

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

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO
ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA
NANOENCAPSULADO E DA
INDOMETACINA FORMADA *IN VIVO***

VITÓRIA BERG CATTANI

PORTO ALEGRE, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMACIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO
ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA
NANOENCAPSULADO E DA
INDOMETACINA FORMADA *IN VIVO***

Dissertação apresentada por **Vitória Berg
Cattani** para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a TERESA DALLA COSTA

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a ADRIANA R. POHLMANN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado/Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de março de 2007 pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Pedro E. Froëlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a Sílvia S. Guterres (UFRGS)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr Raul Evangelista
Universidade de São Paulo-Araraquara

C368a Cattani, Vitória Berg
Avaliação farmacocinética do éster etílico de indometacina nanoencapsulado e da indometacina formada in vivo / Vitória Berg Cattani – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xx, 127 p.: il., gráf., tab.

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

1. Indometacina. 2. Nanocápsulas. 3. Éster etílico de indometacina. 4. Farmacocinética. 5. Absorção intestinal. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Pohlmann, Adriana Raffin. III. Título.

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos financiada pela CAPES.

“A ciência não é, e nunca será, um livro terminado. Todo progresso importante levanta novas questões. Dificuldades novas e mais profundas são reveladas posteriormente a cada desenvolvimento.”

Einstein, *A Evolução da Física*, 1938.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Teresa Dalla Costa, pela orientação e paciência ao longo desse período, pela atenção, pelo apredizado e pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof^a. Adriana R. Pohlmann, pela atenção dispensada e pela co-orientação nesse trabalho.

À Daniela J. Conrado, pela amizade, compreensão e aconselhamentos. Pelos ensinamentos ao longo desse período, pela companhia nas noites mal dormidas, paciência e comprometimento, tornando essa etapa mais especial.

À Sandra E. Haas, pelo companheirismo nos momentos alegres e naqueles nem tanto, pela amizade e cumplicidade desenvolvidas ao longo desses dois anos.

À Clarissa Bettoni, à Bibiana Araújo e ao Rodrigo Freddo, pela incrível recepção no laboratório, pela amizade e pelos momentos de descontração e de aprendizado.

Aos amigos do laboratório 405: Eduardo Palma, Flávia Uchôa, Leandro Tasso, Cristófer Farias, Laura, Helen Pedroni, Cândice Felippi, Letícia G., Eliézer J., Alessandro J., Alessandra Badejo, Letícia Cruz, Karina, Nathali, Daniel, Manuela, Lali Ronsoni, Letícia Colomé, Michele Fraga, Fernanda Poletto, Maria, Leticia Sias, Renata Raffin, Gislane Domingues, Denise Jornada, Scheila Schaffazich, Clarissa Xavier, Irene, Francine, Francilene.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia e do Pós-Graduação, pela atenção e colaboração, especialmente à Rosilaine, pelo cuidado e dedicação dispensados aos animais utilizados nesse trabalho.

Aos professores Amélia Henriques e José Ângelo Zuanazzi, pela oportunidade de ingressar na pesquisa científica.

Aos meus pais, Elena e Homero, à minha irmã, Cristina, e à minha avó, Lucy, pela formação que me propiciaram, pelo carinho e pelo apoio.

Ao Raoni, pela compreensão, carinho e por estar sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO.....	11
3.1 INDOMETACINA E CICLOOXIGENASES.....	13
3.2 PRÓ-FÁRMACOS DE AINES.....	16
3.3 SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS E PENETRAÇÃO NO TRATO GASTRINTESTINAL	21
3.4 SISTEMAS CARREADORES DE AINES	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS	45
4.2 APARELHOS E EQUIPAMENTOS	45
4.3 SOLVENTES E OUTROS	46
4.4 MÉTODOS	47
4.4.1 <i>Preparação do éster etílico de indometacina</i>	47
4.4.2 <i>Preparação das nanocápsulas</i>	48
4.4.3 <i>Caracterização das suspensões de nanocápsulas</i>	49
4.4.3.1 Determinação do pH	49
4.4.3.2 Determinação do tamanho de partícula	49
4.4.4 <i>Metodologia analítica</i>	50
4.4.4.1 Adaptação da metodologia analítica	50
4.4.4.2 Preparação das amostras	51
4.4.4.3 Preparação das soluções da curva padrão.....	51
4.4.4.4 Validação da metodologia analítica	51
4.4.5 <i>Avaliação farmacocinética da indometacina e do éster etílico de indometacina</i>	53
4.4.5.1 Avaliação da recuperação de éster etílico de indometacina nanoencapsulado em sangue e plasma	53
4.4.5.2 Animais	53

4.4.5.3	Protocolo experimental	54
4.4.5.4	Avaliação do perfil de concentração plasmática <i>versus</i> tempo da IndOH e do IndOEt	57
4.4.5.5	Análise Estatística.....	61
4.4.5.6	Avaliação do local de absorção após administração oral de IndOEt nanoencapsulado	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	PREPARAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA.....	67
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	67
5.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE	68
5.3.1	<i>Seletividade</i>	68
5.3.2	<i>Linearidade</i>	71
5.3.3	<i>Exatidão</i>	74
5.3.4	<i>Repetibilidade e precisão intermediária</i>	75
5.3.5	<i>Limite de quantificação</i>	77
5.4	AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA NANOENCAPSULADO EM SANGUE E PLASMA.....	78
5.5	AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA INDOMETACINA E DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA	79
5.5.1	<i>Perfis plasmáticos de IndOH</i>	80
5.5.2	<i>Perfis plasmáticos de IndOEt e de IndOH formada in vivo</i>	86
5.5.2.1	Perfis plasmáticos obtidos após administração oral e intravenosa de IndOEt nanoencapsulado	86
5.5.2.2	Perfis plasmáticos obtidos após administração oral de IndOEt em suspensão aquosa.....	93
5.6	AVALIAÇÃO DO LOCAL DE ABSORÇÃO ORAL DE INDOEt NANOENCAPSULADO	100
6	CONCLUSÕES	107
7	REFERÊNCIAS	111
ANEXO 1	121
ANEXO 2	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da indometacina	13
Figura 2. Expressão diferencial das isoenzimas COX	15
Figura 3. Esquema de preparação do éster etílico de indometacina a partir da indometacina	35
Figura 4. Perfil cinético da hidrólise da indometacina e do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas	37
Figura 5. Perfis cinéticos de hidrólise alcalina de NC, NS e NE contendo IndOEt modelados por equação biexponencial	38
Figura 6. Aumento do volume das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NC-IndOEt e respectivos controles	39
Figura 7. Aumento do volume das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NS-IndOEt e respectivos controles	39
Figura 8. Aumento do volume das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NE-IndOEt e respectivos controles	40
Figura 9. Cromatogramas obtidos por análise por CLAE	70
Figura 10. Média das nove curvas padrão em plasma de IndOH empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação	72
Figura 11. Média das nove curvas padrão em plasma de IndOEt empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação	72
Figura 12. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração da dose de 10 mg/kg i.v.....	80

Figura 13. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg	84
Figura 14. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração i.v. <i>bolus</i> da dose de 5 mg/kg de IndOEt nanoencapsulado	87
Figura 15. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral de IndOEt nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg	91
Figura 16. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa contendo 1% de polissorbato 80	94
Figura 17. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo	97
Figura 18. Perfil de IndOH em plasma periférico, plasma da veia porta e em tecido hepático e baço após administração de IndOEt nanoencapsulado por via oral	102
Figura 19. Quantidade de IndOEt e de IndOH em diferentes porções do intestino delgado	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cinética de hidrólise de ésteres de AINEs a 37 °C e pH 7,4	18
Tabela 2. Parâmetros cinéticos da hidrólise de alguns pró-fármacos de indometacina e de naproxeno em diferentes meios à 37 °C	19
Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da indometacina livre, lipossomas convencionais e lipossomas de longa-circulação em ratos artríticos	27
Tabela 4. Área sob a curva de concentração de indometacina por tempo em vários tecidos de ratos artríticos, após administração i.v. de indometacina livre, lipossomas de indometacina e lipossomas de longa-circulação de indometacina	28
Tabela 5. Tamanho de partícula, pH e doseamento das nanocápsulas com indometacina e com seu éster etílico	35
Tabela 6. Composição da formulação de nanocápsulas de éster etílico de indometacina	49
Tabela 7. Protocolo experimental utilizado para a realização dos experimentos de farmacocinética	55
Tabela 8. Valores individuais de coeficiente de correlação e de intercepto e inclinação obtidos com as curvas padrão de IndOH avaliadas na validação	73
Tabela 9. Valores individuais de coeficiente de correlação e de intercepto e inclinação obtidos para as curvas padrão de IndOEt avaliadas na validação	74
Tabela 10. Valores de exatidão calculados para amostras de LIQ e controle de qualidade de IndOH e de IndOEt analisados por CLAE ao longo da validação	75
Tabela 11. Coeficiente de variação intradia e interdia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de IndOH em plasma de ratos	76
Tabela 12. Coeficiente de variação intradia e interdia das amostras de LIQ e de	

