexos, os limites inferiores do IC ainda evidenciam a possibilidade de algum efeito benéfico, ou seja, existe a probabilidade com 95% de confiança, de na população existirem animais que não apresentam lesão quando lhes é administrada a forma de complexo.

4.2.3.2. Índice de lesão entre produtos

Para a dose terapêutica foi obtido um valor de $H=28,642$ e para a dose tóxica $H=24,525$, apresentando ambos uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 ($p<0,000$). A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney foram obtidos os valores de p da Tabela 30, evidenciando diferenças significativas entre as formas de complexo e a IMfa quer na dose terapêutica, quer na dose tóxica.

Tabela 30. Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão gástrica no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Terapêutica)	Imfa Imss	Imfa CSP	Imfa CLio	Imss CSP	Imss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0.618	0.000*	0.000*	0.011*	0.065	0.218
Pares de Grupos (Dose Tóxica)	Imfa Imss	Imfa CSP	Imfa CLio	Imss CSP	Imss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0.032*	0.000*	0.000*	0.029*	0.067	0.542

Tendo em consideração que o índice de lesão obtido para as formas complexadas foi o menor (1=congestão vascular e/ou edema) e considerado como transitório e não significativo clinicamente pode concluir-se que os complexos evidenciam um efeito benéfico face à IMfa quer em termos de incidência quer em termos de gravidade de lesão. Contudo, face à IMss, os dados estatísticos não são significativos, não se verificando também diferença significativa entre os complexos.

A IMfa e a IMss não apresentam diferença significativa para a dose terapêutica.

4.2.3.3. Variação percentual de peso e índice de lesão

A relação entre a variação de peso e o índice de lesão descrito na bibliografia é controversa, havendo autores cujos resultados evidenciam uma diminuição de peso com um aumento de toxicidade, não se observando diminuição nos animais aos quais foi administrado complexo de ciclodextrina (Otero-Espinar et al., 1991), enquanto que outros obtiveram um aumento de peso nos animais tratados com complexos de ciclodextrina (Lin et al., 1994). Outros ainda, imputam às ciclodextrinas um efeito de redução do aumento de peso, da deposição de gordura e dos triglicéridos séricos (Flourié et al., 1993), atribuído também ao facto da HP-**b**-CD não ser hidrolisada pelas amilases, não originando assim os metabolitos (malto-dextrinas, maltose e glucose) que poderiam ser absorvidos e promover o aumento de peso pelo seu valor nutritivo (Antenucci e Palmer, 1984).

Com o objectivo de testar se a variação percentual de peso poderá ser uma função do índice de lesão observado nos animais, estes foram reagrupados em função do índice de lesão e efectuados testes não paramétricos de comparação e de correlação.

A correlação efectuada por aplicação do teste de Spearman, revela a existência de associação negativa fraca ($r=-0,282$; $p=0,001$) entre o índice de lesão e a variação percentual de peso, ou seja, a variação é inversamente proporcional, não se observando uma relação de linearidade, como se pode verificar na análise do diagrama de dispersão da Figura 83.

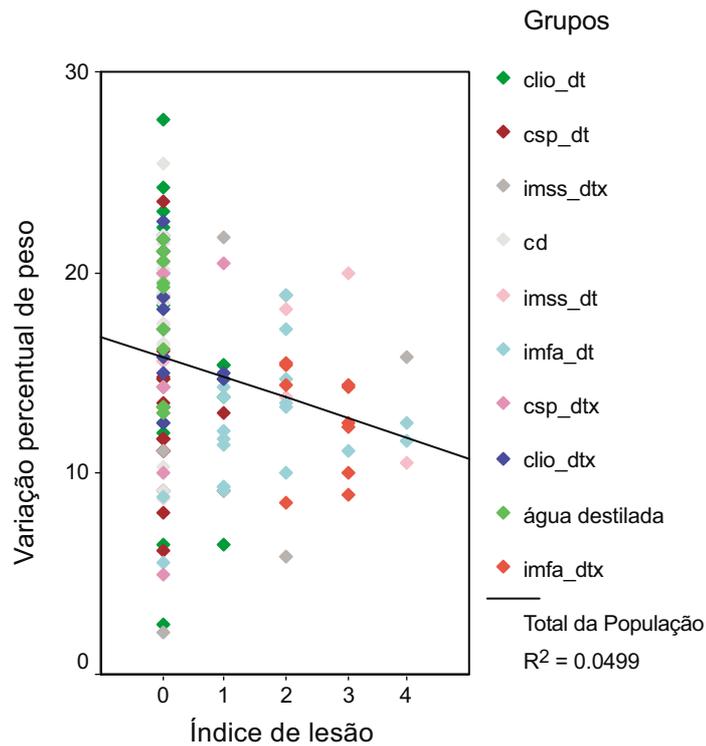


Figura 83. Diagrama de dispersão da correlação entre a variação percentual de peso e o índice de lesão morfológico do estômago.

Na análise da dispersão dos dados verifica-se que a maior parte dos animais se distribui na zona do índice de lesão zero, apresentando uma variação percentual de peso que se estende do mínimo ao máximo valor observado e que, nos índices que representam maior gravidade de lesão, a variação percentual de peso oscila dentro de valores médios. Pela análise da linha de regressão linear, pode afirmar-se que, considerando as variáveis em causa, cerca de 5% ($R^2 \times 100$) da variação percentual de peso é explicada através do índice de lesão, sendo os restantes explicados por outros factores.

A comparação da variação percentual de peso entre os grupos dos animais com os diferentes índices de lesão, foi efectuada através do teste de Kruskal-Wallis. Uma vez que este tipo de análise não permite a utilização de amostras com número inferior a 7, os animais do grupo do índice de lesão 3 e 4 foram fundidos. A aplicação do teste à globalidade dos animais, revela a existência de uma diferença significativa ($p=0,008$) entre os grupos.

Para determinar entre que pares de grupos a diferença é significativa, efectuaram-se combinações múltiplas e aplicou-se a cada par o teste de Mann-Whitney. Na Tabela 31 assinalam-se as diferenças entre os grupos.

Tabela 31. Valor de significância da comparação da variação percentual de peso entre os diferentes índices de lesão morfológica do estômago.

Pares de Grupos		Valor da Significância (p)
IL 0	IL 1	0,015*
	IL 2	0,125
	IL3	0,013*
IL 1	IL 2	0,325
	IL 3	0,670
IL 2	IL 3	0,198

* Considera-se significativo para um valor de $p<0,05$

A diferença significativa verifica-se entre os animais com IL 0 e IL 1 e entre o IL 0 e IL 3. Deste modo, e considerando o resultado dos testes de correlação e de comparação, poder-se-á afirmar que, nas condições do ensaio e para as variáveis em causa, não é a gravidade da lesão que condiciona a variação de peso.

Pode assim concluir-se quanto à variação de peso, que esta deverá ser atribuída a outras causas externas a este estudo, não se podendo corroborar nenhum dos dados dos estudos dos outros autores anteriormente referidos.

4.2.3.4. Índice de lesão e dose administrada

Com o objectivo de avaliar a influência da dose no índice de lesão foi aplicado o teste U de Mann-Whitney, aos animais reagrupados por dose.

Verifica-se uma diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,021$) para $p<0,05$. Pode assim concluir-se que a dose tem influência no índice de lesão.

4.2.3.5. Índice de lesão macroscópico e histopatológico

Foi utilizado o teste de Cochran para averiguar a concordância entre métodos que avaliam a incidência de lesão no mesmo animal de modos diferentes, neste caso, através de observação macroscópica e análise histopatológica.

Assim, a utilização da comparação entre estes dois métodos, que avaliam efeitos semelhantes nos elementos que compõem a amostra, permite comprovar a fiabilidade da observação macroscópica através de um método de maior acuidade.

Na Tabela 32, estão sistematizados os resultados da aplicação do teste de Cochran.

Tabela 32. Resultados do Teste de Cochran de concordância do índice de lesão gástrica, entre os métodos de observação macroscópica e de análise histopatológica.

Produto	Valor significância (p)
<i>IMfa DT</i>	1,000
<i>IMfa DTx</i>	0,157
<i>IMss DT</i>	0,157
<i>IMss DTx</i>	0,564
<i>CLio DT</i>	1,000
<i>CLio DTx</i>	1,000
<i>CSP DT</i>	0,317
<i>CSP DTx</i>	1,000

Não se verificam diferenças significativas para um teste com nível de significância de 0,05, podendo assim concluir-se que existe concordância entre os testes efectuados. Este resultado indica que o grau de lesão identificado através do estudo histopatológico corrobora a análise efectuada macroscopicamente.

5. MUCO GÁSTRICO

5.1. Estudo citológico

Os resultados dos vários tipos de estudos efectuados no muco gástrico encontram-se coligidos na Tabela 33. Apresentam-se os resultados da observação microscópica da presença de eritrócitos e leucócitos, em termos de número de animais nos quais foi identificada a presença/n.º total de animais do grupo, bem como o resultado da avaliação por aplicação da escala de identificação previamente definida.

Tabela 33. Resultados do estudo efectuado no muco gástrico. **P** = Presença; **NMC** = índice de lesão citológica máximo observado, com base no n.º de células observado por campo, de acordo com a escala de classificação.

Produto	Dose	Observação Macroscópica Cor e Cheiro	Observação Microscópica			
			Estudo Citológico			
			Eritrócitos (E)		Leucócitos (L)	
			P	NMC	P	NMC
IMfa	DT	0/20	13/20	4	13/20	4
	DTx	1/10	7/10	4	6/10	4
IMss	DT	1/8	3/8	2	5/8	3
	DTx	1/7	4/7	3	2/7	3
CLio	DT	0/20	0/20	0	0/20	0
	DTx	0/10	0/10	0	0/10	0
CSP	DT	0/20	2/20	1	0/20	1
	DTx	0/10	0/10	0	0/10	0
Água Destilada	0,005ml/kg	0/10	0/10	0	0/10	0
HP-β-CD	DTx	0/20	0/20	0	0/20	0

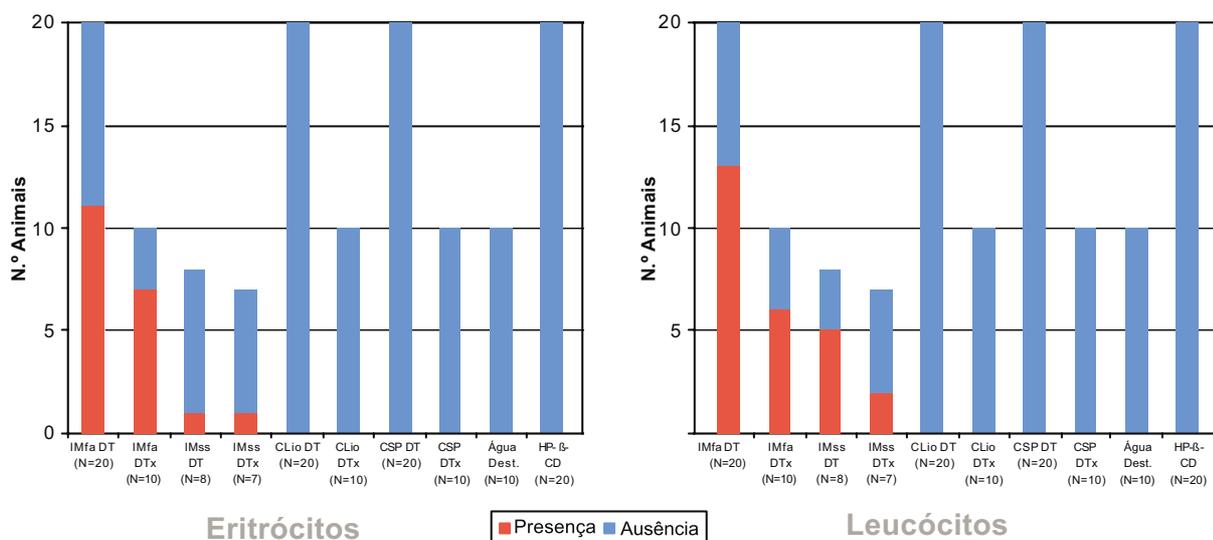


Figura 84. Distribuição de frequências de presença e ausência de eritrócitos e de leucócitos.

5.1.1. Indometacina não complexada

Nos animais deste grupo, independentemente da dose administrada, observou-se a presença de:

- ❖ eritrócitos e leucócitos, sendo estes neutrófilos polinucleares;
- ❖ eosinófilos;
- ❖ lise celular, resíduos celulares e células intactas de descamação;
- ❖ partes filamentosas de muco.

A presença de eritrócitos e leucócitos confirma as observações macroscópicas de ocorrência de hemorragia e destruição celular. Os leucócitos encontrados são neutrófilos polinucleares, reveladores de acção inflamatória, confirmando os resultados da observação macroscópica. De acordo com os dados patentes na Tabela 15, é o grupo da IMfa, na dose tóxica, que apresenta maior número de animais com as alterações descritas (7/10 com presença de eritrócitos e 6/10 com presença de leucócitos), seguida da IMfa dose terapêutica (11/20 com presença de eritrócitos e 13/20 com presença de leucócitos).

A presença de eosinófilos indicia a ocorrência de hemorragias, que confirmam a observação de alteração de cor e cheiro, detectada em animais aos quais foi administrada IMfa dose tóxica, IMss dose terapêutica e dose tóxica.

Estes resultados estão em consonância com os dados publicados, que evidenciam que a IM tem capacidade para alterar a função dos leucócitos polimorfonucleares, por inibição da motilidade e da actividade quimiotáctica nos exsudatos inflamatórios, e para interferir com a agregação plaquetária alterando a hemostase (Biscarini, 2000a; Fowlie, 1996; Kamran et al., 1993).

A lise celular e a presença de resíduos celulares e células intactas, observadas no muco gástrico, são indicadores da destruição celular, decorrente da lesão da mucosa por formação de ulcerações e exulcerações. Estes dados foram identificados nos animais aos quais foi administrada IMfa e IMss, quer na dose terapêutica quer na dose tóxica.

A presença de filamentos de muco, no estudo citológico efectuado nos animais do grupo da IM, poderá ser atribuída, de acordo com a bibliografia (Somasundaram et al., 1997), ao mecanismo de toxicidade da indometacina, o qual pode conduzir a uma inibição

da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e inibição ou diminuição da produção de muco e alterações da sua composição.

Em alguns dos animais do grupo da dose tóxica da IMfa e nos dois grupos da IMss, registou-se a presença de muco com cheiro fétido.

5.1.2. Indometacina complexada

Os estudos efectuados nos animais deste grupo não evidenciaram a presença de nenhuma das alterações mencionadas no grupo da IM não complexada, com excepção de dois animais do grupo do complexo obtido através de secagem por pulverização, administrado na dose terapêutica, que revelaram a presença de eritrócitos.

Este resultado, confirmado no estudo histopatológico, poderá ser atribuído à indometacina ou a lesão do intestino delgado no jejum, aparecendo os eritrócitos no muco gástrico, por mecanismo de refluxo.

5.1.3. Água destilada e hidroxipropil- β -ciclodextrina

Em nenhum dos animais destes grupos foi observada evidência de lesão de acordo com os métodos usados no estudo citológico. A água destilada foi utilizada como controlo negativo de evidência de lesão do grupo da IM não complexada e a HP- β -CD como controlo da ausência de lesão por parte das ciclodextrinas, ficando, assim, de acordo com as condições do ensaio, comprovada a segurança da sua utilização por via oral.

5.2. Análise comparativa de alteração celular no muco gástrico

5.2.1. Presença de eritrócitos entre produtos. Incidência e índice de lesão

Incidência de lesão

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa diferença de risco de lesão que evidencie a ocorrência de hemorragia. Na Tabela 34 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste aplicado ao estudo da presença de eritrócitos no muco gástrico.

Tabela 34. Incidência de animais que apresentam presença de eritrócitos no muco gástrico, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **A** - Ausência; **P** - Presença; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Eritrócitos (n)		RR	Risco Absoluto IC a 95%		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE)	1,000	7	3	1,077	-0,05	-0,34	0,24
IMfa DT (PC)		13	7				
CLio DT (PE)	0,000*	0	20	0,037 ⁽¹⁾	-0,60	-0,85	-0,35
IMfa DT (PC)		13	7				
CLio DTx (PE)	0,001*	0	10	0,071 ⁽¹⁾	-0,65	-0,94	-0,36
IMfa DT (PC)		13	7				
CSP DT (PE)	0,001*	2	18	0,154	-0,70	-0,92	-0,48
IMfa DT (PC)		13	7				
CSP DTx (PE)	0,001*	0	10	0,071 ⁽¹⁾	-0,75	-0,99	-0,51
IMfa DT (PC)		13	7				
IMss DT (PE)	0,231	3	5	0,577	-0,10	-0,44	0,24
IMfa DT (PC)		13	7				
IMss DTx (PE)	1,000	4	3	0,879	-0,14	-0,51	0,23
IMfa DT (PC)		13	7				

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Em relação aos complexos verifica-se sempre uma diferença significativa, apresentando uma probabilidade muito baixa de risco relativo, face à IMfa DT, 3,7% para o CLio DT e 15,4% para o CSP DT. Existe assim evidência do CSP poder provocar hemorragia em relação ao CLio, sendo todavia o grau de lesão considerado leve e transitório.