controle de qualidade de IndOEt em plasma de ratos	77
Tabela 13. Concentrações médias de éster etílico de indometacina e de indometacina formada em sangue e em plasma de ratos	79
Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH i.v. 10 mg/kg	81
Tabela 15. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental empregando modelo aberto de 2 compartimentos aos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH i.v. 10 mg/kg	83
Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH p.o. 10 mg/kg	85
Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral de IndOH 10 mg/kg	86
Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração i.v. <i>bolus</i> de IndOEt nanoencapsulado na dose de 5 mg/kg	88
Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados plasmáticos de IndOH formada <i>in vivo</i> pela administração i.v. <i>bolus</i> de IndOEt nanoencapsulado na dose de 5 mg/kg	90
Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg	92
Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos para IndOH por abordagem compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg	93
Tabela 22. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem	

não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa contendo 1% de polissorbato 8095

Tabela 23. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa contendo 1% de polissorbato 8096

Tabela 24. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo98

Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo 100

LISTA DE ABREVIATURAS

“a”	intercepto da fase de distribuição
“b”	intercepto da fase de eliminação
AINEs	antiinflamatórios não esteróides
ANOVA	análise de variância
ASC	área sob a curva
$ASC_{0-\infty}$	área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito
ASC_{0-t}	área sob a curva do tempo zero ao tempo “t”
C.V.	coeficiente de variação
CI_{50}	concentração inibitória média
CI	<i>clearance</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
C_{MAX}	concentração plasmática máxima
C_p	concentração plasmática
D	dose
D.P.	desvio padrão
DL_{50}	dose letal média
f	biodisponibilidade
i.v.	intravenoso
IndOEt	éster etílico de indometacina
IndOH	indometacina
K_{10}	constante de velocidade de eliminação do compartimento central
K_{12}	constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o periférico
K_{21}	constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o central

LIQ	limite inferior de quantificação
MRT	tempo de residência médio
MSC	critério de seleção do modelo
n	tamanho amostral
NC	nanocápsula/nanoencapsulado
NE	nanoemulsão
NS	nanoesfera
p.o.	per oros
pH _{aparente}	pH determinado em meio não-aquoso
PG	prostaglandina
R	resolução
t _{1/2}	tempo de meia-vida
t _{1/2α}	tempo de meia-vida da fase de distribuição (compartimental)
t _{1/2β}	tempo de meia-vida da fase de eliminação (compartimental)
t _{MAX}	tempo para atingir a concentração plasmática máxima
Vd _C	volume de distribuição do compartimento central
Vd _{SS}	volume de distribuição no <i>steady state</i>
α	constante de velocidade da fase de distribuição
β	constante de velocidade da fase de eliminação
λ	constante de velocidade de eliminação (análise não-compartimental)

RESUMO

Objetivos: Avaliar a farmacocinética do éster etílico de indometacina (IndOEt) em ratos Wistar, após sua administração oral (p.o) e intravenosa (i.v.) nas formas livre ou nanoencapsulada, e monitorar a formação de indometacina (IndOH) *in vivo*.

Metodologia: Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (2005478). Nanocápsulas (NC) contendo IndOEt (IndOEt-NC) foram administradas p.o. (10 mg/kg) e i.v. *bolus* (5 mg/kg) a ratos machos Wistar (n = 5 a 7/grupo) e as concentrações plasmáticas de IndOEt e IndOH resultantes foram determinadas por CLAE com detecção por UV, empregando-se metodologia validada. Os grupos controle foram tratados com suspensão aquosa de IndOEt (10 mg/kg), com ou sem polissorbato 80, ou com IndOH pelas vias i.v. ou p.o. (10 mg/kg) (n = 7 a 11/grupo). Os perfis plasmáticos individuais foram avaliados por abordagem não-compartimental e compartimental utilizando os *softwares* Excel[®] 2003 e Scientist[®] 2.01, respectivamente, para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, que foram comparados estatisticamente utilizando-se teste “t” de Student ou ANOVA ($\alpha = 0,05$). A avaliação do local de absorção p.o. de IndOEt-NC foi realizada pela quantificação de IndOEt e IndOH no plasma periférico e da veia porta, homogeneizado de fígado e de parede, bem como conteúdo, de porções do intestino delgado (n= 4/tempo) após a administração oral da formulação.

Resultados e Discussão: Após a administração de IndOEt-NC por ambas as vias, apenas a IndOH foi detectada, indicando uma rápida hidrólise do éster. Em todos os casos, o IndOEt não alterou os parâmetros farmacocinéticos da IndOH, exceto a biodisponibilidade. Os perfis plasmáticos de IndOH i.v. foram descritos pelo modelo de 2 compartimentos, e os orais, pelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem. A avaliação da absorção oral de IndOEt-NC evidenciou que o IndOEt é, provavelmente, liberado e hidrolisado ainda na luz do trato gastrointestinal, sendo a IndOH formada *in vivo* e absorvida. **Conclusões:** O IndOEt nanoencapsulado ou não, quando administrado pelas vias oral e i.v., é rapidamente convertido a IndOH. A IndOH é, portanto, responsável pela atividade antiedematogênica relatada para o IndOEt-NC.

UNITERMOS: indometacina, éster etílico de indometacina, nanocápsulas, farmacocinética, absorção intestinal.

ABSTRACT

PHARMACOKINETIC EVALUATION OF THE INDOMETHACIN ETHYL ESTER NANOENCAPSULATED AND OF THE INDOMETHACIN FORMED *IN VIVO*

Objective: To evaluate the pharmacokinetics of either nanoencapsulated (NC) or free indomethacin ethyl ester (IndOEt) after intravenous (i.v.) and oral (p.o.) administration to Wistar rats and to determine the pharmacokinetics of indomethacin (IndOH) formation. **Methodology:** Animal experiments were approved by UFRGS Ethics in Research Committee (# 2005478). The pharmacokinetics was investigated in male Wistar rats after oral and i.v. administration of IndOEt-NC (10 mg/kg and 5 mg/kg, respectively) (n = 5-7/group) and IndOEt and IndOH plasma concentrations were determined by a validated HPLC with UV detection method. The control groups were treated with IndOEt aqueous suspension (10 mg/kg p.o.) or with IndOH aqueous suspension by the p.o. or i.v. routes (10 mg/kg) (n = 7 -11/group). Non-compartmental and compartmental approaches were used for individual profiles analysis using Excel[®] 2003 or Scientist[®] 2.01 softwares, respectively. The site of IndOEt-NC oral absorption was investigated in peripheral and portal vein plasma, hepatic tissue, intestine epithelia, and lumen content (n = 4/time). **Results and Discussion:** After IndOEt administration by both routes, only IndOH was detected in plasma, suggesting a fast hydrolysis of the ester. The IndOH parameters after administration of IndOEt and IndOH were similar, except for the bioavailability. The pharmacokinetic parameters of IndOH were modeled by two compartment open model after i.v. dosing and by one compartment with first order absorption after oral administration. After oral administration, IndOEt-NC was converted in IndOH in the gastrointestinal tract and then absorbed as such. **Conclusions:** After i.v. and oral administration, either IndOEt-NC or the free drug is quickly converted in IndOH. After oral administration, IndOEt-NC is released and hydrolyzed to IndOH following its absorption at the gastrointestinal tract. Therefore, the IndOH is responsible for antiendematogenic activity reported for IndOEt-NC.

KEYWORDS: indomethacin, indomethacin ethyl ester, nanocapsules, pharmacokinetics, intestinal absorption.

A inflamação é uma resposta inespecífica do organismo caracterizada, em nível molecular, pela liberação de enzimas líticas pelos lisossomas, que promovem desnaturação protéica. A desnaturação protéica é seguida da síntese e liberação de substâncias intermediárias da lesão, responsáveis pelas manifestações do processo inflamatório agudo. Entre essas substâncias, as prostaglandinas desempenham importante papel. São formadas a partir do ácido araquidônico por ação das enzimas ciclooxigenases (COX) (WANNAMACHER e FERREIRA, 2004a).

O uso de fármacos antiinflamatórios esteróides ou antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) costuma ser indicado nos casos em que a morbidade da reação inflamatória supera os benefícios de regeneração tecidual proporcionados pela inflamação. Os antiinflamatórios esteróides interagem com receptores específicos no citoplasma das células e atuam no núcleo celular, modulando a expressão de genes que codificam citocinas e enzimas relacionadas com o processo inflamatório (SCHIMMER e PARKER, 2001). Os AINEs têm como mecanismo de ação a inativação da enzima ciclooxigenase, que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, substâncias mediadoras da inflamação e também relacionadas com a homeostase do organismo. Podem ser inibidores não seletivos, atuando sobre as isoformas COX-1 e COX-2, ou inibidores seletivos da COX-2, isoforma especialmente associada com o processo inflamatório (WANNAMACHER e FERREIRA, 2004a e b).

A aplicação terapêutica dos inibidores não seletivos das COX, entretanto, é limitada pela gravidade de seus efeitos adversos, como ulceração e sangramento gastrintestinal, disfunção hepato-renal e reações cutâneas (WANNAMACHER e FERREIRA, 2004b). É amplamente aceito que tais efeitos adversos sejam parcialmente mediados pela inibição da síntese de prostaglandinas. Além disso, a irritação tópica direta e a inibição da proliferação celular nas margens das úlceras, essencial para o reparo das mesmas, são outros mecanismos pelos quais os AINES exercem seus efeitos na mucosa gástrica. Esses efeitos adversos são mais importantes em tratamentos prolongados e podem levar à necessidade de substituição do fármaco usado (TOMISATO *et al.*, 2004).

A indometacina é um antiinflamatório não-esteróide do grupo dos ácidos indolacéticos. Apresenta importante atividade antiinflamatória, analgésica e

antipirética. É empregada principalmente em artrite reumatóide e outros tipos de artrite, incluindo gota. Em virtude de suas características físico-químicas (presença de grupamento ácido carboxílico na molécula e baixo pKa) e de sua atividade sobre ambas isoformas da COX, esse fármaco apresenta importantes efeitos gastrintestinais, além de atuar inibindo a agregação plaquetária e estar associado a toxicidade renal e a distúrbios do sistema nervoso central (ROBERTS II e MORROW, 2001).

Com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos da indometacina, tem sido proposta a esterificação ou amidação de seu grupamento ácido, a fim de reduzir a irritação da mucosa gástrica por ação local do fármaco (BONINA *et al.*, 1997; KALGUTKAR *et al.*, 2000a). Outro artifício seria a introdução do fármaco em sistemas carreadores, como lipossomas (SRINATH *et al.*, 2000), microesferas lipídicas (SRINATH e DIWAN, 1998) e nanopartículas (GÜRISOY *et al.*, 1989; AMMOURY *et al.*, 1993; GUTERRES *et al.*, 1995; CALVO, VILA-JATO e ALONSO, 1996; FAWAZ *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2001; POHLMANN *et al.*, 2002; RAFFIN *et al.*, 2003). Esses sistemas possibilitam a redução dos efeitos adversos, tanto por minimizar o contato do fármaco com a mucosa gástrica, como por proporcionar um direcionamento do fármaco para o local de ação, além de promover, em certos casos, o aumento da absorção no trato gastrintestinal (FAWAZ *et al.*, 1996; SRINATH e DIWAN, 1998).

Em virtude da potencialidade desses sistemas, o comportamento físico-químico de nanoesferas (NS), nanocápsulas (NC) e nanoemulsão (NE) foi investigado, empregando o éster etílico de indometacina como sonda. A análise dos dados de hidrólise alcalina interfacial do éster etílico de indometacina associado a sistemas coloidais demonstrou diferenças significantes entre as velocidades de reação para nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão. Assim, o éster etílico de indometacina foi considerado uma sonda adequada para esse tipo de estudo, uma vez que permitiu evidenciar diferenças entre os sistemas carreadores (SOARES, 2003; POHLMANN *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2006a).

Em continuidade ao estudo anterior, Cruz (2005 e 2006) utilizou o éster etílico de indometacina como modelo lipofílico de fármaco associado a nanocápsulas. Esse estudo evidenciou uma relação inversa entre a concentração de

polímero utilizada no preparo dos sistemas nanocarreadores e a velocidade de liberação da sonda. Além disso, foi possível observar que essa liberação apresentou duas fases: uma fase de liberação rápida e outra com liberação sustentada. Quando analisada a atividade do éster etílico de indometacina, associado a nanocarreadores, através do ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina, foi evidenciada a atividade antiedematogênica do composto na dose de 10 mg/kg para as formulações de nanocápsulas e nanoesferas administradas por via oral, com 62% de inibição do edema a partir da segunda hora após a administração de carragenina para as nanocápsulas e 104% de inibição do edema na primeira hora para as nanoesferas. Os resultados obtidos por Cruz (2005) com relação à estrutura das suspensões coloidais e à atividade antiedematogênica do éster etílico de indometacina nanoencapsulado sugerem que tal associação pode trazer vantagens na utilização da indometacina, reduzindo seus efeitos adversos locais e mantendo sua atividade terapêutica.

Deste modo, a compreensão da cinética de absorção e do processo de disposição (distribuição e eliminação) do éster etílico de indometacina nanoencapsulado, bem como a avaliação da formação *in vivo* de indometacina a partir deste são importantes para a caracterização do éster como pró-fármaco ou molécula ativa, auxiliando na determinação de sua atividade terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a farmacocinética do éster etílico de indometacina após a administração da substância livre e nanoencapsulada a ratos Wistar e monitorar a formação *in vivo* de indometacina.

2.2 Objetivos Específicos

- Adaptar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) desenvolvida por Pohlmann e colaboradores (2004) e validá-la para doseamento do éster etílico de indometacina e da indometacina formada a partir desse em plasma de ratos;
- Avaliar o perfil plasmático *versus* tempo do éster etílico de indometacina livre e nanoencapsulado e a formação de indometacina após a administração de dose única de 5 mg/kg pela via intravenosa (i.v.) e 10 mg/kg pela via oral (p.o.) a ratos Wistar e determinar os parâmetros farmacocinéticos;
- Comparar a farmacocinética da indometacina administrada isoladamente pelas vias i.v. e p.o. com a indometacina formada *in vivo* a partir do éster etílico;
- Investigar o local de formação da indometacina no trato gastrintestinal após a administração de seu éster etílico nanoencapsulado.

3.1 Indometacina e ciclooxigenases

A indometacina (Figura 1) é um fármaco derivado do ácido indolacético, pertencente à categoria dos antiinflamatórios não-esteróides (AINEs). Da mesma forma que outros AINEs, a indometacina apresenta potente ação antiinflamatória, além de ação analgésica e antipirética. É empregada em doenças inflamatórias reumáticas, sendo também indicada em situações não-inflamatórias, como doenças degenerativas das articulações (osteoartrite e espondilite anquilosante), cólicas, febre e dor de cabeça (ROBERTS II e MORROW, 2001).

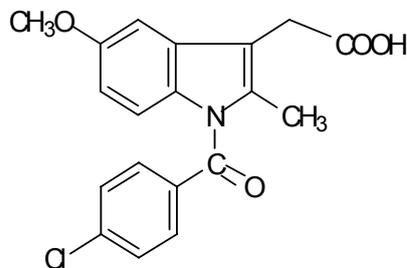


Figura 1: Estrutura química da indometacina.

Os efeitos dos AINEs em pacientes com artrite reumatóide são atribuídos à inibição da ativação leucocitária e adesão de leucócitos, função que parece ser independente da inibição da síntese de prostaglandinas. Entretanto, assim como outros AINEs, o uso da indometacina no tratamento de doenças reumáticas visa apenas o alívio dos sintomas, principalmente a dor e a inflamação, uma vez que inexistem tratamentos que possam ser considerados terapias definitivas, ou capazes de impedir as deformidades e a perda da função locomotora relacionadas com essas doenças (ROBERTS II e MORROW, 2001; WANNMACHER e FERREIRA, 2004b).