No respeitante à IMss em ambas as doses utilizadas, verifica-se que a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p = 0,231$ para a dose terapêutica e $p = 1,000$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o intervalo de confiança a 95% inclui a hipótese nula.

A análise dos limites do IC (Figura 85) não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo num maior número de animais.

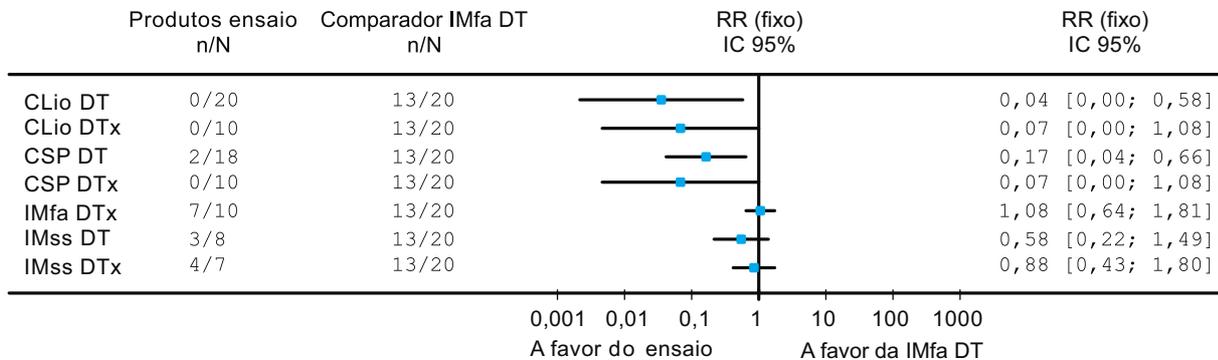


Figura 85. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de eritrócitos no muco gástrico.

A expressão gráfica do risco relativo permite também constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo na dose terapêutica cruza a linha vertical que marca o efeito nulo (RR=1), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

Índice de lesão

Para a dose terapêutica foi obtido um valor de H=25,864 e para a dose tóxica H=17,652, indicando ambos uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 (p=0,000). A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney foram obtidos os valores de p da Tabela 35, evidenciando diferenças significativas entre as formas de complexo e a IMfa, quer na dose terapêutica, quer na dose tóxica.

A IMfa e a IMss não apresentam diferença significativa para a dose terapêutica, nem para a dose tóxica.

Tabela 35. Análise comparativa, entre pares de produtos, da presença de eritrócitos no muco gástrico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Terapêutica)	IMfa Imss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0,237	0,000*	0,000*	0,067	0,004*	0,152
Pares de Grupos (Dose Tóxica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0,644	0,002*	0,002*	0,009*	0,009*	1,000

Face à IMss verifica-se uma diferença não significativa para o CSP DT e diferenças significativas para o CSP DTx e para ambas as doses do CLio. Estes resultados mostram um efeito benéfico em termos de diminuição da gravidade de hemorragia, uma vez que o número de eritrócitos, quando presentes, é reduzido.

Quando se comparam as duas formas de complexos não se encontram diferenças significativas.

5.2.2. Pesquisa da ocorrência de hemorragia

Foi utilizado o teste de Cochran para averiguar a concordância entre métodos que avaliam a possibilidade de ocorrência de hemorragia no mesmo animal de modos diferentes, neste caso, através de observação da alteração do aspecto das fezes, da existência de sangue na mucosa e da presença de eritrócitos no estudo citológico.

Na Tabela 36, estão sistematizados os resultados da aplicação do teste de Cochran.

Tabela 36. Resultados do Teste de Cochran aplicado à concordância entre a alteração do aspecto das fezes, presença de sangue na mucosa e de eritrócitos no estudo citológico.

Produto	Valor significância (p)
<i>IMfa DT</i>	0,050
<i>IMfa DTx</i>	0,717
<i>IMss DT</i>	0,368
<i>IMss DTx</i>	1,000
<i>CLio DT</i>	0,007*
<i>CLio DTx</i>	0,135
<i>CSP DT</i>	0,097
<i>CSP DTx</i>	0,368

Através da análise dos dados pode concluir-se que existe concordância entre os testes para todos os grupos de produtos, com excepção do CLio DT, sendo somente detectável através do estudo citológico a evidência de presença de eritrócitos indicadores de possível hemorragia, sendo no entanto classificado com o grau mais baixo de lesão.

5.2.3. Presença de leucócitos. Incidência e índice de lesão

Incidência de lesão

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica.

O objectivo é determinar em que produtos se observa uma diferença de risco de lesão que evidencie a ocorrência de processo inflamatório. Na Tabela 37 encontram-se sistematizados os resultados da realização do teste aplicado ao estudo da presença de leucócitos no muco gástrico.

212

Tabela 37. Incidência de animais que apresentam presença de leucócitos no muco gástrico, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **A** - Ausência; **P** - Presença; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Leucócitos (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto IC a 95%		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT(PC)	1,000	6 13	4 7	0,923	-0,05	-0,42	0,32
CLio DT (PE) IMfa DT(PC)	0,000*	0 13	20 7	0,037 ⁽¹⁾	-0,65	-0,87	-0,43
CLio DTx (PE) IMfa DT(PC)	0,001*	0 13	10 7	0,071 ⁽¹⁾	-0,65	-0,89	-0,41
CSP DT (PE) IMfa DT(PC)	0,000*	0 13	20 7	0,037 ⁽¹⁾	-0,65	-0,87	-0,43
CSP DTx (PE) IMfa DT(PC)	0,001*	0 13	10 7	0,071 ⁽¹⁾	-0,65	-0,89	-0,41
IMss DT (PE) IMfa DT(PC)	1,000	5 13	3 7	0,962	-0,03	-0,42	0,37
IMss DTx (PE) IMfa DT(PC)	0,185	2 13	5 7	0,440	-0,36	-0,76	0,03

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Em relação aos complexos verifica-se sempre uma diferença significativa, apresentando no entanto uma probabilidade muito baixa de risco relativo, face à IMfa DT, 3,7% para ambos os complexos na dose terapêutica. Existe assim evidência de efeito benéfico.

Verifica-se que para a IMss em ambas as doses utilizadas, a diferença não é significativa em relação ao comparador, $p=1,000$ para a dose terapêutica e $p=0,185$ para a dose tóxica. Os dados não nos permitem concluir que o verdadeiro risco relativo seja diferente de 1, podendo no entanto ser afirmado que o intervalo de confiança a 95% inclui a hipótese nula. A análise dos limites do IC não permite chegar a uma conclusão definitiva acerca do possível benefício da utilização da IMss face à IMfa, sendo necessário efectuar o estudo num maior número de animais.

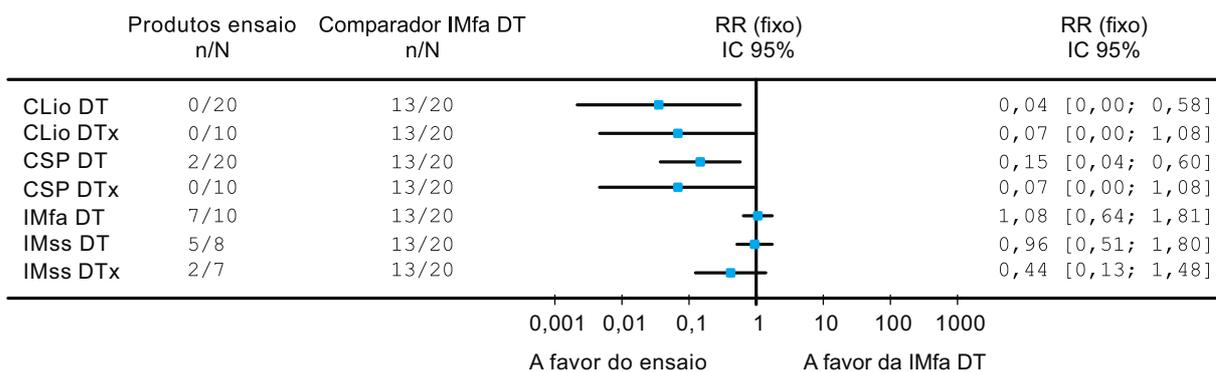


Figura 86. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da presença de leucócitos no muco gástrico.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 86) permite constatar que nenhuma das linhas representativas do IC nas várias formas de complexo na dose terapêutica cruza a linha vertical que marca o efeito nulo ($RR=1$), apresentando assim um efeito benéfico do tratamento em relação ao comparador.

Índice de Lesão

Para a dose terapêutica foi obtido um valor de $H=33,655$ e para a dose tóxica $H=13,066$, apresentando ambos uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 ($p=0,000$). A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney foram obtidos os valores de p da Tabela 38, evidenciando diferenças significativas entre as formas de complexo e a IMfa quer na dose terapêutica, quer na dose tóxica. A IMfa e a IMss não apresentam diferença significativa em ambas as doses.

Tabela 38. Análise comparativa, entre pares de produtos, da presença de leucócitos no muco gástrico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Terapêutica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0,936	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	1,000
Pares de Grupos (Dose Tóxica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
Nível de significância (p)	0,458	0,005*	0,005*	0,081	0,081	1,000

Verifica-se que para a dose terapêutica existem diferenças significativas entre os complexos e a IMss, não se verificando essa diferença entre os complexos.

5.2.4. Pesquisa de sinais de inflamação

Foi utilizado o teste de Cochran para averiguar a concordância entre métodos que avaliam a existência de sinais de inflamação no mesmo animal de modos diferentes, neste caso, através de observação da alteração do aspecto da mucosa gástrica, e presença de leucócitos no estudo citológico.

Na Tabela 39, estão sistematizados os resultados da aplicação do teste de Cochran.

Tabela 39. Resultados do Teste de Cochran aplicado à concordância entre a alteração do aspecto da mucosa e da presença de leucócitos no estudo citológico.

Produto	Valor significância (p)
IMfa DT	0,083
IMfa DTx	0,317
IMss DT	1,000
IMss DTx	0,157
CLio DT	0,025*
CLio DTx	0,157
CSP DT	0,083
CSP DTx	0,317

Através da análise dos dados pode concluir-se que existe concordância entre os testes para todos os grupos de produtos, com exceção do CLio DT, sendo somente detectável através do estudo citológico a evidência de presença de leucócitos indicadores de possível inflamação da mucosa, sendo no entanto classificado com o grau mais baixo de lesão.

6. ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS EFECTUADOS NO RIM E NO FÍGADO

6.1. Estudo histopatológico do rim

6.1.1. Alterações morfológicas

Todos os animais aos quais foi administrada IM, quer sob a forma não complexada, quer complexada, apresentam evidência um ou vários tipos de alterações morfológicas. A vacuolização dos túbulos (Figuras 87 e 88) é um desses tipos de alterações observada.

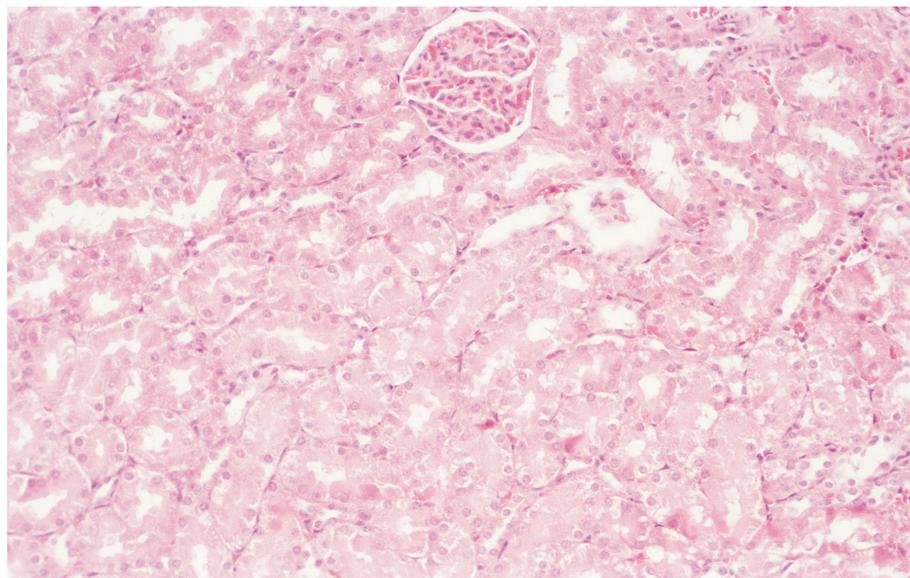


Figura 87. Análise histopatológica - Vacuolização dos túbulos no rim de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

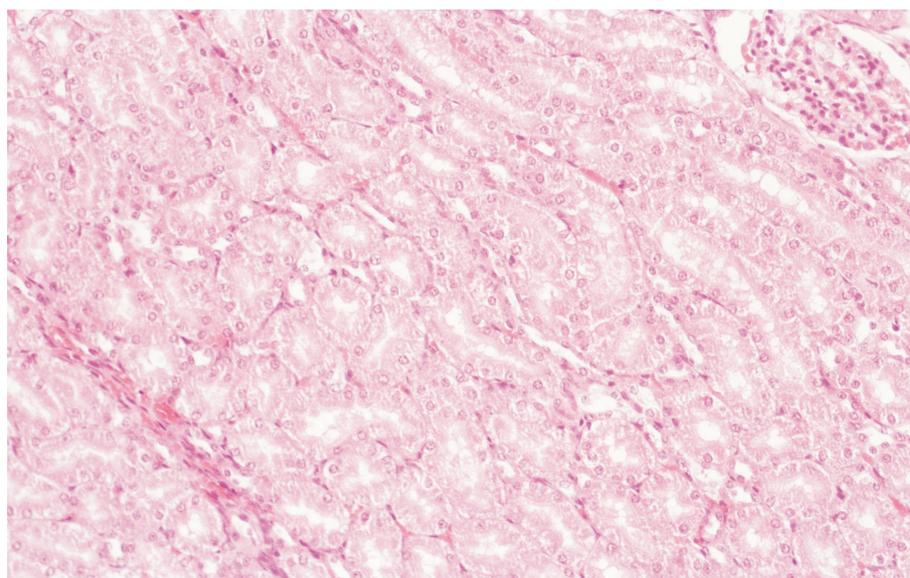


Figura 88. Análise histopatológica - Vacuolização dos túbulos no rim de um animal ao qual foi administrada IMfa, na dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Apresentam também uma retração do tufo glomerular e pequenos focos de estase (Figura 89), comparativamente com o grupo controle.

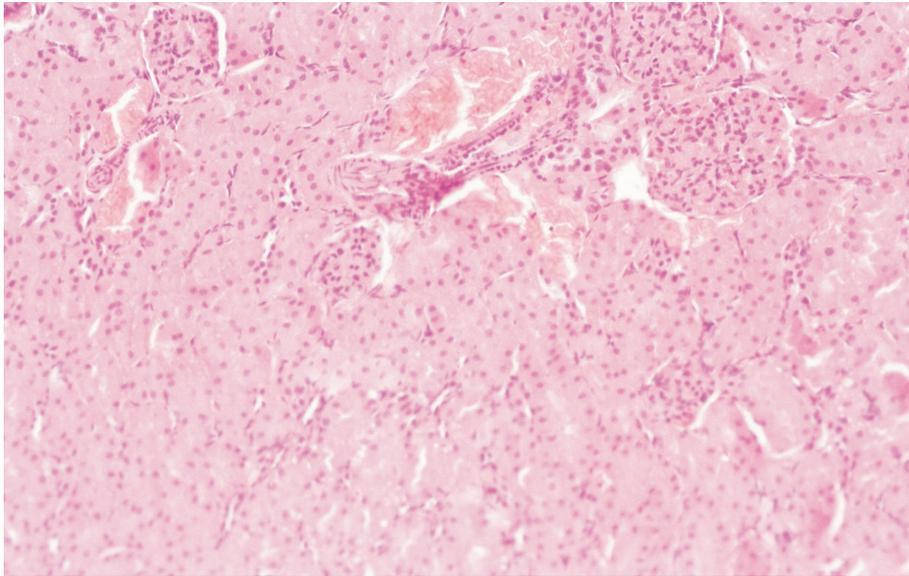


Figura 89. Análise histopatológica - Estase observada no rim de um dos animais ao qual foi administrada IM complexada por processo de liofilização. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Os animais dos grupos aos quais foi administrada água destilada e HP- β -CD (Figura 90) não apresentam evidência de lesão.

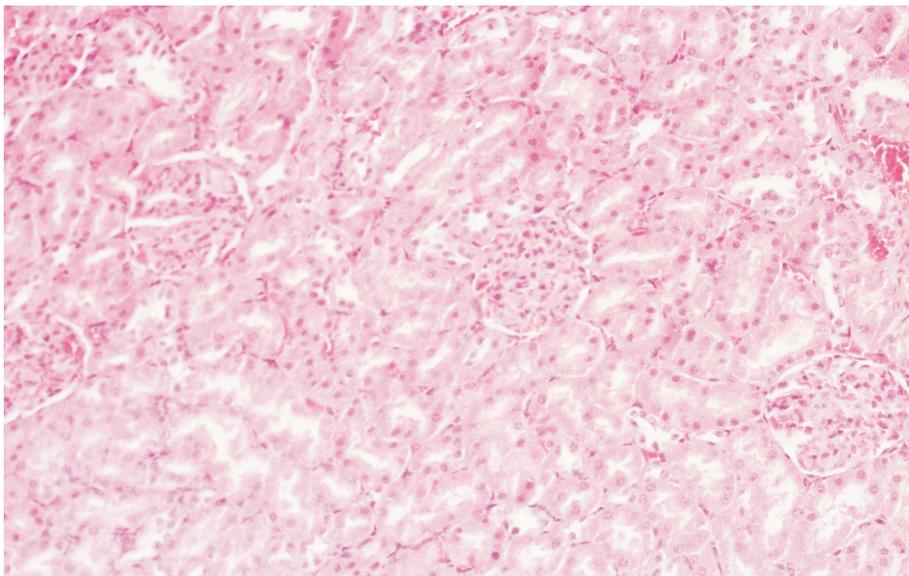


Figura 90. Análise histopatológica - Rim sem evidência de alteração morfológica. HP- β -CD. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

6.1.2. Índice de lesão renal.

Na Tabela 40 e nas Figuras 91 e 92, pode avaliar-se a incidência e o grau de gravidade das lesões renais, na dose terapêutica e na dose tóxica.

Tabela 40. Síntese dos resultados do estudo histopatológico e do índice de lesão renal (ILRm).

Am = n.º de animais com alteração morfológica;

At = n.º total de animais;

PR = Proporção entre Am e At (**Am/At**);

PR(IL M) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão máximo (**AIL M**) e o n.º total de animais (**AIL M/At**);

PR(IL m) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão mínimo (**AIL m**) e o n.º total de animais (**AIL m/At**).

Produto	Dose	Estudo Histológico				
		Alterações Morfológicas ao nível Renal				
		Presença (Am/At = PR)	IL M (PR = AIL M/At)	IL m (PR = AIL m/At)		
<i>IMfa</i>	DT	6/20 (0,30)	1	6/20 (0,30)	—	—
	DTx	10/10 (1,00)	3	4/10 (0,40)	2	6/10 (0,60)
<i>IMss</i>	DT	7/8 (0,67)	1	7/8 (0,875)	—	—
	DTx	7/7 (1,00)	1	7/7 (1,00)	—	—
<i>CLio</i>	DT	9/20 (0,45)	1	9/20 (0,45)	—	—
	DTx	10/10 (1,00)	3	2/10 (0,20)	2	8/10 (0,80)
<i>CSP</i>	DT	7/20 (0,35)	1	7/20 (0,35)	—	—
	DTx	10/10 (1,00)	3	5/10 (0,50)	2	5/10 (0,50)
<i>Água Destilada</i>	0,005ml/Kg	0/10 (0,00)	—	—	—	—
<i>HP-β-CD</i>	DTx	0/20 (0,00)	—	—	—	—

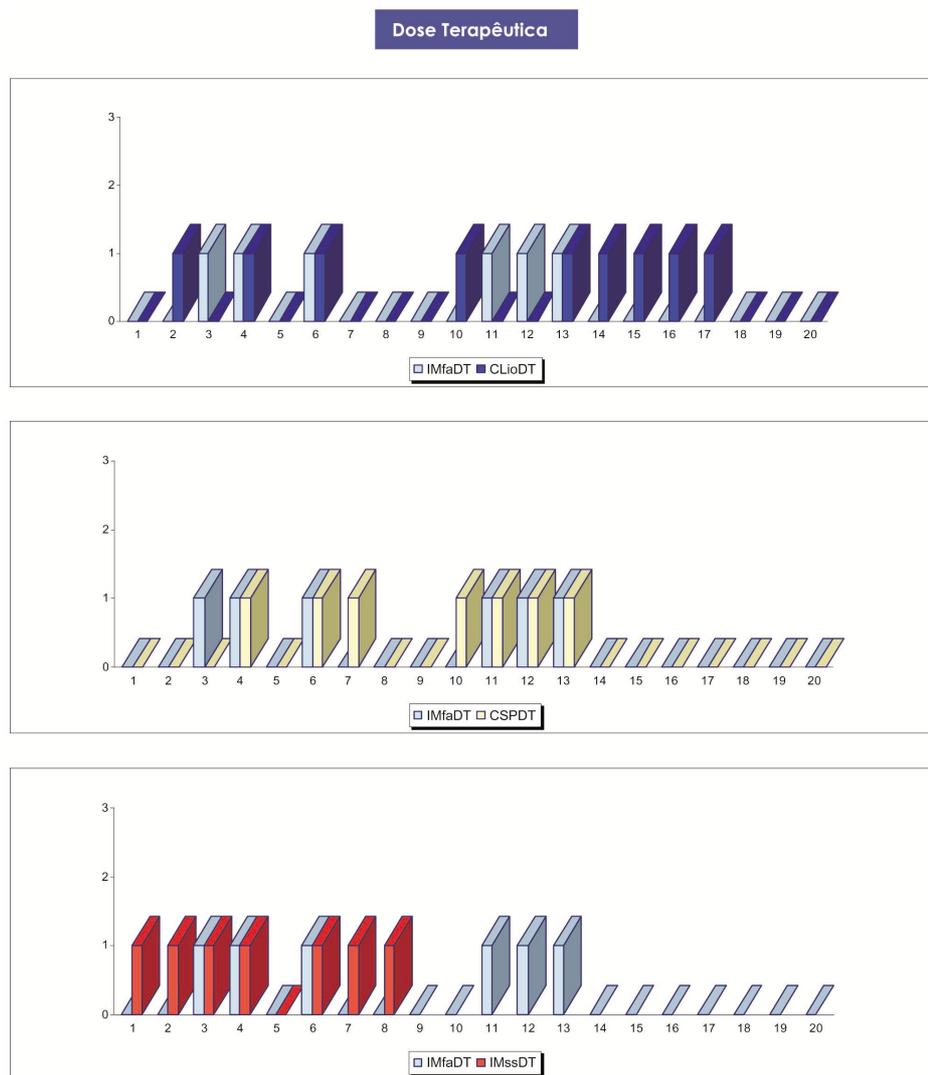


Figura 91. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível renal, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1 - Unicamente lesões tubulares ou circulatórias;
- 2 - Lesões glomerulares atingindo poucos glomérulos;
- 3 - Destruição de glomérulos ou lesões que atingem muitos glomérulos.

Eixo x = animais de cada grupo.

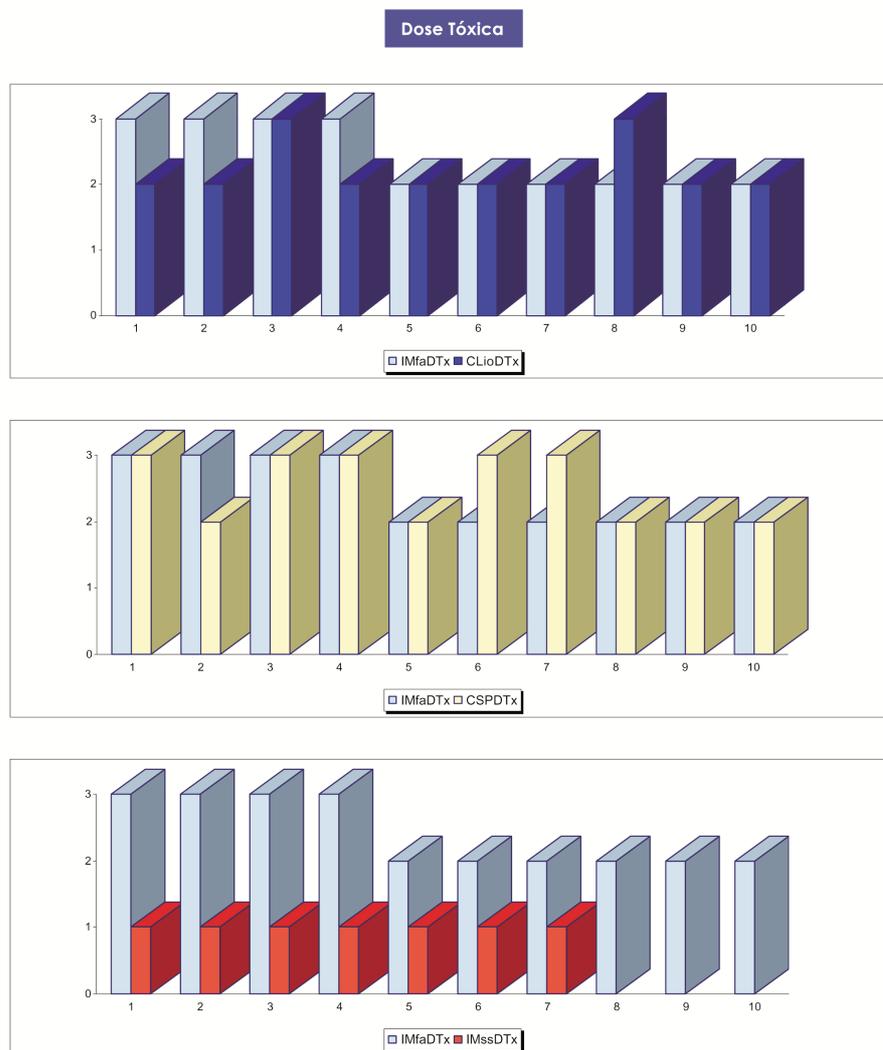


Figura 92. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível renal, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1** - Unicamente lesões tubulares ou circulatórias;
- 2** - Lesões glomerulares atingindo poucos glomérulos;
- 3** - Destruição de glomérulos ou lesões que atingem muitos glomérulos.

Eixo x = animais de cada grupo.

A gravidade e a incidência das lesões, quando se comparam os resultados da IMfa com a IM complexada por qualquer um dos métodos de preparação, são semelhantes, quer para a dose terapêutica, quer para a tóxica.

O aparecimento destas lesões nos animais aos quais foi administrada IM complexada, pode ser atribuído ao facto da IM ter sido absorvida, uma vez que estes efeitos estão descritos na bibliografia como sendo característicos do fármaco quando administrado por via intravenosa.

6.1.3. Análise comparativa de lesão renal

6.1.3.1. Incidência de lesão

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica. Efectua-se também a comparação das diversas formas de complexo entre si, na dose terapêutica.

O objectivo é determinar se existe uma incidência de lesão comparável entre as diversas formas de IM, para doses equivalentes.

Se existir conformidade nos dados observados poder-se-á vir a concluir, a partir da análise conjunta com o índice de lesão, se a IM sob a forma de complexos é ou não absorvida.

Na Tabela 41 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste ao estudo da lesão renal.

Tabela 41. Incidência de animais que apresentam lesão renal, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **P** - Presença; **A** - Ausência; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Lesão (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto IC a 95%		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	10 6	0 14	3,333 ⁽¹⁾	0,700	0,47	0,93
CLio DT (PE) IMfa DT (PC)	0,514	9 6	11 14	1,500	0,150	-0,15	0,45
CLio DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	10 6	0 14	3,333 ⁽¹⁾	0,700	0,47	0,93
CSP DT (PE) IMfa DT (PC)	1,000	7 6	13 14	1,167	0,050	-0,24	0,34
CSP DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,000*	10 6	0 14	3,333 ⁽¹⁾	0,700	0,47	0,93
IMss DT (PE) IMfa DT (PC)	0,011*	7 6	1 14	2,917	0,580	0,27	0,88
IMss DTx (PE) IMfa DT (PC)	0,002*	7 6	0 14	3,333 ⁽¹⁾	0,70	0,44	0,96
CSP DT (PE) CLio DT (PE)	0,748	7 9	13 11	0,778	-0,10	-0,20	0,40
CLio DT (PE) CSP DT (PE)	0,748	9 7	11 13	1,286	0,10	-0,40	0,20

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Em termos de incidência de lesão renal, o teste exacto de Fisher revela uma diferença significativa quando se comparam as dose tóxicas de IMfa e IMss com a IMfa dose terapêutica, bem como entre os complexos na dose tóxica e a IMfa na dose terapêutica.

Face aos complexos na dose terapêutica, não existe diferença significativa, o que indica que a taxa de lesão renal provocada é semelhante, ou seja, que a IM foi absorvida numa dose equivalente à da IM na forma ácida.

Na comparação entre complexos, não se verifica diferença significativa.

Na Tabela 40 e nas Figuras 91 e 92, pode avaliar-se a incidência e o grau de gravidade das lesões renais, na dose terapêutica e na dose tóxica.

A expressão gráfica do risco relativo face ao comparador (Figura 93) permite constatar que ambos os complexos na dose terapêutica cruzam a linha vertical que marca o efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é semelhante ao da IMfa DT.

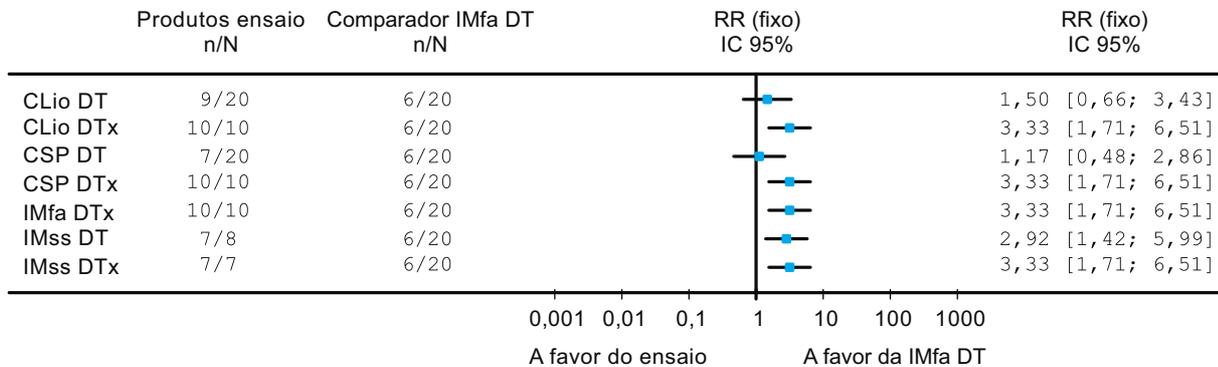


Figura 93. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão renal. Produtos em estudo face à IMfa DT.

Verifica-se que a IMss apresenta, comparativamente com os complexos, uma maior incidência de animais com lesão, não apresentando vantagens face a estes.

Na Figura 94 pode observar-se a partir da comparação entre complexos que o CSP apresenta um efeito mais benéfico do que o CLio.

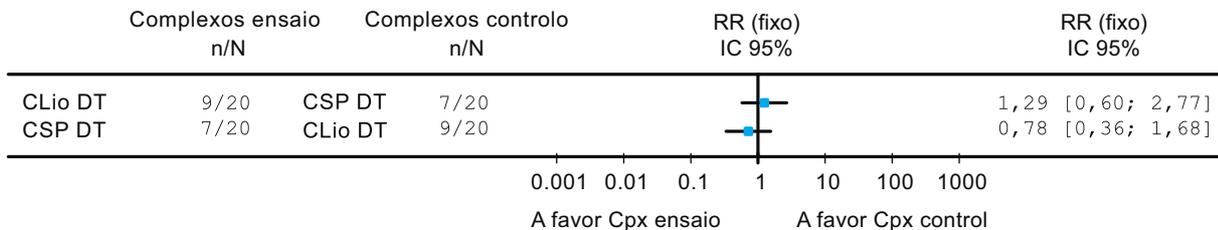


Figura 94. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão renal. Comparação entre complexos.