A atividade antiinflamatória da indometacina, bem como da maioria dos AINEs, parece ser mediada tanto pela inibição de ambas isoformas da COX, quanto pela inibição da migração dos neutrófilos (JACOBS e BIJLSMA, 1997; PESKAR, 2001).

A COX-1 é principalmente responsável pela síntese de prostaglandinas citoprotetoras no trato gastrointestinal e de tromboxanos pró-agregatórios (TXA₂) nas plaquetas do sangue. No trato gastrointestinal, as prostaciclina e PGE₂ reduzem a secreção ácida gástrica, exercem uma ação direta de vasodilatação nos vasos da mucosa gástrica e estimulam a produção de muco, que forma uma barreira protetora, assim como o bicarbonato duodenal. Nos rins, as prostaglandinas vasodilatadoras (prostaciclina, PGE₂ e PGD₂) exercem um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo renal, diminuindo a resistência vascular, dilatando o leito vascular renal e aumentando a perfusão do órgão. Sua inibição é associada aos efeitos adversos do tratamento com AINEs, como ulceração, sangramento e perfuração gástrica e intestinal (FITZGERALD e PATRONO, 2001; PATRONO, PATRIGNANI e RODRÍGUEZ, 2001; PATRIGNANI *et al.*, 2004).

A COX-2 tem como principal papel a biossíntese de prostaglandinas em células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, quando as mesmas são ativadas por estímulos inflamatórios ou patológicos. Entretanto, a COX-2 também vem sendo relacionada com o processo de resolução da inflamação. Em condições normais, é expressa em células endoteliais, onde produz a PGI₂, um agente protetor cardiovascular, que compensa com vasodilatação os efeitos de inibição da agregação plaquetária obtida pela inibição de COX-1. Também está presentes em osteoblastos, participando da remodelagem óssea, e no sistema nervoso central (Figura 2) (SUGIMOTO, NARUMIYA e ICHIKAWA, 2000; FIORUCCI e ANTONELLI, 2001; BERTOLINI, OTTANI e SANDRINI, 2001).

Em função de seu efeito inibitório sobre a COX-1, a indometacina apresenta importantes efeitos adversos, que são dose-dependente e restringem sua utilização a doenças inflamatórias severas, onde outras alternativas terapêuticas não são efetivas (ROBERTS II e MORROW, 2001). Sua toxicidade está relacionada principalmente ao trato gastrointestinal, onde pode provocar ulcerações e até mesmo perfurações e hemorragias. Tem sido descrito que não apenas a inibição das ciclooxigenases, mas também um efeito citotóxico direto independente das COX está envolvido com o desenvolvimento de lesões gastrointestinais (TOMISATO *et al.*, 2004). A inibição de prostaglandinas renais protetoras dos efeitos vasoconstritores de angiotensina e catecolaminas pode agravar disfunções renais preexistentes e causar insuficiência renal, tornando necessária a interrupção do tratamento para a

reversão do quadro clínico. Distúrbios do sistema nervoso central, como cefaléia, tonturas e confusão mental, também são associados ao uso de indometacina (ROBERTS II e MORROW, 2001; WANNMACHER e FERREIRA, 2004).

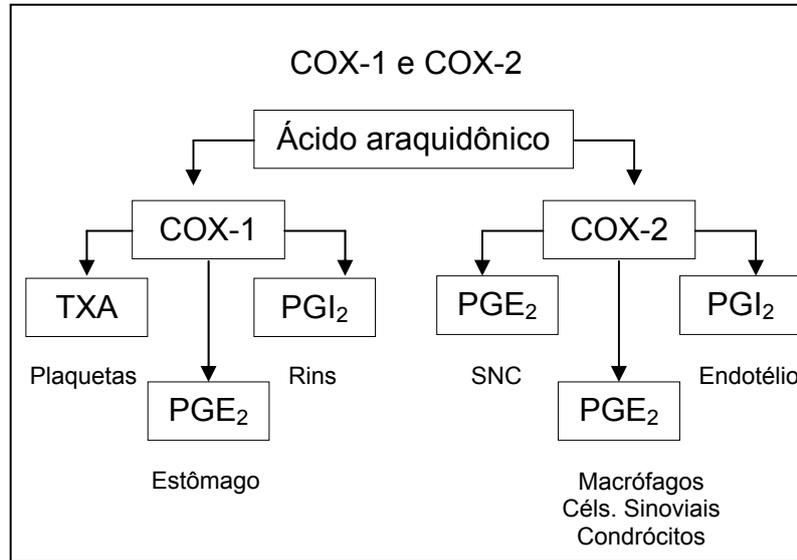


Figura 2. Expressão diferencial das isoenzimas COX (adaptado de FIORUCCI e ANTONELLI, 2001).

Considerando tais limitações, seu emprego no tratamento de doenças reumáticas tem sido questionável. Estudos indicam que alguns AINEs, como indometacina, ácido acetilsalicílico e outros inibidores da síntese de PGs, podem acelerar o processo de destruição da cartilagem em pacientes com osteoartrite, por inibição da síntese de proteoglicanos. Tal inibição mostrou estar associada com a inibição da síntese de PGs, em um estudo que verificou um efeito mais acentuado da indometacina na aceleração do estreitamento do espaço das articulações e na redução dos proteoglicanos, quando comparada a azapropazona, um inibidor mais fraco da síntese de PGs (RAINSFORD, 1999).

Uma avaliação da inibição da síntese de PGE₂ e do dano causado à mucosa gástrica por diversos AINEs administrados a ratos por via oral foi realizada por Navarro e colaboradores (1994). O estudo mostrou uma grande variabilidade na intensidade dos efeitos gastrintestinais provocados pelos AINEs avaliados, entretanto a indometacina e o piroxican causaram as lesões mais severas. Segundo os autores, tais variações poderiam ser explicadas com base nas diferentes ações

dos AINEs sobre a adesão leucocitária.

O impacto da inibição da COX pela indometacina na produção de citocinas foi investigado por Härtel e colaboradores (2004). Monócitos incubados com diferentes concentrações terapêuticas desse fármaco apresentaram aumento dose-dependente na expressão de fator de necrose tumoral e de interleucina-6. O estudo demonstrou que esse fármaco está associado com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a inibição da COX poderia ser crucial para a imunomodulação pró-inflamatória. A indometacina, na dose de 25 mg administrada por via oral, três vezes ao dia, também foi associada à redução na quimiotaxia e degranulação de leucócitos polimorfonucleares, bem como à degradação proteolítica de fibronectina, observados após quatorze dias de tratamento em estudo realizado com voluntários sadios (BARTON *et al.*, 2000).

3.2 Pró-fármacos de AINEs

Em decorrência da prevalência de efeitos adversos associados com o uso de AINEs não seletivos, especialmente relacionados à sua toxicidade gastrointestinal, pesquisas têm sido direcionadas para a redução da incidência e da severidade destes efeitos. Entre as estratégias empregadas estão a redução do contato do fármaco com a mucosa gástrica, a utilização de medicamentos que minimizem os efeitos adversos, o emprego de pró-fármacos ou de inibidores seletivos da COX-2 (JACOBS e BIJLSMA, 1997; KALGUTKAR *et al.*, 2000a; KALGUTKAR *et al.*, 2000b).

Os candidatos a pró-fármacos, além da redução da toxicidade gastrointestinal e da manutenção das atividades antiinflamatória e analgésica, devem apresentar uma boa estabilidade em solução aquosa e no fluido gastrointestinal, para mascarar temporariamente o grupo ácido antes de ser absorvido pela via oral, uma solubilidade e lipofilia adequadas para possibilitar uma maior absorção, e uma grande susceptibilidade à hidrólise no plasma, para liberar o fármaco ativo após a absorção. Além disso, o grupo liberado com a hidrólise do pró-fármaco deve apresentar baixa toxicidade sistêmica (VENUTI *et al.*, 1989; SMITH e CLARK, 1998).