6.1.3.2. Índice de Lesão Renal

Para a dose terapêutica foi obtido um valor de $H=8,288$ e para a dose tóxica $H=21,000$, indicando ambos uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 ($p<0,000$). A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney foram obtidos os valores de p da Tabela 42, evidenciando diferenças significativas entre as formas de complexo e a IMfa quer na dose terapêutica, quer na dose tóxica. A IMfa e a IMss não apresentam diferença significativa para a dose terapêutica.

Tabela 42. Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão renal no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Terapêutica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
<i>Nível de significância (p)</i>	0,007*	0,739	0,333	0,014*	0,044*	0,524
Pares de Grupos (Dose Tóxica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
<i>Nível de significância (p)</i>	0,000*	0,001*	0,342	0,000*	0,000*	0,170

Pode constatar-se que não existe diferença significativa no índice de lesão provocado pelos complexos na dose terapêutica face à IMfa na dose terapêutica.

A análise conjunta dos resultados de incidência e índice de lesão mostra que o efeito dos complexos na dose terapêutica, é semelhante à da IMfa na mesma dose, podendo concluir-se que a IM foi absorvida e numa dose equivalente.

Por outro lado, face aos resultados de lesão renal, a complexação com a IM na forma ácida terá mais vantagens, do que a complexação com a forma de sal sódico, dado que a incidência e o grau de lesão são superiores para esta forma.

6.2. Estudo histopatológico do fígado

6.2.1. Alterações morfológicas

Os animais dos grupos aos quais foi administrada água destilada e HP-**b**-CD não apresentam evidência de lesão, apresentando o fígado um aspecto histológico normal, como se pode observar na Figura 95.

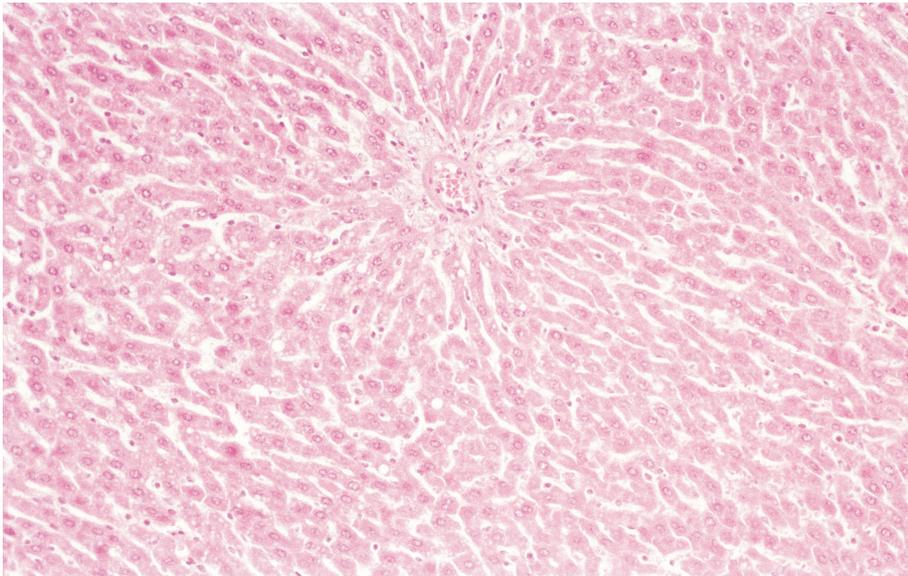


Figura 95. Análise histopatológica - Fígado com uma histologia sem alterações significativas. HP- β -CD. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

Em animais dos grupos aos quais foi administrada IM, quer sob a forma não complexada, quer complexada, nas doses terapêutica e tóxica, observa-se o aparecimento de estase, infiltrado inflamatório e focos de necrose, de que são exemplo representativo as imagens nas Figuras 96 a 100.

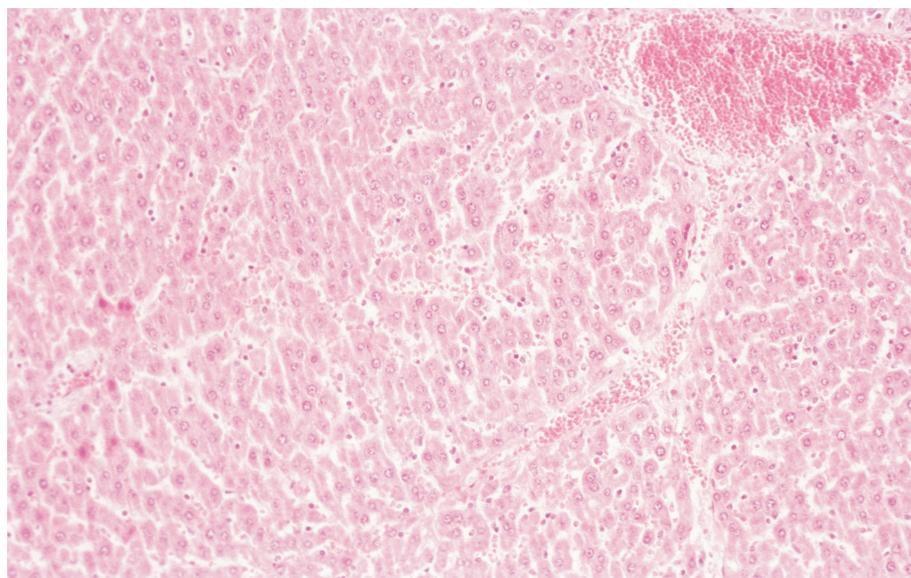


Figura 96. Análise histopatológica - Focos de necrose no fígado de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

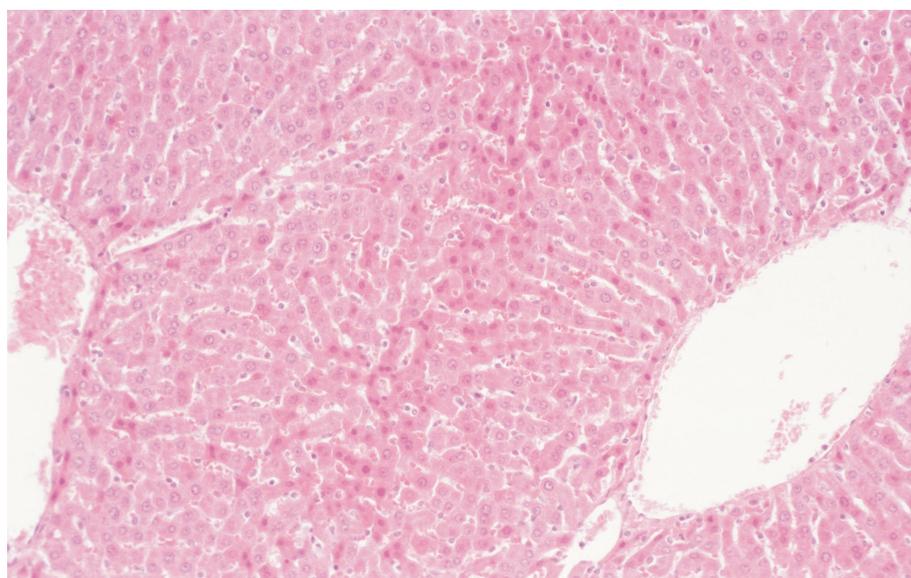


Figura 97. Análise histopatológica - Estase no fígado de um animal ao qual foi administrada IMfa, na dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

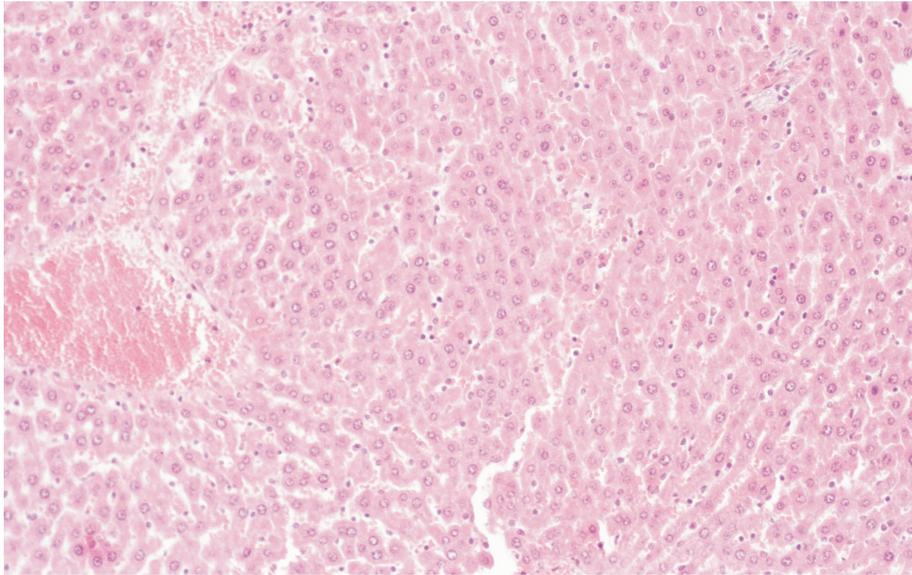


Figura 98. Análise histopatológica - Infiltrado inflamatório e foco de necrose no fígado de um animal ao qual foi administrada IM complexada por processo de secagem por pulverização, na dose terapêutica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

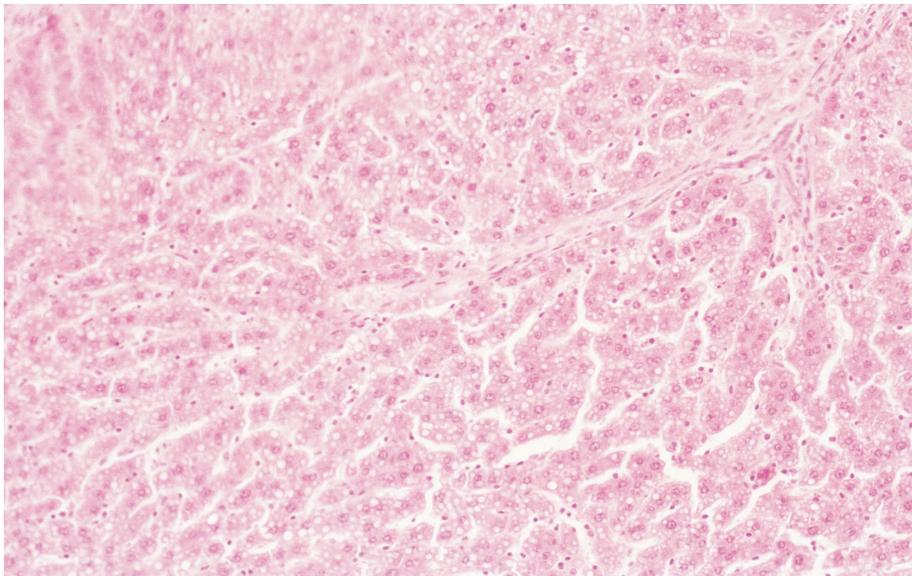


Figura 99. Análise histopatológica - Esteatose, observada no fígado de um animal ao qual foi administrada IM complexada por processo de liofilização, na dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

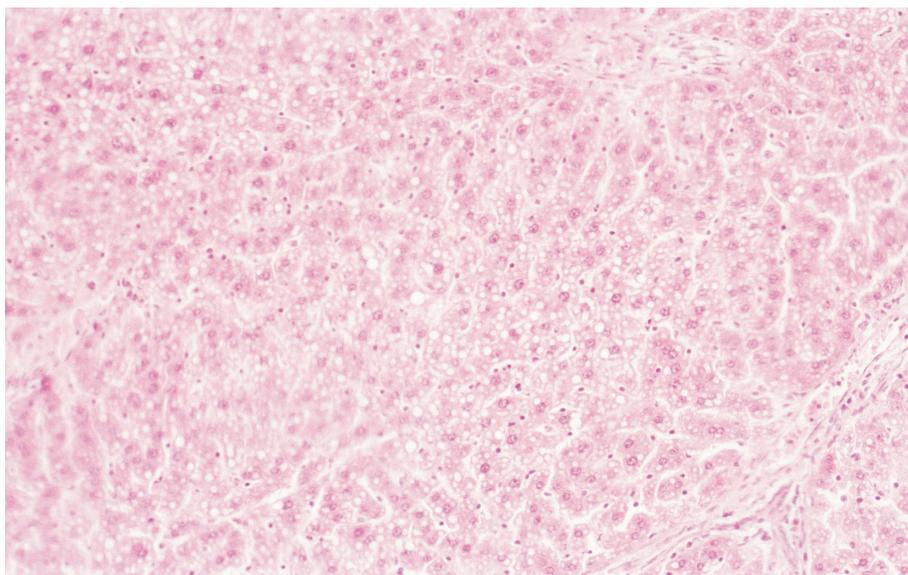


Figura 100. Análise histopatológica - Esteatose observada no fígado de um animal ao qual foi administrada IMss, na dose tóxica. Técnica coloração hematoxilina/eosina. Ampliação 50x.

6.2.2. Índice de lesão hepática

Na Tabela 43 e nas Figuras 101 e 102 sistematizam-se os dados da incidência e gravidade das lesões morfológicas ao nível hepático, na dose terapêutica e na dose tóxica.

Tabela 43. Síntese dos resultados do estudo histopatológico e do índice de lesão hepática (**ILHm**).
Am = n.º de animais com alteração morfológica; **At** = n.º total de animais; **PR** = Proporção entre Am e At (**Am/At**);
PP(IL M) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão máximo (**AIL M**) e o n.º total de animais (**AIL M/At**);
PR(IL m) = proporção entre o n.º de animais com Índice de Lesão mínimo (**AIL m**) e o n.º total de animais (**AIL m/At**).

Produto	Dose	Estudo Histológico				
		Alterações Morfológicas ao nível Hepático				
		Presença (Am/At = PR)	IL M (PR = AIL M/At)		IL m (PR = AIL m/At)	
IMfa	DT	11/20 (0,55)	3	5/20 (0,25)	1	3/20 (0,15)
	DTx	10/10 (1,00)	3	5/10 (0,50)	1	1/10 (0,10)
IMss	DT	2/8 (0,25)	3	1/8 (0,125)	1	1/8 (0,125)
	DTx	5/7 (0,71)	2	3/7 (0,43)	1	2/7 (0,28)
CLio	DT	15/20 (0,75)	3	3/20 (0,15)	1	7/20 (0,35)
	DTx	9/10 (0,90)	3	6/10 (0,60)	2	3/10 (0,30)
CSP	DT	12/20 (0,60)	3	2/20 (0,10)	1	6/20 (0,30)
	DTx	8/10 (0,80)	3	6/10 (0,60)	2	2/10 (0,20)
Água Destilada	0,005ml/Kg	0/10 (0,00)	—	—	—	—
HP-β-CD	DTx	0/20 (0,00)	—	—	—	—

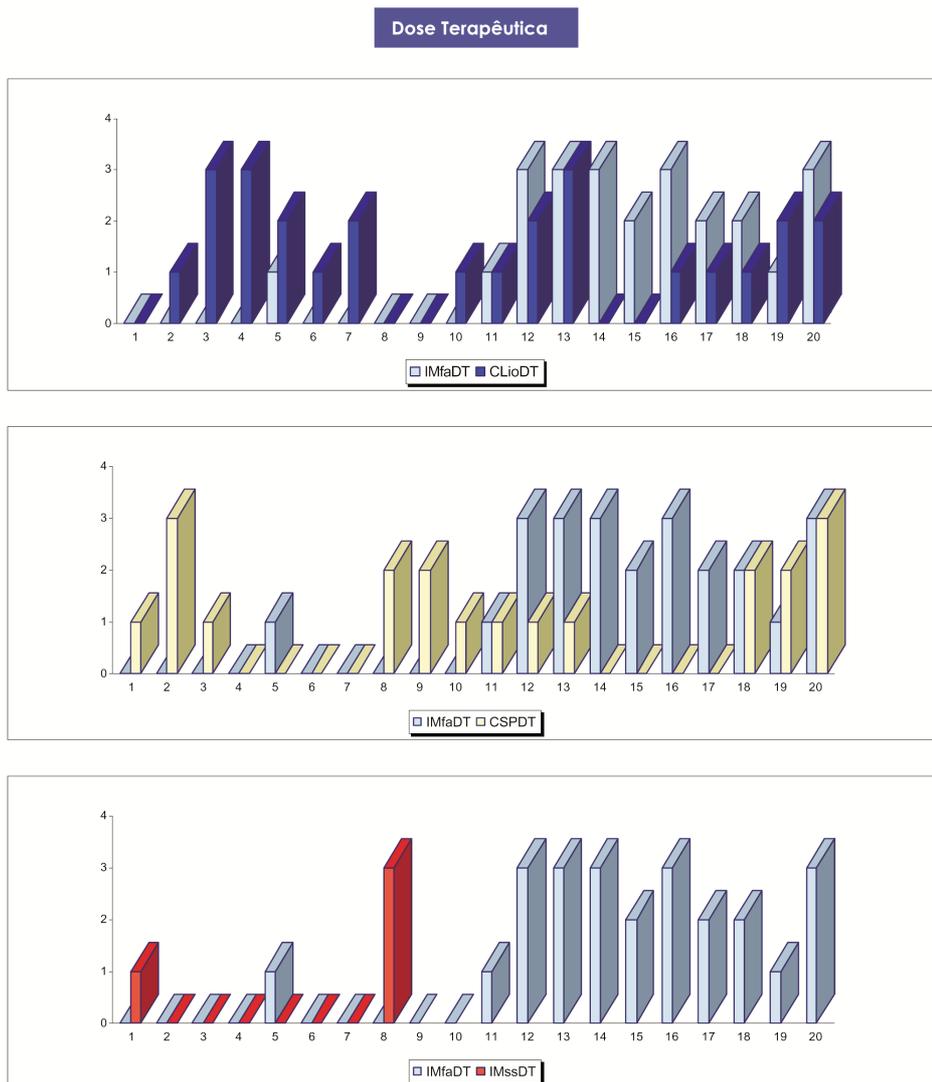


Figura 101. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível hepático, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose terapêutica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1 - Lesões inflamatórias e/ou circulatórias;
- 2 - Alterações degenerativas ou tinturais, sem fibrose e sem necrose;
- 3 - Fibrose sem formação de nódulos ou focos de necrose ou formação pré-neoplásica evidente;
- 4 - Cirrose ou necrose extensa ou neoplásica.

Eixo x = animais de cada grupo.

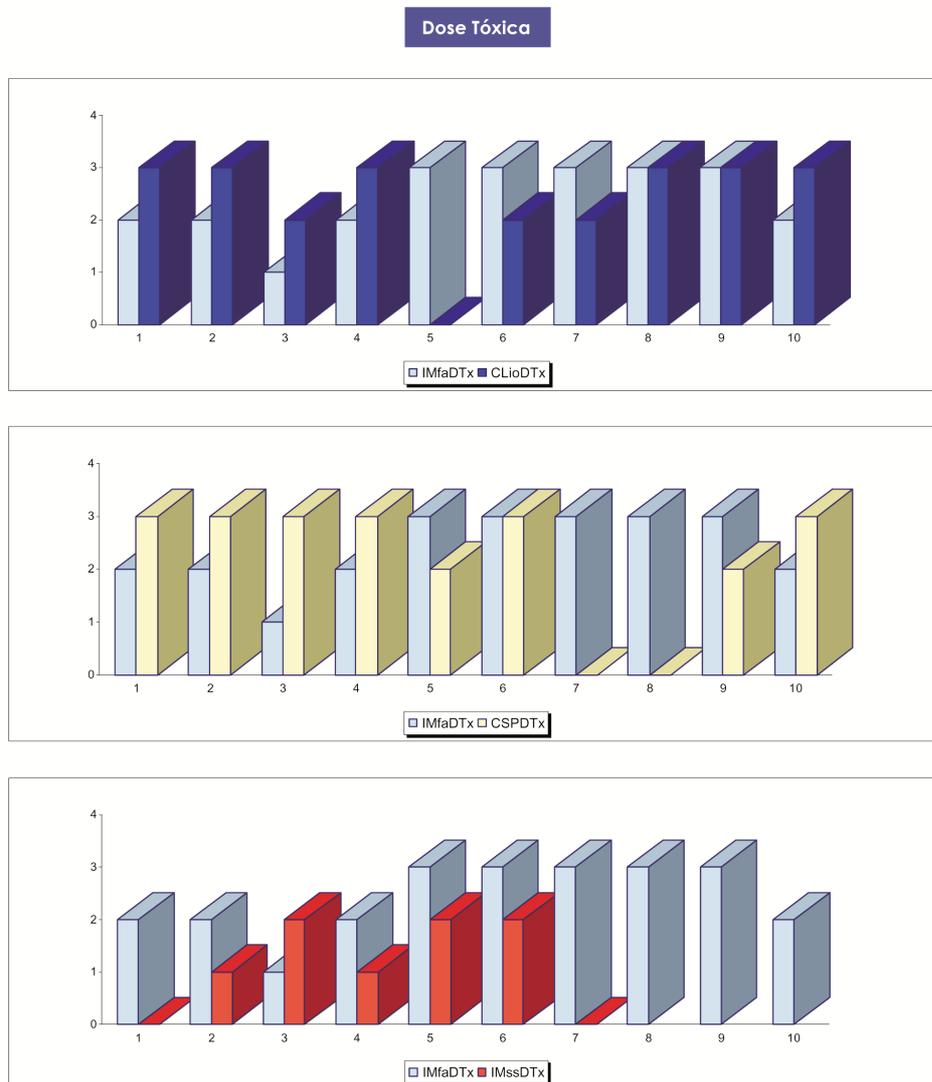


Figura 102. Análise comparativa da incidência e da gravidade de lesões morfológicas induzidas pela IM ao nível hepático, sob a forma de complexos de inclusão e de sal sódico, em relação à IM forma ácida, na dose tóxica, para o estudo histopatológico.

Eixo y = índices de lesão:

- 1 - Lesões inflamatórias e/ou circulatórias;
- 2 - Alterações degenerativas ou tinturais, sem fibrose e sem necrose;
- 3 - Fibrose sem formação de nódulos ou focos de necrose ou formação pré-neoplásica evidente;
- 4 - Cirrose ou necrose extensa ou neoplásica.

Eixo x = animais de cada grupo.

Os tipos de lesões hepáticas observados, do mesmo modo que as renais, são características da toxicidade renal e hepática induzida pela IM, tal como referido na bibliografia (Biscarini, 2000a e 2000b; Chamaa et al., 2000; Cuzzolin et al., 2001; Fowle, 1996; Kaplowitz, 2002; Ojala et al., 2001; Pezzati et al., 1999; Romagnoli et al., 1997; Zimmerman, 1999a e 1999b).

O seu aparecimento nos grupos de animais supracitados, é indiciador de que a IM, administrada sob a forma de complexos de inclusão preparados quer por método de liofilização, quer por secagem por pulverização, foi absorvida.

6.2.3. Análise comparativa de lesão hepática

6.2.3.1. Incidência de lesão

A avaliação do risco relativo é efectuada comparando os produtos em estudo, na dose tóxica e na dose terapêutica face ao comparador, que é a IMfa na dose terapêutica. Efectua-se também a comparação das diversas formas de complexo entre si, na dose terapêutica.

O objectivo é determinar se existe uma incidência de lesão comparável entre as diversas formas de IM, para doses equivalentes.

Se existir conformidade nos dados observados poder-se-á vir a concluir, a partir da análise conjunta com o índice de lesão, se a IM sob a forma de complexos é ou não absorvida.

Na Tabela 41 encontram-se sistematizados os resultados da aplicação do teste ao estudo da lesão hepática.

Tabela 44. Incidência de animais que apresentam lesão hepática, valores de Risco Relativo, Teste exacto de Fisher e Risco Absoluto. **PC** - Produto Comparador; **PE** - Produto em Estudo; **P** - Presença; **A** - Asência; **RA** - Risco Absoluto; **IC** - Intervalo de Confiança; **L Inf** - Limite inferior; **L Sup** - Limite superior.

Produtos	Teste exacto Fisher	Lesão (n)		Risco Relativo	Risco Absoluto IC a 95%		
		P	A		RA	L Inf	L Sup
IMfa DTx (PE)	0,013*	10	0	1,818 ⁽¹⁾	0,45	0,20	0,70
IMfa DT (PC)		11	9				
CLio DT (PE)	0,320	15	5	1,364	0,20	-0,09	0,49
IMfa DT (PC)		11	9				
CLio DTx (PE)	0,101	9	1	1,636	0,35	0,06	0,64
IMfa DT (PC)		11	9				
CSP DT (PE)	1,000	12	8	1,091	0,05	-0,26	0,36
IMfa DT (PC)		11	9				
CSP DTx (PE)	0,246	8	2	1,455	0,25	-0,08	0,58
IMfa DT (PC)		11	9				
IMss DT (PE)	0,221	2	6	0,455	-0,30	-0,67	0,07
IMfa DT (PC)		11	9				
IMss DTx (PE)	0,662	5	2	1,299	0,16	-0,24	0,56
IMfa DT (PC)		11	9				
CSP DT (PE)	0,501	12	8	0,800	0,15	-0,14	0,44
CLio DT (PE)		15	5				
CLio DT (PE)	0,501	15	5	1,250	-0,15	-0,44	0,14
CSP DT (PE)		12	8				

* Significativo para um valor de $p < 0,05$; bilateral.

⁽¹⁾ Para efeitos de cálculo computacional foi adicionado 0,5 a cada uma das células.

Relativamente à incidência de lesão hepática, o teste exacto de Fisher apresenta uma diferença significativa unicamente na comparação entre a IMfa na dose tóxica e a IMfa na dose terapêutica.

Face aos complexos e à IMss nas doses terapêuticas e tóxicas, não se verifica diferença significativa, o que indica que a taxa de lesão hepática provocada é semelhante, e a sua incidência não depende da dose, ou seja, mesmo para as dose terapêuticas verifica-se toxicidade. Estes dados evidenciam igualmente que a IM foi absorvida a partir das formas de complexo. Na comparação entre complexos, não se verifica diferença significativa. A IMss DT é o único produto que apresenta uma diminuição de RA (-0,30).

O CSP DT é o que regista um menor aumento de RA (0,05), quase sobreponível ao da IMfa DT.

Na Tabela 43 e nas Figuras 101 e 102, pode avaliar-se a incidência e o grau de gravidade das lesões renais, na dose terapêutica e na dose tóxica.

A expressão gráfica do risco relativo (Figura 103) permite constatar que as linhas representativas do IC nas várias formas de complexo, cruzam a linha vertical que marca o efeito nulo (RR=1), ou seja, existe a probabilidade com uma confiança de 95% de na população existirem animais nos quais o efeito é semelhante entre os complexos e a IMfa DT.

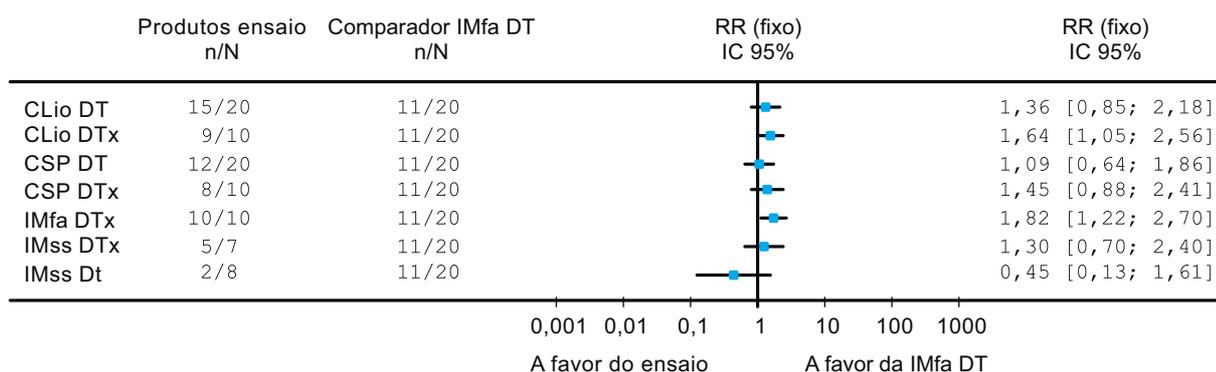


Figura 103. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da lesão hepática.

No que respeita à IM na forma de sal sódico, em ambas as doses utilizadas se verifica que as linhas representativas do IC cruzam a linha vertical do efeito nulo, significando que o efeito de tratamento é semelhante nos grupos que são objecto de comparação, o que também é evidenciado pelo facto do valor de p ser superior a 0,05.

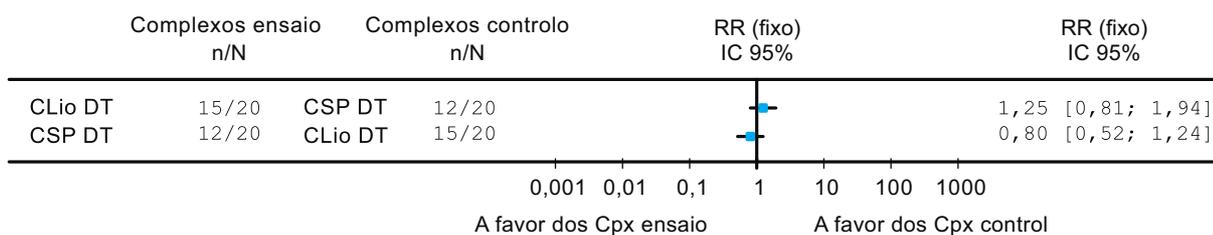


Figura 104. Representação gráfica do risco relativo para o estudo da comparação da lesão hepática entre complexos.

Na Figura 104 pode observar-se a partir da comparação entre complexos que o CSP apresenta um efeito mais benéfico do que o CLio, sendo todavia, uma diferença não significativa

6.2.3.2. Índice de Lesão Hepática

Para a dose terapêutica foi obtido um valor de $H=4,011$, com uma diferença não significativa entre os grupos para um nível de significância de 0,05 ($p=0,260$). Para a dose tóxica o valor obtido foi de $H=8,462$, verificando-se uma diferença significativa para um teste com nível de significância de 0,05 ($p=0,037$).

A partir da aplicação do teste U de Mann-Whitney aos grupos na dose tóxica foram obtidos os valores de p da Tabela 45, evidenciando diferenças significativas entre as formas de complexo e a IMss e entre a IMfa e a IMss.

Tabela 45. Análise comparativa, entre pares de produtos, da lesão hepática no estudo histopatológico. Resultados do teste U de Mann-Whitney.

Pares de Grupos (Dose Tóxica)	IMfa IMss	IMfa CSP	IMfa CLio	IMss CSP	IMss CLio	CLio CSP
<i>Nível de significância (p)</i>	0,010*	0,933	0,734	0,042*	0,012*	0,863

A análise dos dados revela a existência de menor grau de lesão para a IMss DT face à IMfa DT. Este resultado pode servir de base para em estudos futuros decidir complexar a IM sob a forma de sal sódico em alternativa à forma ácida. Todavia, há que ter em atenção que no caso da lesão renal a IMss não oferece vantagens face à IMfa.

Pode concluir-se, por outro lado, que não existe diferença significativa entre as formas de complexo e a IMfa, ou seja, o grau de lesão provocado pela indometacina é semelhante, tanto para a dose tóxica como para a dose terapêutica, corroborando assim a hipótese de que a IM é absorvida a partir dos complexos administrados por via oral.

A análise global dos dados das lesões renal e hepática consolidam a hipótese da absorção da IM sob a forma de complexos de inclusão, uma vez que a incidência e o grau de lesão são semelhantes para a IMfa administrada quer na forma livre quer na forma complexada, tanto para a dose terapêutica como para a tóxica. ■

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

33

89

93

139

237

247

Os resultados obtidos permitem, em síntese, chegar às seguintes conclusões relativamente às hipóteses que foram colocadas no início deste trabalho:

Na primeira hipótese considerou-se que ***“a formação de complexo de inclusão com HP- β -CD, pode aumentar a solubilidade e a eficiência de dissolução da IM”***.

Esta suposição foi avaliada na Parte I, onde se demonstrou no estudo de solubilidade de fases, que a estequiometria dos complexos é de 1:1, segundo a teoria de Higuchi e Connors. A avaliação do teor de IM incluída revela que o complexo obtido através de secagem por pulverização, apresenta uma maior percentagem em relação ao obtido por liofilização, mantendo-se todavia ambos numa margem de valores compatível com a estequiometria de 1:1.