Com a finalidade de amenizar os efeitos tóxicos da indometacina, tem sido proposta a esterificação ou amidação de seu grupamento ácido, reduzindo a irritação da mucosa gástrica por ação local do fármaco. A fim de avaliar as propriedades antiinflamatórias, analgésicas e de toxicidade gastrointestinal de derivados de AINEs ácidos, Venuti e colaboradores (1989) sintetizaram uma série de ésteres e tioésteres ω -(*N,N,N*-trialquilamônio)alquílicos de naproxeno, cetorolaco, indometacina, ibuprofeno, sulindaco, cetoprofeno, ácido flufenâmico, ácido mefenâmico, zomepiraco, etodolaco e tifuraco. Os pró-fármacos foram classificados em três categorias gerais, de acordo com as atividades apresentadas. Um grupo foi composto por derivados de cetoprofeno e zomepiraco, que mantiveram os níveis de atividade e de efeitos adversos. Esses derivados não foram considerados pró-fármacos pelos autores, uma vez que não apresentaram vantagens em relação aos seus precursores, provavelmente devido a uma rápida conversão por hidrólise. Outro grupo incluiu os derivados que apresentaram uma redução de todas as atividades avaliadas, como os ésteres e tioésteres de sulindaco e de ácido mefenâmico. Esse comportamento indicou que os derivados não foram eficientemente hidrolizados, sendo pouco absorvidos como tal, ou sendo sujeitos à distribuição metabólica alternativa. O terceiro grupo incluiu os derivados que exibiram um perfil alternativo de atividade em relação aos fármacos precursores, podendo ser considerados pró-fármacos potenciais. Os ésteres e tioésteres desse grupo, derivados de indometacina, ácido flufenâmico e etodolaco, mantiveram a atividade antiinflamatória e apresentaram uma menor tendência de provocar erosão gastrointestinal, mas apresentaram redução das propriedades analgésicas em relação aos fármacos precursores. Esse perfil, provavelmente, é devido a uma alteração no modo de liberação do fármaco ativo, por uma mudança do local de absorção ou uma lenta liberação no plasma após absorção. Nesse caso, entretanto, a irritação local devido ao fármaco precursor parece ter sido minimizada. As alterações observadas podem ser devido a mudanças na absorção ou no metabolismo dos pró-fármacos em relação a seus precursores, resultando na liberação da substância ativa de uma maneira que reduza tanto a irritação local, quanto a erosão gastrointestinal sistêmica. Este perfil pode ser devido a combinações de fatores, incluindo taxa de hidrólise dos ésteres (Tabela 1) no estômago, intestino e plasma, mudança do local de absorção do pró-fármaco ou do próprio fármaco, e padrões de metabolização alternativos.

Tabela 1. Cinética de hidrólise de ésteres de AINEs a 37 °C e pH 7,4 (adaptado de VENUTI *et al.*, 1989).

Derivado	$k_{\text{obs}} \times 10^6 \text{ (seg}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$
Éster ω -(<i>N,N,N</i> -trialquilamônio)alquílico de naproxeno	2,37	82
Tioéster ω -(<i>N,N,N</i> -trialquilamônio) alquílico de aproxeno	1,65	117
Éster ω -(<i>N,N,N</i> -trialquilamônio) alquílico de naproxeno	0,16	1260
Tioéster ω -(<i>N,N,N</i> -trialquilamônio) alquílico de etorolaco	61,1	3,2
Tioéster ω -(<i>N,N,N</i> -trialquilamônio) alquílico de indometacina	1,49	129

Tammara e colaboradores (1993) sintetizaram ésteres morfolino-alquílicos de indometacina e de naproxeno, visando obter pró-fármacos com propriedades físico-químicas diferentes desses fármacos e com alta taxa de bioconversão enzimática. Nesse estudo, os autores obtiveram derivados com pKa em torno de 8,62 e com características de lipofilia mais acentuadas, principalmente em pH 7,4, relacionadas com o tamanho da cadeia carbônica. Um aumento na cadeia carbônica originou pró-fármacos mais estáveis em pH 7,4, mas menos estáveis em pH 1,3 (Tabela 2), fenômeno atribuído a uma mudança no estado de transição e um efeito indutivo adicional, facilitando a hidrólise. Os ésteres butilmorfolínicos de naproxeno e de indometacina mostraram-se solúveis e suficientemente estáveis no trato gastrointestinal, apresentando biodisponibilidade oral 30 a 36% maior do que os próprios fármacos em ratos. Além disso, mostraram-se menos irritantes ao trato gastrointestinal do que os fármacos em questão, quando administrados pela via oral a ratos, tanto em dose única quanto cronicamente.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da hidrólise de alguns pró-fármacos de indometacina e de naproxeno em diferentes meios à 37 °C (adaptado de TAMMARA *et al.*, 1993).

Derivado	k_{obs} (h ⁻¹) ^a	$t_{1/2}$ (h) ^a	k_{obs} (h ⁻¹) ^b	$t_{1/2}$ (h) ^b	k_{obs} (h ⁻¹) ^c	$t_{1/2}$ (h) ^c
Éster etilmorfolínico de naproxeno	0,0103	67,3	0,057	12,16	0,423	1,64
Éster propilmorfolínico de naproxeno	0,0258	26,86	$9,9 \times 10^{-3}$	70,00	0,169	4,10
Éster butilmorfolínico de naproxeno	0,0261	26,35	$4,7 \times 10^{-3}$	147,4	0,601	1,15
Éster etilmorfolínico de indometacina	0,0103	66,79	0,056	12,38	0,029	23,9
Éster propilmorfolínico de indometacina	0,0281	24,66	0,034	20,38	0,022	31,5
Éster butilmorfolínico de indometacina	0,0303	22,85	0,0227	30,53	0,034	20,4

^a em fluido gástrico simulado pH 1,3; ^b em tampão fosfato pH 7,4; ^c em plasma de rato.

Considerando que a esterificação de antiinflamatórios ácidos contribui para a redução de sua gastrotoxicidade, Ogiso e colaboradores (1994) produziram o éster octílico de indometacina e avaliaram sua farmacocinética. Após administração intravenosa, as concentrações plasmáticas do éster caíram rapidamente, indicando uma rápida hidrólise da ligação éster e uma rápida eliminação do mesmo. A administração oral do éster produziu concentrações mais baixas de indometacina, sugerindo uma baixa absorção do pró-fármaco ou um grande volume de distribuição, o que foi confirmado pelas altas concentrações do pró-fármaco encontradas no fígado. Os autores propuseram um modelo de quatro compartimentos para explicar a disposição do pró-fármaco no organismo, onde o éster parece se distribuir amplamente.

A farmacocinética e a eficácia do éster trietilenoglicólico de indometacina foram avaliadas em ratos após administração por via oral (BONINA *et al.*, 1996). O éster (20 mg/kg) apresentou perfil farmacocinético diferente da indometacina (dose de 5 mg/kg), proporcionando concentrações baixas, mas prolongadas do fármaco

(até 24 h). Tal propriedade foi atribuída a uma baixa e lenta absorção do éster no trato gastrointestinal ou a um elevado volume de distribuição do mesmo, com retorno lento à corrente circulatória. Apesar das baixas concentrações de fármaco obtidas, a resposta farmacológica, após a administração oral do éster a ratos com edema na pata, foi similar à resposta obtida com a administração da própria indometacina. Entretanto, a administração do éster não foi associada a efeitos ulcerogênicos nos animais estudados, sugerindo uma proteção da mucosa do trato gastrointestinal proporcionada pelo pró-fármaco.

A substituição do grupamento clorobenzoíla da indometacina pelo grupamento 4-bromobenzila e a extensão da cadeia lateral do grupo ácido foi investigada por Black e colaboradores (1996), a fim de desenvolver inibidores seletivos da COX-2. Os autores basearam-se na hipótese de que, aumentando o tamanho da molécula de indometacina, poderiam ser obtidas moléculas incapazes de interagir com o sítio ativo da COX-1, por serem muito volumosas, mas ainda capazes de interagir com o sítio ativo da COX-2. Dentre as diversas modificações testadas na molécula de indometacina, o grupamento benzila com o substituinte bromo na posição 4 foi o que apresentou maior seletividade sobre a COX-2. Os autores identificaram os ácidos *N*-benzil indolalcanóicos como potentes agentes antiinflamatórios, proporcionando maior segurança gastrointestinal em relação aos AINEs convencionais.

Bonina e colaboradores (1997) estudaram o potencial uso de ésteres 1-etilazacicloalcan-2-ônicos de indometacina, preparados a partir da esterificação do grupo ácido do fármaco com 2-pirrolidona e caprolactama, como pró-fármacos para administração por via oral. Foram avaliadas sua estabilidade em diferentes meios, atividades antiinflamatória e analgésica e toxicidade gastrointestinal. Ambos os ésteres apresentaram boa estabilidade em solução aquosa e em fluido gastrointestinal e rápida hidrólise em plasma, caracterizando-se como pró-fármacos de indometacina. Com relação a seus perfis farmacodinâmicos, os ésteres mantiveram as atividades antiinflamatórias e analgésicas da indometacina, reduzindo seus efeitos de irritação à mucosa gástrica.

Ainda com a intenção de utilizar AINEs não seletivos como precursores para moléculas inibidoras seletivas da COX-2, Kalgutkar e colaboradores (2000b)

produziram derivados ésteres e amidas de indometacina. Os derivados foram, então, avaliados com relação a sua capacidade de inibição seletiva da isoenzima COX-2 em relação à COX-1. Os resultados mostraram que ésteres e amidas alquílicos, arílicos e heterocíclicos relativamente grandes exibiram alta potência e com seletividade de até 1700 vezes para a isoforma COX-2. Entre os ésteres de indometacina de cadeia curta produzidos, o éster etílico de indometacina apresentou IC_{50} de 0,10 μM para a COX-2 e de mais de 66 μM para a COX-1, com uma seletividade de 700 vezes para a COX-2, enquanto a indometacina apresentou valores de IC_{50} de 0,75 e 0,05 μM para a COX-2 e COX-1 respectivamente. Alguns derivados, como *N*-(4-acetamidofenil)-1-*p*-clorobenzoil-5-metóxi-2-metilindil-3-acetamida e indometacina 2-fenetilamida, foram avaliados *in vivo*, em ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina, e *in vitro*, em experimento de metabolismo microsomal. Considerando o tempo transcorrido para a observação da atividade antiinflamatória dos derivados testados e a análise dos metabólitos gerados *in vitro* pelo sistema microsomal hepático, a atividade antiinflamatória dos mesmos deve ser devida aos derivados e não à indometacina produzida por sua hidrólise. Dessa maneira, segundo os autores, a produção de derivados de AINEs, principalmente amidas, pode ser considerada uma abordagem muito útil no desenvolvimento de novos inibidores seletivos da COX-2.

3.3 Sistemas carreadores de fármacos e penetração no trato gastrointestinal

A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada com sua concentração no sítio de ação. Como a distribuição das moléculas no organismo está diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, a associação de fármacos a sistemas carreadores tem sido considerada uma alternativa, visando o controle de sua distribuição no organismo (COUVREUR *et al.*, 2002).

Lipossomas e microesferas lipídicas têm sido estudados como carreadores de fármacos, uma vez que apresentam propriedades biodegradáveis, não-imunogênicas e apresentam a capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos

quanto lipofílicos. As microesferas lipídicas apresentam a vantagem de ser relativamente mais estáveis que os lipossomas. Os lipossomas têm despertado interesse, em virtude da proteção oferecida aos fármacos que podem estar contidos em seu núcleo e também em sua membrana fosfolipídica. Entretanto, os mesmos têm mostrado baixa eficiência de encapsulação, especialmente de substâncias lipofílicas, baixa estabilidade quando armazenados e rápida liberação de fármacos hidrossolúveis na corrente circulatória (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Muitas das aplicações dos lipossomas são baseadas no fato de que tais sistemas são amplamente captados pelas células do sistema fagocitário mononuclear. Entretanto, o carreamento de fármacos em lipossomas para outras células que não do sistema fagocitário mononuclear é dificultado, uma vez que tais sistemas são freqüentemente eliminados da circulação, antes que alcancem os alvos no espaço extravascular ou intravascular (SRINATH *et al.*, 2000). Métodos de modificação de superfície, tais como o revestimento da vesícula com tensoativos (polissorbato 80 e lauril éteres) ou polímeros hidrofílicos (polietilenoglicol e quitosana) e o uso de co-polímeros com segmentos hidrofílicos, podem impedir estericamente a interação com proteínas, mantendo por mais tempo os lipossomas na circulação. Carreadores com sua superfície modificada, conforme descrito, são chamados de furtivos ou de longa circulação em função da proteção que apresentam em relação à opsonização (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Nanopartículas podem ser definidas como sistemas coloidais submicrométricos, com tamanho de partícula entre 10 e 1000 nm (COUVREUR *et al.*, 2002). Podem ser usadas, visando o carreamento do fármaco ao tecido alvo, a liberação sustentada do fármaco no tecido alvo, o aumento da biodisponibilidade oral, a solubilização de fármacos para administração parenteral e o aumento da estabilidade dos agentes terapêuticos frente à degradação enzimática (RAO *et al.*, 2004). Diferentemente das micropartículas, as nanopartículas podem ser administradas por via intravenosa. A administração por essa via é possível quando as partículas são menores do que 5 μm , diâmetro dos capilares do organismo, e não propiciam a formação de agregados, a fim de garantir que não causem embolia (HANS e LOWMAN, 2002). Entretanto, quando administradas por essa via, a superfície hidrofóbica da maioria das nanopartículas determina a sua adsorção por proteínas (opsonização) e posterior fagocitose por células do sistema imune.

Métodos de modificação de superfície de nanopartículas, similares aos empregados com lipossomas, têm sido empregados para evitar a opsonização e a conseqüente fagocitose (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Incluídas no conceito de nanopartículas estão as nanoesferas e as nanocápsulas. As últimas são sistemas vesiculares em que o fármaco está confinado em um núcleo, geralmente de caráter oleoso, cercado por um invólucro polimérico simples. Entretanto, dependendo das propriedades físico-químicas do fármaco e da composição das nanocápsulas, o fármaco, além de ser incluído na cavidade central, pode ser adsorvido na superfície das nanocápsulas. Nas nanoesferas, formadas por uma matriz polimérica, o fármaco está disperso no polímero ou adsorvido nas partículas (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Óleos vegetais, tais como óleo de soja, ou triglicerídeos obtidos por semi-síntese com cadeias médias e longas de ácidos graxos, como Miglyol[®] ou Panasate[®], são os mais usados como núcleo oleoso. Polímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis, tais como poli(cianoacrilato de alquila) e poli(lactídeo), têm sido utilizados como substâncias poliméricas da camada interfacial. Uma vez que as características de superfície podem ser modificadas pela seleção de um polímero apropriado para o revestimento, as nanocápsulas têm atraído muita atenção como um sistema coloidal carreador de fármacos (NISHIOKA e YOSHINO, 2001).

Uma das vantagens do uso de nanocápsulas é o confinamento do fármaco na cavidade central, proporcionando uma liberação mais controlada, evitando o contato do fármaco com tecidos e, portanto, reduzindo a irritação sobre o local de administração, além de proteger o fármaco da degradação após a administração (COUVREUR *et al.*, 2002; HANS e LOWMAN, 2002).

O tamanho e a carga de superfície também são cruciais para a absorção de nanopartículas quando administradas por via oral. Nesses casos, estão identificadas três rotas possíveis para a absorção desses sistemas: através das células M, através dos enterócitos e por rotas paracelulares (FLORENCE, 1997). A absorção também pode se dar por processo de bioadesão da nanopartícula ao epitélio gastrointestinal seguido de difusão da substância associada ao sistema, processo

favorecido para nanopartículas anfifílicas, com maior atividade de superfície. A bioadesão pode ser obtida por interações inespecíficas com a superfície da mucosa, sendo determinadas por propriedades físico-químicas das partículas e das superfícies, e por interações específicas, em que um ligante na superfície da partícula é usado para reconhecimento e adesão a um sítio específico da superfície da mucosa (PONCHEL e IRACHE, 1998).

As placas de Peyer são estruturas intestinais caracterizadas pela presença de um folículo, cercado por linfócitos B. Uma mistura de linfócitos, macrófagos e células dendríticas é encontrada no topo do folículo voltada para o lúmen intestinal. Os folículos são revestidos por uma espécie de epitélio especializado responsável pela produção de muco que possibilita uma estreita interação das partículas antigênicas. Também estão distribuídas esparsas células M, células especializadas de origem epitelial que apresentam intensa atividade fagocitária. A sua característica mais relatada é o transporte por fagocitose de uma ampla variedade de material inerte do lúmen intestinal até os folículos, de onde as partículas podem migrar para a circulação via nódulos mesentéricos e ductos linfáticos torácicos (HUSSAIN, JAITLEY e FLORENCE, 2001). A absorção de um sistema nanoparticulado via tecido linfóide adjacente apresenta a vantagem de evitar o metabolismo hepático de primeira passagem (HANS e LOWMAN, 2002).