O maior valor de constante de estabilidade (Ks) regista-se com o tampão fosfato pH 7,0. O valor da Ks obtido permite considerar a probabilidade de que, após administração oral do complexo, haja competição com alguns dos sais biliares, com Ks capazes de promover a deslocação da indometacina do complexo, nomeadamente o deoxicolato e o colato de sódio (Miyajima et al., 1986; Nakanishi et al., 1989). Esta competição que ocorre preferencialmente nos valores de pH encontrados no intestino dos recém-nascidos (6 a 8), irá promover a absorção da indometacina, mesmo tendo em consideração que o “pool” de ácidos biliares neste grupo etário, é 50% inferior ao do adulto (Besunder, 1988; Kadima e Lesne, 1980; Stewart e Hampton, 1987; Watkins, 1973). Por outro lado, o RN tem um pH no intestino delgado mais elevado do que o do adulto, o que permite à flora bacteriana normalmente restrita ao intestino grosso, colonizar aí (Besunder, 1988; Yoshioka et al., 1983), o que irá contribuir para a libertação da indometacina a partir do complexo, por hidrólise enzimática da ciclodextrina.

A determinação da solubilidade máxima em água purificada, revelou que os complexos de inclusão demonstram capacidade para aumentar a solubilidade da IM matéria-prima, sendo o complexo obtido por liofilização o que maior influência exerce. O aumento da solubilidade vai promover a diminuição de toxicidade gástrica por contacto tópico com a mucosa gástrica, quando a indometacina ficar no estado livre decorrente do equilíbrio cinético que se estabelece entre os produtos em solução.

Os métodos de análise utilizados para a avaliação da influência dos métodos de complexação, no estado físico da molécula de IM, permitiram comprovar que existe alteração das propriedades físico-químicas, nomeadamente em relação à solubilidade, cristalinidade e polimorfismo. A alteração destas características pode, no caso do fármaco em análise, ser benéfica, uma vez que contribui para o aumento da sua solubilidade. Deste modo, mesmo que alguma indometacina não complexada ou mesmo adsorvida à superfície da ciclodextrina (Lin et al., 1991), tenha sofrido alteração do estado físico decorrente dos processos de complexação, esta contribuirá também favoravelmente para a diminuição de toxicidade decorrente do contacto directo com a mucosa gástrica.

No que respeita ao estudo da interacção entre a IM e a HP- β -CD, os resultados evidenciam a existência de uma interacção entre as moléculas, quer no estado líquido, quer no estado sólido, a qual é sugestiva da formação de complexos de inclusão, quer pelo método de liofilização, quer pelo de secagem por pulverização. Os dados da

espectroscopia de infravermelhos não permitem tirar conclusões quanto à parte da molécula que é incluída na ciclodextrina.

Todos os parâmetros de dissolução estudados evidenciam o aumento da IM dissolvida, quando submetida a qualquer dos processos de complexação com a HP- β -CD, comparativamente com a IM matéria-prima. O complexo obtido por liofilização é o que evidencia melhores resultados nos parâmetros estudados.

Todavia, se considerarmos que para aumentar a protecção da mucosa gástrica e para promover a libertação do fármaco no local de absorção no intestino delgado, este deve permanecer complexado o tempo suficiente, e considerando, por outro lado, estudos efectuados no recém-nascido, segundo os quais o esvaziamento gástrico tem uma fase inicial rápida de 15 minutos seguida de uma fase mais lenta (Cavell, 1981), serão os parâmetros de dissolução do complexo obtido através de secagem por pulverização, os que melhor se adaptam a estes objectivos, uma vez que só aos 32 minutos atinge os 90% de fármaco dissolvido, quando no complexo obtido por liofilização, este valor foi atingido por volta dos 2 minutos.

A complexação aumenta a capacidade de solubilização e dissolução de fármacos com carácter lipófilo sem alterar as características que lhes permitem ter uma boa capacidade de difusão membranar (Frijlink et al., 1989; Veiga, 1996). Esta propriedade ficou evidente no estudo do coeficiente de partilha, cujos resultados permitem concluir que não ocorreu alteração significativa dos valores de Log P*, em relação à forma não complexada, tendo-se mantido dentro da margem aceitável (1 a 3) para que ocorra a absorção (Barreto et al., 2002; Panchagnula e Thomas, 2000).

A Indometacina, de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutico, é um fármaco classificado no grau II, sendo a dissolução um factor crítico para a sua absorção através do TGI (Amidon et al., 1995; Barreto et al., 2002). A partir dos resultados deste estudo, pode concluir-se que os complexos de inclusão melhoraram as características físico-químicas da indometacina que constituem factores que limitam a sua absorção por via oral, nas condições fisiológicas específicas dos recém-nascidos, como sejam a protecção da hidrólise a pH entre 6 e 8, a solubilidade e a dissolução.

Na segunda hipótese considerou-se que ***“quando a forma complexada é administrada por via oral, nas doses utilizadas, pode reduzir a toxicidade gástrica da IM, mantendo a capacidade de induzir lesão hepática e renal e que a HP- β -CD não tem capacidade de induzir lesão morfológica gástrica, renal ou hepática”***.

Este pressuposto foi avaliado na Parte II através de observação macroscópica de evidência de lesão, estudo citológico do muco gástrico e análise histopatológica dos vários órgãos.

Os animais tratados com IM na forma ácida e na de sal sódico, nas doses terapêutica e tóxica, evidenciaram focos de necrose gástrica, úlceras e exulcerações na observação macroscópica, apresentando os grupos da IM complexada uma redução significativa da gravidade e incidência de lesão.

O estudo citológico revelou nos animais tratados com IM na forma ácida e na de sal sódico, nas doses terapêutica e tóxica, a presença de leucócitos e eritrócitos, indicadores da ocorrência de processo inflamatório e hemorragia.

Nos grupos tratados com IM complexada só dois animais do complexo preparado por secagem por pulverização evidenciaram presença destas células, mas numa quantidade significativamente menor.

Na análise histopatológica da mucosa gástrica, o grupo da IM complexada através de secagem por pulverização evidenciou uma redução significativa de proporção de animais com lesão em relação à forma ácida, tendo o grupo da IM complexada através de liofilização evidenciado uma redução menos significativa. Salienda-se todavia, que a gravidade das lesões encontradas nos dois grupos de complexos, classificadas com o grau 1, é considerada leve e transitória.

A partir dos resultados obtidos pode concluir-se que, nas condições do ensaio, os complexos reduzem a capacidade da IM para induzir lesão gástrica, sendo o complexo obtido através de secagem por pulverização o que apresenta melhores resultados de perfil de segurança. Este comportamento pode ser devido ao perfil de dissolução, corroborando deste modo a hipótese considerada, de que os seus parâmetros de dissolução são mais adequados ao objectivo de diminuição de toxicidade gástrica, dado que a lesão pode ser causada por fármacos com uma dissolução lenta, o que proporciona

altas concentrações locais, as quais podem causar danos da mucosa.

Nestas circunstâncias, a modificação dos parâmetros de dissolução e a promoção de absorção através da complexação, podem resultar numa redução da capacidade dos fármacos de induzir lesão gástrica (Erden e Çelebi, 1988). Deste modo, a não libertação imediata da IM, como acontece com o complexo Lio (Figura 37), é indício de que possivelmente o complexo SP só libertou a maior parte da IM no intestino delgado do rato, sendo assim efectivo na protecção deste órgão, confirmando a teoria de que ao nível gástrico as CDs não sofrem alterações e o fármaco libertado é o que resulta do equilíbrio cinético estabelecido entre as várias entidades em solução (Cabral-Marques, 1994d; Duchêne e Wouessidjewe, 1990b; Frijlink et al., 1990b; Hirayama e Uekama, 1999; Miyajima et al., 1986; Nakanishi et al., 1989; Strattan, 1992).

O estudo histopatológico efectuado ao nível renal e ao nível hepático, revelou em todos os grupos de IM, quer isolada quer complexada, nas doses terapêutica e tóxica, que o rim apresenta pequenas áreas de hemorragia, vacuolização das células tubulares e alterações da densidade celular dos glomérulos e que o fígado destes mesmos grupos de animais exhibe pequenos focos de esteatose, focos de necrose e estase.

A partir da toxicidade renal e hepática evidenciada, poder-se-á inferir que a IM foi absorvida após administração oral das formas complexadas, dado que todos os animais, aos quais foi administrada IM sob qualquer forma, apresentam uma incidência e gravidade de lesão semelhantes.

A HP-**b**-CD, nas condições do estudo, não revelou capacidade de induzir lesão morfológica ao nível gástrico, renal ou hepático. Podemos assim concluir que a sua administração oral apresenta um bom perfil de segurança neste modelo animal, nas doses utilizadas e em relação aos órgãos estudados.

Dado que uma das objecções da administração por via oral da IM a RN, é a eventualidade de hidrólise devido ao pH alcalino no TGI, a complexação com HP-**b**-CD poderá assim possibilitar a administração por esta via, evitando a hidrólise da IM por protecção estereoquímica do grupo N-acil, uma vez que uma das consequências da interacção entre a molécula-hóspede e a ciclodextrina, é a protecção efectiva contra qualquer tipo de reacção, para além daquelas que podem ocorrer com os grupos hidroxilo da ciclodextrina (Szejtli, 1990). Por outro lado, o aumento da solubilidade e da dissolução contribuem para a diminuição da toxicidade, não afectando o coeficiente de partilha, o

que leva a supor que se manterá a capacidade de difusão transmembranar da IM.

A análise da toxicidade ao nível renal e hepático nas condições do ensaio, sugere que a IM foi absorvida a partir da forma complexada e que a forma de IM utilizada para efectuar a complexação deverá ser a ácida, dado que a forma de sal sódico, apesar de formar também complexos com a ciclodextrina (Redenti et al., 2001) e de exibir menor toxicidade gástrica em relação à forma ácida, apresenta um perfil de toxicidade renal superior.

A análise conjunta dos resultados do estudo tecnológico e toxicológico permite concluir que as hipóteses colocadas se confirmam e que o objectivo de complexar a IM com ciclodextrina para conseguir uma modificação das características físico-químicas e redução de toxicidade da IM ao nível gástrico, foi alcançado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A toxicidade nos roedores é muito mais pronunciada do que em humanos ou cães, devido a diferenças no metabolismo (Szejtli e Szente, 1981). Assim, mesmo tendo em conta a grande variabilidade interindividual que se verificou nos animais em estudo, o que simula o que se passa com a variabilidade interindividual nos recém-nascidos, é de esperar que a toxicidade que nos ratos diminuiu em incidência e gravidade, venha a ser ainda menos significativa em humanos.

As expectativas criadas pelos resultados obtidos e baseada no facto da complexação contribuir para mascarar o sabor (Fujioka et al., 1983; Miyaji et al., 1992), é de considerar a possibilidade de preparar, a partir do complexo SP, uma forma farmacêutica de pó para solução oral, a qual deverá ser estudada em termos de estabilidade e reprodutibilidade industrial, bem como deverão ser efectuados testes de segurança e biodisponibilidade, noutra modelo animal e no homem.

A forma farmacêutica de pó para solução oral, apresenta diversas vantagens no que concerne à administração de fármacos a recém-nascidos, nomeadamente a facilidade de preparação extemporânea, a utilização da água como veículo, impedir a obstrução das sondas nasogástricas de diâmetro muito reduzido pelo facto de ser uma solução, e, no caso da administração oral, não ter mau sabor.

Foi afirmado no Prefácio deste trabalho que a investigação farmacêutica tem como intuito o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos direccionados à resolução de situações clínicas, integrando conhecimentos pluridisciplinares e que é a prática de cuidados farmacêuticos que possibilita a identificação de situações clínicas para as quais os recursos terapêuticos existentes não são os adequados.

O problema com que diariamente se debatem os profissionais de saúde que prestam cuidados a recém-nascidos e a pediatria no geral, da carência de formas farmacêuticas adequadas, impõe a atenção premente e a integração dos conhecimentos de todos os envolvidos nos cuidados de saúde, no sentido de dar solução ao dilema de quem prescreve, prepara e administra medicamentos às crianças, acerca dos quais se carece da informação que é legalmente exigida para a introdução de novas formulações no mercado comercial, porque entre não tratar e correr o risco de morte e tratar com riscos de incerteza, de eficiência e de segurança, opta-se pela segunda hipótese.

Espero com este trabalho poder contribuir para despertar a atenção dos profissionais ligados à investigação, para a importância do estudo de possíveis vias de administração alternativas para administração de medicamentos em pediatria e para a avaliação de aspectos biofarmacêuticos, de segurança e de eficácia de fármacos "in vivo" e "in vitro". ■

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

33

89

93

139

237

247

AMIDON, G. L. [et al.] - A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 12 :3 (1995) 413-420.

AMMOURY, N. [et al.] - Rôle protecteur des nanocapsules vis-à-vis des lésions de la muqueuse gastrique produites par l'indométacine chez le rat à pylore lié. **S.T.P. Pharma.** ISSN 0758-6922. 5:8/9 (1989) 537-540.

AMMOURY, N. [et al.] - Indomethacin-loaded poly (D,L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. **Clin. Mater.** ISSN 0267-6605.13 (1993) 121-130.

ANGERIO, A. D.; KOT, P. A. - Closure of the ductus arteriosus: new insights for critical care. **Crit. Care Nurs. Quarterly.** ISSN 0887-9303. 20:4 (1998) 80-85.

ANTENUCCI, R. N.; PALMER, J. K. - Enzymatic degradation of α and β -cyclodextrins by Bacteroides of the human colon. **J. Agric. Food Chem.** ISSN 0021-8561. 32:6 (1984) 1316-1321.

ARCHER, N. - Patent ductus arteriosus in the newborn. **Arch. Dis. Child.** ISSN 0003-9888. 69 (1993) 529-532.

- ARIMA, H. [et al.] - Enhanced rectal absorption and reduced local irritation of the anti-inflammatory drug ethyl 4-biphenylacetate in rats by complexation with water-soluble β -cyclodextrin derivatives and formulation as oleaginous suppository. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 81:11 (1992) 1119-1125.
- BACKENSFELD, T. [et al.] - Effect of cyclodextrin derivatives on indomethacin stability in aqueous solution. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 7:5 (1990) 484-490.
- BACKENSFELD, T.; MÜLLER, B. W.; KOLTER, K. - Interaction of NSA with cyclodextrins and hydroxypropyl cyclodextrin derivatives. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 74 (1991) 85-93.
- BAPTISTA [et al.] - Canal arterial patente em cuidados intensivos neonatais. **Rev. Port. Cardiol.** ISSN 0304-4750. 18:12 (1999) 1095-1100.
- BARRETO, M.; BICA, A.; FARINHA, A. - Sistemas de classificação biofarmacêutica. **Bol. LEF.** ISSN 0872-7864. 32 (2002) 2-10.
- BARST, R. J.; GERSONY, W. M. - The pharmacological treatment of patent ductus arteriosus: a review of the evidence. **Drugs.** ISSN 0012-6667. 38:2 (1989) 249-266.
- BECIVERIC-LACAN, M. - Inclusion complexation of indomethacin with cyclodextrins in solution and in the solid state. **S.T.P. Pharma Sci.** ISSN 1157-1489. 4:4 (1994) 282-286.
- BELLRINGER, M. E. [et al.] - β -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. **Fd. Chem. Toxic.** ISSN 0278-6915. 33:5 (1995) 367-376.
- BESUNDER, J. B. et al - Principles of drug biodisposition, in the neonate. A critical evaluation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic interface (part I). **Clin. Pharmacokinet.** ISSN 0312-5963. 14 (1988) 189-216.
- BETTINETTI, G. P. - Analisi del polimorfismo di un farmaco. **Il Fármaco. Ed. Pr.** ISSN 0014-827X. 43:3 (1988) 71-99.
- BHATT, V.; NAHATA, M. C. - Pharmacologic management of patent ductus arteriosus. **Clin. Pharm.** ISSN 0278-2677. 8 (1989) 17-33.
- BISCARINI, L. - Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In DUKES, M. N. G.; ARONSON, J. K. - **Meyler's Side Effects of Drugs.** 14th ed. Amsterdam [et al.]: Elsevier, 2000a. ISBN 0-444-50093-6. p. 280.
- BISCARINI, L. - Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In DUKES, M. N. G.; ARONSON, J. K. - **Meyler's Side Effects of Drugs.** 14.^a ed. Amsterdam [et al.]: Elsevier, 2000b. ISBN 0-444-50093-6. p. 281.
- BODOR, N. S.; HUANG, M-J.; WATTS, J. D. - Theoretical studies on the structures of natural and alkylated cyclodextrins. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 84:3 (1995) 330-336.
- BORKA, L. - The polymorphism of indomethacin. **Acta Pharm. Suec.** ISSN 0001-6675. 11 (1974) 295-303.
- BORKA, L.; HALEBLIAN, J. K. - Crystal polymorphism of pharmaceuticals. **Acta Pharm. Jugosl.** ISSN 0001-6661. 40 (1990) 71-94.

- BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. - Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiol. Biootechnol.** DOI 10.1007/s00253-002-1057-x. 59 (2002) 609-617.
- BREWSTER, M. E.; ESTES, K. S.; BODOR, N. - An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 59 (1990) 231-243.
- BREWSTER, M. [et al.] - Effect of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicin hydrochloride. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 79 (1992) 289-299.
- BREWSTER, M. E. [et al.] - Intravenous and oral pharmacokinetic evaluation of a 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based formulation of carbamazepine in the dog: comparison with commercially available tablets and suspensions. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 86:3 (1997) 335-339.
- BRION, L. P.; CAMPBELL, D. E. - Furosemide in indomethacin-treated infants: systematic review and meta-analysis. **Pediatr. Nephrol.** ISSN 0931-041X. 13 (1999) 212-218.
- BRITTAIN, H. G. - Spectral methods for the characterization of polymorphs and solvates. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 86:4 (1997) 405-412.
- BRITTAIN, H. G. - Polymorphism: pharmaceutical aspects. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. vol. 3. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 2239-2249.
- BULBENA, O. [et al.] - Gastroprotective effect of zinc acexamate against damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a morphological study. **Dig. Dis. Sci.** ISSN 0163-2116. 38:4 (1993) 730-739.
- BURI, P. - Préformulation: pKa et coefficient de partage. **Labo-Pharma - Problèmes et Techniques**. ISSN 0458-5747. 307 (1981) 181-186.
- CABRAL-MARQUES, H. - Structure and properties of cyclodextrins: inclusion complex formation. **Rev. Port. Farm.** ISSN 0484-811X. 44:2 (1994a) 77-84.
- CABRAL-MARQUES, H. - Applications of cyclodextrins: thermodynamic aspects of cyclodextrin complexes. **Rev. Port. Farm.** ISSN 0484-811X. 44:2 (1994b) 85-96.
- CABRAL-MARQUES, H. - Preparation of complexes: evidence for complex formation. **Rev. Port. Farm.** ISSN 0484-811X. 44:4 (1994c) 157-163.
- CABRAL-MARQUES, H. - Cyclodextrin's derivatives: absorption, toxicity, metabolism and fate. **Rev. Port. Farm.** ISSN 0484-811X. 44:4 (1994d) 147-156.
- CABRAL-MARQUES, H.; HADGRAFT, J.; KELLAWAY, I. W. - Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 63 (1990) 259-266.
- CABRAL-MARQUES, H.; MORAIS, J. A. - Ciclodextrinas e seus complexos de inclusão. **Rev. Port. Farm.** ISSN 0484-811X. 41:2 (1991) 5-8.
- CALABRESE, E. J. - Suitability of animal models for predictive toxicology: theoretical and practical considerations. **Drug Metab. Rev.** ISSN 0360-2532. 15:3 (1984) 505-523.

- CAPPELL, M. S.; KOZICKY, O.; COMPETIELLO, L. S. - Indomethacin-associated cholestasis. **J. Clin. Gastroenterol.** ISSN 0192-0790. 10:4 (1988) 445-447.
- CARPENTER, T. O.; GERLOCZY, A.; PITHA, J. - Safety of parenteral hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 84:2 (1995) 222-225.
- CAVELL, B. Gastric emptying in infants fed human milk or infant formula. **Acta Paediatr. Scand.** ISSN 0001-656X. 70 (1981) 639-641.
- CHAMAA, N. S. [et al.] - The renal hemodynamic effects of ibuprofen in the newborn rabbit. **Pediatr. Res.** ISSN 0031-3998. 48:5 (2000) 600-605.
- CHOWDARY, K. P. R.; SURESH BABU, K. V. V. - Dissolution, bioavailability and ulcerogenic studies on solid dispersions of indomethacin in water soluble cellulose polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** ISSN 0363-9045. 20:5 (1994) 799-813.
- CIPICIANI, A. [et al.] - Micellar effects on the basic hydrolysis of indomethacin and related compounds. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 74:11 (1985) 1184-1187.
- CLARKE, M.; OXMAN, A. D., editors. **Cochrane Reviewers' Handbook 4.2.0.** (updated March 2003). <http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook/handbook.htm>.
- CLASS, S-D; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. - Calorimetry in pharmaceutical research and development. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 2. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 289-301.
- CONTI, B. [et al.] - Testing of "in vitro" dissolution behaviour of microparticulate drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** ISSN 0363-9045. 21:10 (1995) 1223-1233.
- COOMBS, R. C. [et al.] - Gut blood flow velocities in the newborn: effects of patent ductus arteriosus and parenteral indomethacin. **Arch. Dis. Child.** ISSN 0003-9888. 65 (1990) 1067-1071.
- CUZZOLIN, L.; DAL CERÈ, M.; FANOS, V. - NSAID-Induced nephrotoxicity from the fetus to the child. **Drug Saf.** ISSN 0114-5916. 24:1 (2001) 9-18.
- DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. - Preparation and staining methods for blood and bone-marrow films. In DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. - **Practical Haematology.** 7th ed. New York: Churchill Livingstone, 1991. ISBN 0-443-03952-6. p. 75-85.
- DAVIES, N. M.; WRIGHT, M. R.; JAMALI, F. - Anti-inflammatory drug-induced small intestinal permeability: the rat is a suitable model. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 11:11 (1994) 1652-1656.
- DECRETO-LEI n.º 129/92. **D.R. I Série A.** 153 (92-07-06) 3197-3198.
- DECRETO-LEI n.º 197/96. **D.R. I Série A.** 240 (96-10-16) 3619.
- DINCHUK, J. E. [et al.] - Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature.** ISSN 0028-0836. 378:6555 (1995) 406-409.
- DJEDAÏNI, F. [et al.] - High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β -cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 79:7 (1990) 643-646.

- DOLUISIO, J. T. [et al.] - Drug absorption II: effect of fasting on the intestinal drug absorption. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 58:10 (1969) 1200-1202.
- DRESSMAN, J. B. [et al.] - Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 15:1 (1998) 11- 22.
- DUCHÊNE, D.; VAUTION, C.; GLOMOT, F. - La biodisponibilité des principes actifs par inclusion dans les cyclodextrines. **S.T.P. Pharma.** ISSN 0758-6922. 1:4 (1985) 323-332.
- DUCHÊNE, D.; VAUTION, C.; GLOMOT, F. - Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology. In RUBINSTEIN, M. H. - **Pharmaceutical Technology. Drug Stability.** New York: John Wiley & Sons, 1989. ISBN 0-470-21411-2. p. 9-23.
- DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. - Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives. **Pharm. Tech. Int.** ISSN 0164-6826. 6 (1990a) 21-29.
- DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. - Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, part II. **Pharm. Tech.** ISSN 0147-8087. 14:8 (1990b) 22-30.
- DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. - The current state of β -cyclodextrin in pharmaceuticals. **Acta Pharm. Technol.** ISSN 0340-3157. 36:1 (1990c) 1-6.
- DUERST, M. D. - Spectroscopic methods of analysis: infrared spectroscopy. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 3. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 2519-2533.
- ERDEN, N.; ÇELEBI, N. - A study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 48 (1988) 83-89.
- ESCLUSA-DIAZ, M. [et al.] - Inclusion complexation of glibenclamida with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution and in solid state. **Eur. J. Pharm. Sci.** ISSN 0928-0987. 1 (1994) 291-296.
- FARA, J. W. [et al.] - Assessment and validation of animal models to evaluate topical effects of substances on gastrointestinal mucosa. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 5:3 (1988) 165-171.
- FINI, A.; FAZIO, G.; FEROCI, G. - Solubility and solubilization properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 126 (1995) 95-102.
- FLOURIÉ, B. [et al.] - Fate of β -cyclodextrin in the human intestine. **J. Nutr.** ISSN 0022-3166. 123 (1993) 676-680.
- FOWLIE, P. W. - Prophylactic indomethacin: systematic review and meta-analysis. **Arch. Dis. Child.** ISSN 0003-9888. 74 (1996) F81- F87.
- FORD, J. L.; RAJABI-SIAHBOOMI, A. R. - Dissolution and dissolution testing. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2822-X. p. 717-728.
- FORT, F. L. - Animals in drug development. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2822-X. p. 70-82.

- FRIJLINK, H. W.; SCHOONEN, A. J. M.; LERK, C. F. - The effects of cyclodextrins on drug absorption I: in vitro observations. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 49 (1989) 91-102.
- FRIJLINK, H. W. [et al.] - The effects of cyclodextrins on drug absorption II: in vivo observations. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 64 (1990a) 195-205.
- FRIJLINK, H. W. [et al.] - The pharmacokinetics of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the rat. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 7:12 (1990b) 1248-1252.
- FRIJLINK, H. W. [et al.] - The effect of parenterally administrated cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 8:1 (1991) 9-16.
- FUJIOKA, K. [et al.] - Biopharmaceutical study of inclusion complexes. I. Pharmaceutical advantages of cyclodextrin complexes of bencyclane fumarate. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 31:7 (1983) 2416-2423.
- GAL, P.; GILMAN, J. T. - Drug disposition in neonates with patent ductus arteriosus. **Ann. Pharmacother.** ISSN 1060-0280. 27 (1993) 1383-1388.
- GERLOCZY, A.; HOSHINO, T.; PITHA, J. - Safety of oral cyclodextrins: effects of hydroxypropyl cyclodextrins, cyclodextrin sulfates and cationic cyclodextrins on steroid balance in rats. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 83:2 (1994) 193-196.
- GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. - Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. **S.T.P. Pharma Sci.** ISSN 1157-1489. 5:4 (1995) 276-290.
- GIRON, D. - Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. **Acta Pharm. Jugosl.** ISSN 0001-6661. 40 (1990) 95-157.
- GIRON, D. - Thermal analysis of drugs and drug products. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. vol. 3. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 2766-2789.
- GROSFELD, J. L. [et al.] - Increased risk of necrotizing enterocolitis in premature infants with patent ductus arteriosus treated with indomethacin. **Ann. Surg.** ISSN 0003-4932. 224:3 (1996) 350-357.
- HABIB, M. J. [et al.] - Effects of cyclodextrines and phospholipids in enhancing dissolution of indomethacin. **Drug Dev. Ind. Pharm.** ISSN 0363-9045. 21:15 (1995) 1815-1822.
- HAMADA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. - Interactions of α and β -cyclodextrin with several non-steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 23:6 (1975) 1205-1211.
- HAMMERMAN, C. - Patent ductus arteriosus: clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. **Clin. Perinatol.** ISSN 0095-5108. 22:2 (1995) 457-479.
- HAMMERMAN, C.; KAPLAN, M. - Comparative tolerability of pharmacological treatments for patent ductus arteriosus. **Drug Saf.** ISSN 0114-5916. 24:7 (2001) 537-551.
- HARMAN, R. E. [et al.] - The metabolites of indomethacin, a new anti-inflammatory drug. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** ISSN 0022-3565. 143 (1964) 215-220.

- HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. - Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instrum.** ISSN 0065-2148. 4 (1965) 117-212.
- HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. - Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Adv. Drug Deliv. Rev.** ISSN 0169-409X. 36 (1999)125-141.
- HYMAN, P. E. et al - Gastric acid secretory function in preterm infants. **J. Pediatr.** ISSN 0022-3476. 106:3 (1985) 467-471.
- IRIE, T. [et al.] - Effect of bile on the intestinal absorption of α -cyclodextrin in rats. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 43 (1988) 41-44.
- IRIE, T.; FUKUNAGA, K.; PITHA, J. - Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: lipid dissolution and effects on lipid transfers in vivo. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 81:6 (1992a) 521-523.
- IRIE, T. [et al.] - Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. II: effects on transport and disposition of lipids in rabbits and humans. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 81:6 (1992b) 524-528.
- IRIE, T.; UEKAMA, K. - Pharmaceutical applications of cyclodextrins III: toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 86:2 (1997) 147-162.
- ISMAIL, S. - Interaction of anti-convulsant drugs with alpha- and beta-cyclodextrins. I. Methsuximide. **S.T.P. Pharma Sci.** ISSN 1157-1489. 1:5 (1991) 321-325.
- JONES, S. P. [et al.] - Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part I: preparation, structure and properties of cyclodextrins and cyclodextrin inclusion compounds. **Acta Pharm. Technol.** ISSN 0340-3157. 30:3 (1984) 213-223.
- KADIMA, L. N.; LESNE, M. - Le métabolisme des médicaments chez le nouveau-né et le nourrisson. **J. Pharm. Belg.** ISSN 0047-2166. 35:4 (1980) 301-310.
- KAMRAN, S. [et al.] - In vitro effect of indomethacin on polymorphonuclear leukocyte function in preterm infants. **Pediatr. Res.** ISSN 0031-3991. 33:1 (1993) 32-35.
- KAPLOWITZ, N. - Mechanisms of liver cell injury. **J. Hepatol.** ISSN 0169-5185. 32 (supl. 1) (2000) 39-47.
- KAPLOWITZ, N. - Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. **Semin. Liver Dis.** ISSN 0272-8087. 22:2 (2002) 137-144.
- KARMELI, F. [et al.] - Role of vasoactive intestinal peptide (VIP) in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Dig. Dis. Sci.** ISSN 0163-2110. 38:7 (1993) 1210-1219.
- KAUKONEN, A. M.; LENNERNÄS, H.; MANNERMAA, J. P. - Water-soluble β -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: preclinical evaluation of spironolactone bioavailability from solutions of β -cyclodextrin derivatives in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** ISSN 0022-3537. 50 (1998) 611-619.
- KIMURA, T. [et al.] - Drug absorption from large intestine: physicochemical factors governing drug absorption. **Biol. Pharm. Bull.** ISSN 0918-6158. 17:2 (1994) 327-333.
- KINGSFORD, M. [et al.] - An in-vivo - in-vitro correlation for the bioavailability of frusemide tablets. **J. Pharm. Pharmacol.** ISSN 0022-3537. 36 (1984) 536-538.

- KRASNA, I. H.; LEE, R. T. - Allopurinol protects the bowel from necrosis caused by indomethacin and temporary intestinal ischemia in mice. **J. Pediatr. Surg.** ISSN 0022-3468. 28:9 (1993) 1175-1177.
- KRASOWSKA, H. - Kinetics of indomethacin hydrolysis. **Acta Pharm. Jugosl.** ISSN 0001-6661. 24 (1974) 193-201.
- KUROZUMI, M.; NAMBU, N.; NAGAI, T. - Inclusion compounds of non-steroidal anti-inflammatory and other slightly water soluble drugs with α and β -cyclodextrins in powdered form. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 23:12 (1975) 3062-3068.
- LA ROTONDA, M. I. [et al.] - Analisi correlativa fra bilancio idrofilo-lipofilo, coefficiente di diffusione e concentrazione idrogenionica in una serie di farmaci antiinfiammatori non steroidei. **Il Farmaco.** ISSN 0430-0912. 43:5 (1988) 439-455.
- LANGUER, J. C.; SOHAL, S. S.; MUMFORD, D. A. - Mucosal permeability in the immature rat intestine: effects of ischemia-reperfusion, cold stress, hypoxia, and drugs. **J. Pediatr. Surg.** ISSN 0022-3468. 28:10 (1993) 1380-1385.
- LEFF, R. D.; ROBERTS, R. J. - Problems in drug therapy for pediatric patients. **Am. J. Hosp. Pharm.** ISSN 0002-9289. 44 (Apr) (1987) 865-870.
- LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. - Partition coefficients and their uses. **Chem. Reviews.** ISSN 0009-2665. 71:6 (1971) 525-616.
- LEROY-LECHAT, F. [et al.] - Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 101 (1994) 97-103.
- LI WAN PO, A.; ELIAS, A. N.; IRWIN, W. J. - Non-isothermal and non-isopH kinetics in formulation studies. **Acta Pharm. Suec.** ISSN 0001-6675. 20 (1983) 277-286.
- LIEN, E. J.; REN, S. - Partition Coefficients. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 2. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 2012-2019.
- LIN, S. Z. - Isolation and solid-state characteristics of a new crystal form of indomethacin. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 81:6 (1992) 572-576.
- LIN, S. Z. [et al.] - Indomethacin and cyclodextrin complexes. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 69 (1991) 211-219.
- LIN, S. Z. [et al.] - In vivo evaluation of indomethacin / cyclodextrin complexes: gastrointestinal tolerance and dermal anti-inflammatory activity. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 106 (1994) 63-67.
- LIN, S. Y.; KAO, Y. H. - Solid particles of drug-beta-CD inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 56 (1989) 249-259.
- LIVERSIDGE, G. G.; DENT, J.; EICKHOFF, W. M. - Influence of indomethacin amphoteric gel on gastric ulcerogenicity and absorption of indomethacin in rats. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 6:1 (1989) 44-48.