Le Ray e colaboradores (1994) demonstraram que 1,3% das nanopartículas de 134 nm de diâmetro, preparadas com (^{14}C)poli(DL-lactídeo-co-glicolídeo) e administradas p.o. em camundongos atravessaram a barreira intestinal intactas em 4 h e que tal absorção foi aumentada quando da administração concomitante de leite concentrado, que estimularia a absorção linfática dos carreadores. A presença de radioatividade no fígado foi atribuída à captura das nanopartículas por macrófagos do sistema fagocitário, assim como na administração pela via i.v., em que 83% da radioatividade foi observada 4 h após a administração.

A avaliação da captura de micropartículas de látex fluorescentes (1,82 μm de diâmetro) pela mucosa intestinal e da passagem através dela após administração por via oral em ratos demonstrou que as mesmas alcançam os linfonodos mesentéricos em todos os tempos avaliados (5,15 e 30 minutos após a administração). As micropartículas foram encontradas em maior número nas porções

iniciais do intestino, embora sua quantidade tenha aumentado com o tempo em regiões distais do intestino que apresentam placas de Peyer. Assim, os autores propõem que a absorção observada em 5 min envolva a captura por enterócitos ou células produtoras de muco e a translocação pelo estroma da mucosa, com envolvimento de vasos linfáticos. Entretanto, nos outros tempos avaliados, foi considerada evidente a participação das regiões que apresentam placas de Peyer (HAZZARD, 1996).

A captura de nanopartículas de poliestireno (60 nm) com os tensoativos poloxâmero 188 e 407 adsorvidos foi estudada em ratas após a administração p.o. por 5 dias (HILLERY e FLORENCE, 1996). Os intestinos delgado e grosso foram divididos em regiões com ou sem tecido linfóide. A adsorção das nanopartículas com os tensoativos aparentemente inibiu a captura das mesmas pelo intestino delgado. No intestino grosso, a captura foi menor que 10% do valor obtido com as nanopartículas sem tensoativos adsorvidos. Essa redução evidencia, segundo os autores, que partículas hidrofóbicas são capturadas em maior extensão do que partículas hidrofílicas.

Lipanussorn, Simon e Dayan (1998), avaliando o transporte transepitelial de partículas de látex de poliestireno fluorescente (2 µm de diâmetro) quando administradas p.o., demonstraram que, 60 min após a administração, as partículas alcançaram o compartimento subepitelial tanto via placas de Peyer quanto por regiões de vilosidades do intestino delgado.

A captura de nanopartículas de polimetil-(2¹⁴C)-metacrilato de 130 nm pelo trato gastrintestinal, após a administração p.o. a ratos, foi avaliada pela quantidade de radioatividade em diferentes tecidos, demonstrando uma captura em torno de 10% da dose nas paredes do trato gastrintestinal (ARAUJO *et al.*, 1999). A utilização de tensoativos no veículo das nanopartículas, especialmente polissorbato 80 (5%) em salina, aumentou sua absorção, ao contrário do relatado por Hillery e Florence (1996). Com relação ao mecanismo de absorção proposto, até 10 min o transporte intercelular no jejuno seria mais proeminente, o que explicaria o rápido aparecimento da radioatividade no sangue e nos tecidos. No íleo, as partículas passariam principalmente através das células M e das placas de Peyer, resultando na sua presença no espaço intercelular nas proximidades dos linfonodos. Os autores não

descartaram, em uma menor extensão, a absorção normal pelo tecido intestinal.

Um estudo comparativo da captura *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas com propriedades bioadesivas específicas e sem tal propriedade foi realizado por Behrens e colaboradores (2002). Nanopartículas de poliestireno (hidrofóbico) apresentaram maior associação com culturas de células Caco-2, mas quando avaliadas em cultura de células intestinais secretoras de muco, a interação com as células foi muito reduzida. Nanopartículas com quitosana, entretanto, apresentaram uma associação com o muco bastante aumentada, devido a interações eletrostáticas. Tais resultados foram confirmados quando essas nanopartículas foram administradas pela via intra-duodenal em ratos, demonstrando que as de quitosana eram captadas tanto por células epiteliais quanto por placas de Peyer, sendo essa captação maior no jejuno e no íleo do que no duodeno.

3.4 Sistemas carreadores de AINEs

Sabe-se que a vasopermeabilidade aumenta durante o processo inflamatório, pela participação de mediadores responsáveis por afastar as *gap junctions* entre células endoteliais adjacentes no nível de vênulas pós-capilares. Nessas situações, as *gap junctions* parecem estar suficientemente espassadas para possibilitar o extravasamento de partículas coloidais na faixa de 0,2 μm , fazendo das nanopartículas promissores carreadores de fármacos para o sítio da inflamação (SHOJI *et al.*, 1986).

Estudando a farmacocinética de indometacina associada a lipossomas e a lipossomas de longa-circulação (furtivos) em ratos artríticos, Srinath e colaboradores (2000) observaram que os lipossomas convencionais foram avidamente captados por órgãos do sistema fagocitário mononuclear como fígado e baço. Mesmo os lipossomas anfífilicos, em função da presença do poli(etilenoglicol), ainda foram captados por tais órgãos, porém em menor proporção. Os autores visavam uma menor captura dos lipossomas com poli(etilenoglicol) pelo fígado e baço, para que se mantivessem na circulação sistêmica. Dessa maneira, estariam sujeitos ao extravasamento para os tecidos inflamados e seria reduzida a localização dos

lipossomas em órgãos associados à toxicidade do fármaco. O estudo possibilitou determinar que o *clearance* do fármaco em lipossomas de longa-circulação foi mais lento do que em lipossomas convencionais. Esse fato foi atribuído à uma maior estabilidade *in vivo* desses sistemas, alcançada pelas propriedades de barreira do poli(etilenoglicol), o que reduziu a liberação do fármaco pelos lipossomas e a interação desses com componentes do plasma (Tabela 3). A associação da indometacina com os lipossomas furtivos também proporcionou uma diminuição mais acentuada das concentrações de fármaco no cérebro e nos rins, órgãos associados com toxicidade, quando comparada com os lipossomas convencionais. A associação da indometacina aos lipossomas proporcionou maiores concentrações do fármaco no tecido inflamado, especialmente no caso dos lipossomas furtivos, sugerindo que esses sistemas poderiam estar extravasando através das *gap junctions* endoteliais próximas do sítio da inflamação (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos da indometacina livre (IndOH), em lipossomas convencionais (L IndOH) e em lipossomas de longa-circulação (S-L IndOH) em ratos artríticos (dose = 12 mg/kg) (média ± desvio padrão) (adaptado de SRINATH *et al.*, 2000).

Parâmetros	IndOH	L IndOH	S-L IndOH
AUC _{0-t} (µg/mL/h)	490,95 ± 31,28	528,78 ± 56,34	1454,62 ± 92,85
Tempo de meia-vida (h)	10,28 ± 0,25	16,65 ± 0,72	25,42 ± 4,32
<i>Clearance</i> (mL/h)	4,20 ± 0,33	2,95 ± 0,38	0,82 ± 0,15
MRT (h)	13,27 ± 0,49	23,76 ± 0,92	36,36 ± 6,25

Tabela 4. Área sob a curva de concentração de indometacina por tempo em vários tecidos de ratos artríticos, após administração i.v. de indometacina livre (IndOH), lipossomas de indometacina (L IndOH) e lipossomas de longa-circulação de indometacina (S-L IndOH) (adaptado de SRINATH *et al.*, 2000).

Tecido	AUC _{0-∞} (µg/mL/h)		
	IndOH	L IndOH	S-L IndOH
Fígado	550,36	2447,33	1211,93
Baço	153,25	6280,49	2806,15
Rim	1199,67	336,71	236,49
Pulmão	202,22	542,72	335,73
Cérebro	54,84	17,15	8,66
Pata	0,87	13,12	28,01

Em 1998, Shrinath e Diwan haviam avaliado microsferas lipídicas de indometacina quanto a sua farmacodinâmica e farmacocinética, visando à redução dos efeitos adversos associados ao tratamento com esse fármaco. A indometacina associada a microsferas lipídicas mostrou-se mais efetiva em relação ao fármaco livre, quando administrada a ratos com edema de pata induzido por carragenina. Os autores atribuíram esse aumento na efetividade a uma possível acumulação das micropartículas no tecido edematoso, ocasionada pelo aumento da permeabilidade vascular nesse local. No estudo farmacocinético, as concentrações de indometacina no plasma foram inicialmente menores para o sistema coloidal em relação ao fármaco livre, o que pode ser atribuído à rápida captação do fármaco associado por sítios inflamatórios e por órgãos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear. Com relação à distribuição tecidual, no cérebro e nos rins, órgãos associados com efeitos tóxicos do fármaco, os níveis de indometacina associada às microsferas lipídicas foram menores em relação aos do fármaco livre. Esse resultado foi atribuído ao tamanho dos sistemas coloidais empregados, responsável por restringir a localização do fármaco nesses órgãos. No fígado, no baço e nos pulmões foi evidenciado um aumento na acumulação do fármaco quando associado às microsferas lipídicas. No tecido inflamado, os níveis do fármaco também foram

maiores com a associação ao sistema coloidal, refletindo o potencial desses sistemas como carreadores de fármacos para o tratamento de condições inflamatórias, bem como para doenças envolvendo o sistema fagocitário mononuclear e os pulmões.