- LOFTSON, T.; BREWSTER, M. E. - Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 85:10 (1996) 1017-1025.
- LOFTSON, T.; BREWSTER, M. E. - Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. **Pharm. Tech. Eur.** ISSN 0164-6826. 5 (1997) 26-34.
- LOFTSSON, T.; OLAFSSON, J.H. - Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. **Int. J. Dermatol.** ISSN 0011-9059. 37:4 (1998) 241-246.
- LUGEA, A. [et al.] - Influence of dietary fat on duodenal resistance to acid. **Gut.** ISSN 0017-5749. 34 (1993) 1303-1309.
- MAHMUD, T. [et al.] - Enantiomers of flurbiprofen can distinguish key pathophysiological steps of NSAID enteropathy in the rat. **Gut.** ISSN 0017-5749. 43 (1998) 775-82.
- MASON, S. - Some aspects of gastric function in the newborn. **Arch. Dis. Child.** ISSN 0003-9888. 37 (1962) 387-391.
- MENGUY, R.; DESBAILLETS, L. - Role of inhibition of gastric mucous secretion in the phenomenon of gastric mucosal injury by indomethacin. **Am. J. Dig. Dis.** ISSN 0163-2116. 12:9 (1967) 862-866.
- MIYAJI, T. [et al.] - Improvement of oral bioavailability of fenbufen by cyclodextrin complexations. **Acta Pharm. Nord.** ISSN 1100-1801. 4:1 (1992) 17-22.
- MIYAJIMA, K. [et al.] - Interaction of β -cyclodextrin with bile salts in aqueous solutions. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 34:3 (1986) 1395-1398.
- MIYAZAKI, S.; YAMAYRA, T.; NADAI, T. - Effect of bile flow on indomethacin absorption in rats. **Acta Pharm. Suec.** ISSN 0001-6675. 18 (1981) 135-138.
- MOSHER, G.; THOMPSON, D. O. - Complexation and Cyclodextrins. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. vol. 1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2822-X. p. 531-558.
- MOYANO, J. R. [et al.] - Evaluation of dissolution characteristics of oxazepam-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin binary systems. **Pharm. Acta Helv.** ISSN 0031-6865. 69 (1994) 81-90.
- MOYANO, J. R. [et al.] - Study of the dissolution characteristics of oxazepam via complexation with β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 114 (1995) 95-102.
- MÜLLER, B. W.; BRAUNS, U. - Hydroxypropyl- β -cyclodextrin derivatives: influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 75:6 (1986) 571-572.
- NAGARSENKER, M. S.; MERSHRAM, R. N.; RAMPRKASH, G. - Solid dispersion of hydroxypropyl β -cyclodextrin and keterolac: enhancement of in-vitro dissolution rates, improvement in anti-inflammatory activity and reduction in ulcerogenicity in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** ISSN 0022-3537. 52 (2000) 949-956.
- NAKAJIMA, T.; SUNAGAWA, M.; HIROHASHI, T. - Studies of cyclodextrin inclusion complexes. II. Application of the partition coefficient method. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 32:2 (1984) 401-408.

- NAKANISHI, K. [et al.] - Effect of the interaction of drugs- β -cyclodextrin complex with bile salts on the drug absorption from rat small intestinal lumen. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 37:1 (1989) 211-214.
- NAKANISHI, K. [et al.] - Effect of cyclodextrins on biological membrane. I. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of non-absorbable drug by cyclodextrins. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 40:5 (1992) 1252-1256.
- NAMBU, N. [et al.] - Influence of inclusion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrin on the irritation to stomach of rats upon oral administration. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 26:12 (1978) 3609-3612.
- NASH, R. A. - Cyclodextrins. In KIBBE, A. H. - **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press. 2000. ISBN 0-85369-381-1. p. 165-168.
- O'BRIEN, M.; McCAULEY, J.; COHEN, E. - Indomethacin. In FLOREY, K. (Ed.) - **Analytical Profiles of Drug Substances**. San Diego [et al.]: Academic Press Inc., 1984. ISBN 0-12-260813-5. vol. 13 p. 211-238.
- OGISO, T. [et al.] - Pharmacokinetics of indomethacin octyl ester (prodrug) and indomethacin produced from the prodrug. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 83:1 (1994) 34:37.
- OHNO, T. [et al.] - Dilatation and constriction of rat gastric mucosal microvessels through prostaglandin EP2 and EP3 receptors. **Alim. Pharmacol. Ther.** ISSN 0269-2813. 13:9 (1999) 1243-1250.
- OJALA, R. [et al.] - Renal follow-up of premature infants with and without perinatal indomethacin exposure. **Arch. Dis. Child.** ISSN 0003-9888. 84:1 (2001) F28-F33.
- O'NEIL, M. G. [et al.] (Ed) - Indomethacin. In **The Merck Index**. 30.^a ed. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2822-X. p. 70-82.
- OTAGIRI, M. [et al.] - Inclusion complex formations of the anti-inflammatory drug flurbiprofen with cyclodextrins in aqueous solution and in solid state. **Acta Pharm. Suec.** ISSN 0001-6675. 20 (1983) 11-20.
- OTERO ESPINAR, F. J. [et al.] - Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 70 (1991) 35-41.
- PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. - Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 201 (2000) 131-150.
- PARENT, L. S. - NSAID: induced gastropathy. **Drug Topics**. ISSN 0012-6616. 135:3 (1991) 63-71.
- PELLEGRIN, P.; LESNE, M. - La posologie des médicaments chez le nouveau-né, le nourrisson et l'enfant et leurs contre-indications. **J. Pharm. Belg.** ISSN 0047-2166. 35:4 (1980) 289-300.
- PESTANA, M. H.; GAGEIRO, J. N. - In ROBALO, M. (Ed) **Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS**. 3^a ed. Lisboa: Edições Sílabo, Lda., 2003. ISBN 972-618-297-2.

- PEZZATI, M. [et al.] - Effects of indomethacin and ibuprofen on mesenteric and renal blood flow in preterm infants with patent ductus arteriosus. **J. Pediatr.** ISSN 0022-3476. 135:6 (1999) 733-738.
- PIKAL, M. J. - Freeze drying. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. vol. 2. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 1299-1326.
- PITHA, J.; GERLOCZY, A.; OLIVI, A. - Parenteral hydroxypropyl cyclodextrins: intravenous and intracerebral administration of lipophiles. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 83:6 (1994) 833-837.
- PITHA, J.; PITHA J. - Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 74:9 (1985) 987-990.
- PITHA, J. [et al.] - Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 29 (1986) 73-82.
- PITHA, J. [et al.] - Distribution of substituents in 2-hydroxypropyl ethers of cyclomaltoheptaose. **Carbohydr. Res.** ISSN 0008-6215. 200 (1990) 429-435.
- PORTARIA n.º 1005/92. **D.R. I Série B.** 245 (92-10-23) 4930-4942.
- PORTARIA n.º 466/95. **D. R. I Série B.** 114 (95-05-17) 2980-2981.
- PORTARIA n.º 1130/97. **D.R. I Série B.** 258 (97-11-07) 6112-6113.
- RAGHAVAN, R.; JOSEPH, J. C. - Spectroscopic methods of analysis: ultraviolet and visible spectrophotometry. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 2nd ed. vol. 3. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 2558-2573.
- RAINSFORD, K. D. - NSAID gastropathy: novel physicochemical approaches for reducing gastric mucosal injury by drug complexation with cyclodextrins. **Drug Invest.** ISSN 0114-2402. 2:suppl.4 (1990) 3-10.
- RAJEWESKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 85:11 (1996) 1142-1169.
- RAO, C. T.; FALES, H. F.; PITHA, J. - Pharmaceutical usefulness of hydroxypropylcyclodextrins: "e pluribus unum" is an essential feature. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 7:6 (1990) 612-615.
- REDENTI, E.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. - Drug/Cyclodextrin/hydroxyl acid multicomponent systems. Properties and Pharmaceutical applications. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 89:1 (2000) 1-8.
- REDENTI, E.; SZENTE, L.; SZEJTLI, J. - Cyclodextrin complexes of salts of acidic drugs: thermodynamic properties, structural features, and pharmaceutical applications. **J. Pharm. Sci.** ISSN 0022-3549. 90:8 (2001) 979-986.

- RENFRO, W. H.; BURR, J. M.; RAWLINGS, D. J. - Criteria for use of indomethacin injection in neonates. **Clin. Pharm.** ISSN 0278-2677. 12 (1993) 232-234.
- RICHARDSON, D. - A woman with an extremely premature newborn. **J. Am. Med. Ass.** ISSN 0098-7484. 286:12 (2001) 1498-1505.
- ROMAGNOLI, C. [et al.] - Furosemide does not prevent indomethacin-induced renal side effects in preterm infants. **Clin. Pharmacol. Ther.** ISSN 0009-9236. 62:2 (1997) 181-186.
- SALSA, T. - **A Hidroxipropilmetilcelulose como polímero de matriz hidrófila em formas farmacêuticas orais de liberação controlada.** Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. 1998. Tese de Mestrado.
- SATOH, H. [et al.] - Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refeed rat. **Gastroenterology.** ISSN 0016-5085. 81:4 (1981) 719-725.
- SHAMAT, M. A. - The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 97 (1993) 1-13.
- SHARGEL, L.; YU A. B. C. - Biopharmaceutics. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 1. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2822-X. p. 156-176.
- SHIVAKUMAR, C.; JACOB, G. - Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. **Semin. Liver Diseases.** ISSN 0272-8087. 22:2 (2002) 169-183.
- SINGLA, A. K.; WADHWA, H. - Zinc-indomethacin complex: synthesis, physicochemical and biological evaluation in the rat. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 120 (1995) 145-155.
- SKELJO, M. V. [et al.] - Gastric mucosal damage induced by nonsalicylate nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats is mediated systemically. **Dig. Dis. Sci.** ISSN 0163-2116. 38:11 (1993) 2038-2042.
- SOMASUNDARAM, S. [et al.] - Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine. **Gut.** ISSN 0017-5749. 41:3 (1997) 344-353.
- STELLA, V. J. [et al.] - Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Adv. Drug Deliv. Rev.** ISSN 0169-409X. 36 (1999) 3-16.
- STELLA, V. J.; RAJEWSKI, R. A. - Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. **Pharm. Res.** ISSN 0724-8741. 14:5 (1997) 556-567.
- STEWART, C. F.; HAMPTON, E. M. - Therapy review: effect of maturation on drug disposition in pediatric patients. **Clin. Pharm.** ISSN 0278-2677. 6 (1987) 548-564.
- STRATTAN, C. E. - 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, part II: safety and manufacturing issues. **Pharm. Tech.** ISSN 0147-8087. 2 (1992) 52-58.
- SURYANARAYANAN, R.; RASTOGI, S. - X-ray powder diffractometry. In SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. - **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.** 2nd ed. vol. 3. New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN 0-8247-2823-8. p. 3005-3019. pp. 79-185.

- SUZUKI, T. [et al.] - Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of indomethacin in the rat. **Biol. Pharm. Bull.** ISSN 0918-6158. 20:4 (1997) 438-442.
- SZEJTLI, J. - Cyclodextrin inclusion complexes. In **Cyclodextrin Technology**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. ISBN 90-277-2314-1.
- SZEJTLI, J. - Cyclodextrins: properties and applications. **Drug Invest.** ISSN 0114-2402. 2:suppl.4 (1990) 11-21.
- SZEJTLI, J. - Cyclodextrins in drug formulations: part I. **Pharm. Tech. Int.** ISSN 0164-6826. 2 (1991a) 15-22.
- SZEJTLI, J. - Cyclodextrins in drug formulations: part II. **Pharm. Tech. Int.** ISSN 0164-6826. 3 (1991b) 16-24.
- SZEJTLI, J.; SZENTE, L. - Interaction between indomethacin and β -cyclodextrin. **Pharmazie**. ISSN 0031-7144. 36 H 10 (1981) 694-698.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. - Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and
- TAN, X.; LINDENBAUM, S. - Studies on complexation between β -cyclodextrin and bile salts. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 74 (1991) 127-135.
- TEIXEIRA-DIAS, J. J. C. - In **Espectroscopia molecular: fundamentos, métodos e aplicações**. Fundação Calouste de Gulbenkian. 1986. ISBN pp. 13-34.
- TOMIDA, H.; KUWADA, N.; KIRYU, S. - Hydrolysis of indomethacin in Pluronic F-127 gels. **Act. Pharm. Suec.** ISSN 0001-6675. 25 (1988) 87-96.
- THOMPSON, D. O. - Cyclodextrins - enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** ISSN 0743-4863. 14:1 (1997) 1-104.
- TÖTTERMAN, A. N. [et al.] - Intestinal safety of water-soluble β -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: effects on human intestinal epithelial caco-2 cells. **J. Pharm. Pharmacol.** ISSN 0022-3537. 49 (1997) 43-48.
- UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. - Modifications of drug release by cyclodextrin derivatives. In DUCHÊNE, D. - **New trends in cyclodextrins and derivatives**. Paris: Editions Santé, 1991. ISBN 2-86411-049-0. p. 409-446.
- UEKAMA, K.; IRIE, T. - New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical applications: cyclodextrin derivatives as new drug carriers. **Drug Invest.** ISSN 0114-2402. 2:suppl.4 (1990) 22-28.
- UEKAMA, K. [et al.] - Analysis of interfacial transfer and absorption behaviour of drugs following dissolution from β -cyclodextrin complexes. **Chem. Pharm. Bull.** ISSN 0009-2363. 31:10 (1983) 3637-3643.
- VEIGA, F. - **Complexos de inclusão com ciclodextrinas hidrófilas: caracterização físico-química e biofarmacêutica**. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 1996. Tese de doutoramento.
- VEIGA, F.; FERNANDES, C.; MAINCENT, P. - Influence of the preparation method on the physicochemical properties of tolbutamide/cyclodextrin binary systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** ISSN 0363-9045. 27:6 (2001) 523-532.

- VEIGA, F. [et al.] - Inclusion complexation of tolbutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** ISSN 0378-5173. 129 (1996) 63-71.
- VERT, P. [et al.] - Effectiveness and pharmacokinetics of indomethacin in premature newborns with patent ductus arteriosus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** ISSN 0031-6970. 18 (1980) 83-88.
- VROMANS, H.; SCHALKS, E. J. M. - Comparative and predictive evaluation of the stability of different freeze-dried formulations containing an amorphous moisture-sensitive ingredient. **Drug Dev. Ind. Pharm.** ISSN 0363-9045. 20:5 (1994) 757-768.
- WATKINS, J. B. et al - Bile-salt metabolism in the newborn: measurement of pool size and synthesis by stable isotope technique. **N. Eng. J. Med.** ISSN 0028-4793. 288:9 (1973) 431-433.
- WIEST, D. B. [et al.] - Population pharmacokinetics of intravenous indomethacin in neonates with symptomatic patent ductus arteriosus. **Clin. Pharmacol. Therap.** ISSN 0009-9236. 49:5 (1991) 550-557.
- WONG, J. [et al.] - Chronic gastric ulcer in the rat produced by wounding at the fundus-antral junction. **Gastroenterology.** ISSN 0016-5085. 71:3 (1976) 416-420.
- WRIGHT, K. C. - Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. **J. Vasc. Interv. Rad.** ISSN 1051-0443. 8:3 (1997) 363-373.
- YAZAN, Y.; SUMNU, M. - Improvement in the dissolution properties of theophylline with β -cyclodextrin. **S.T.P. Pharma Sci.** ISSN 1157-1489. 4:2 (1994) 128-132.
- YEH, T. F.; CARR, I. - Pharmacological closure of patent ductus arteriosus. In YEH, T. F. - **Neonatal Therapeutics.** St. Louis: Mosby Year Book, 1991. ISBN 0-8151-9758-3. p. 123-138.
- ZIMMERMAN, H. J. - Drug-induced liver disease. In **Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver.** 2nd ed. Philadelphia; Baltimore; New York; London: Lippincott Williams & Wilkins, 1999a. ISBN 0-7817-1952-6. p. 436-439.
- ZIMMERMAN, H. J. - Drugs to treat rheumatic/musculoskeletal disease. In **Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver.** 2nd ed. Philadelphia; Baltimore; New York; London: Lippincott Williams & Wilkins, 1999b. ISBN 0-7817-1952-6. p. 518-527.