Avaliando a biodistribuição de microesferas lipídicas de indometacina revestidas por poli(etilenoglicol) em ratos artríticos, Palakurthi, Vyas e Diwan (2005) observaram uma redução do *clearance* do fármaco, das concentrações no cérebro e rins e da captação pelo fígado, contribuindo para um prolongamento do tempo de circulação das partículas e para uma maior disponibilidade para a extravasacularização para o tecido inflamado. A lenta taxa de distribuição das micropartículas para órgãos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear e a lenta liberação do fármaco a partir das microsferas são as prováveis razões das alterações nos parâmetros farmacocinéticos da indometacina quando associada a esses carreadores. Tais alterações reafirmam a vantagem do uso de micropartículas lipídicas revestidas como carreadoras de fármacos antiinflamatórios, melhorando o perfil farmacodinâmico dos mesmos.

A utilização de nanopartículas como carreadores de AINEs também tem sido amplamente explorada. Em especial, a associação da indometacina a esses sistemas é de grande interesse, uma vez que se trata de um fármaco com elevada potência, mas com uso limitado em virtude de sua toxicidade, principalmente gastrointestinal. Uma série de estudos têm sido realizados visando o aumento da biodisponibilidade por diferentes vias de administração, a redução dos efeitos adversos e a manutenção do efeito farmacológico da indometacina associada a nanopartículas.

A estabilidade física e as atividades antiinflamatórias e sobre a agregação plaquetária de nanocápsulas de cianoacrilato de *iso*-butila contendo indometacina foram avaliadas por Gürsoy e colaboradores (1989). Com relação à estabilidade física, as suspensões de nanocápsulas estocadas à temperatura ambiente por 12 meses apresentaram perda de 17,5% no teor de indometacina associada. Quando essas suspensões foram armazenadas a 4 °C e a -30 °C pelo mesmo período, não foi verificada perda de fármaco pelos sistemas. No caso das suspensões armazenadas à temperatura ambiente após secagem por liofilização, a perda de

indometacina associada aos sistemas após 6 meses foi de 50,5%; quando armazenadas a 4 °C por 6 meses, a perda de fármaco foi de apenas 9,3% e a -30 °C, não houve perda de indometacina após 12 meses. Os autores sugeriram que alterações na parede da nanocápsula poderiam ocorrer durante o período de estocagem e no processo de reidratação da formulação seca, quando a indometacina poderia ser liberada das nanocápsulas. Os autores constataram que o próprio sistema carreador apresentou uma atividade de inibição da agregação plaquetária intrínseca, e que esta foi aumentada quando a indometacina foi associada, mesmo em baixas concentrações (2,5 µg/mL). A atividade antiinflamatória da indometacina também foi aumentada quando o fármaco foi associado ao sistema coloidal. A indometacina livre, na dose de 3 mg/kg, inibiu o edema de pata de rato 1 h após a administração de carragenina e seu efeito permaneceu por 4 h. O fármaco associado às nanocápsulas foi ativo na dose de 0,3 mg/kg. Sua atividade iniciou 4 h após a administração de carragenina e permaneceu por 2 h, além de aumentar a atividade antiinflamatória em dez vezes, em relação ao fármaco livre.

A indometacina foi associada a nanocápsulas de poli(lactídeo) e foi verificada, em ratos, a atividade antiinflamatória desse sistema e o efeito protetor conferido ao trato gastrintestinal (AMMOURY *et al.*, 1993). A liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas em pH 7 foi rápida, ao contrário de seu comportamento em pH 1,2. Os autores sugeriram que a liberação da indometacina em alguns minutos, observada em valores de pH próximos de 7,4, indicaria que as nanocápsulas não seriam capazes de reter o fármaco em seu núcleo oleoso quando em condições *sink* perfeitas, como no intestino. A administração de indometacina associada a esse sistema carreador a ratos na dose de 10 mg/kg por 3 dias proporcionou importantes efeitos de proteção gastrintestinal, sendo associada a baixos índices lesionais tanto no estômago quanto no intestino. Essa proteção foi atribuída à redução do contato do fármaco livre com a superfície da mucosa, o que também pode ser observado com a administração de lipossomas contendo o mesmo fármaco. Por sua vez, a administração simultânea de fármaco livre e de nanocápsulas sem fármaco produziu lesões na mucosa, assim como a administração de indometacina livre, sugerindo que a simples adsorção do fármaco às nanocápsulas não seria suficiente para prevenir tais efeitos. Nos casos em que se verificou proteção tecidual, as

concentrações de fármaco nos tecidos do trato gastrointestinal foram baixas, ao contrário das concentrações plasmáticas, indicando que o efeito ulcerativo da indometacina estaria mais relacionado com suas concentrações no local do que com sua concentração sistêmica.

A associação da indometacina a nanocápsulas de poli(lactídeo), no entanto, não alterou suas propriedades farmacológicas, uma vez que para as doses de 5 e 10 mg/kg o efeito do fármaco livre e nanoencapsulado foi comparável ($p < 0,01$). Na dose de 2,5 mg/kg, o efeito de inibição do edema foi mais pronunciado para a indometacina associada a nanocápsulas. Os autores postularam que, em baixas doses, a indometacina estaria mais concentrada em tecidos alvo quando associada às nanocápsulas do que quando administrada na forma livre, mas essa diferença seria minimizada com o aumento da dose do fármaco administrado na forma livre, que se distribuiria amplamente, aumentando também sua concentração no tecido alvo. Por fim, os autores sugerem que as nanocápsulas poderiam apresentar uma propriedade bio-adesiva que proporcionaria um aumento na área de contato com a parede intestinal, facilitando a transferência de indometacina das nanocápsulas para ser absorvida através das células locais. Em paralelo, eles propuseram que as nanocápsulas poderiam se deslocar através da barreira gastrointestinal, alcançando a circulação linfática ou sanguínea, apesar desse tipo de transporte não ser coerente com o rápido aumento da concentração sanguínea de indometacina observado após a administração da mesma associada a esse sistema carreador (AMMOURY *et al.*, 1993).

A tolerância gastrointestinal de nanocápsulas de poli(D, L- lactídeo) contendo diclofenaco (20 mg/kg) e indometacina (5 mg/kg) foi avaliada após a administração oral e intravenosa (GUTERRES *et al.*, 1995). Após a administração dos AINEs em solução por ambas as vias, foi observada toxicidade em diferentes partes do trato gastrointestinal. Entretanto, não houve diferenças entre os índices lesionais provocados pelas soluções e pelos fármacos nanoencapsulados, quando administrados pela via i.v., indicando que a toxicidade observada pela administração sistêmica seria independente da forma de administração. Por sua vez, a administração das nanocápsulas por via oral provocou menores índices lesionais ao longo de todo trato gastrointestinal, possivelmente por diminuir o contato dos fármacos com a mucosa gástrica e duodenal, mantendo-os na forma não ionizados

e, assim, associados ao carreador. No íleo, onde o pH favoreceria a ionização dos AINEs avaliados, os índices lesionais foram os maiores observados tanto para solução quanto para as nanocápsulas, ainda que as nanocápsulas tenham apresentado toxicidade significativamente menor do que a solução.

A influência de nanocápsulas de poli(lactídeo) e da via de administração na farmacocinética da indometacina foi investigada por Fawaz e colaboradores (1996). Após administração intravenosa, evidenciou-se uma alteração na farmacocinética da indometacina nanoencapsulada. A distribuição extravascular foi aumentada, em função da captação dos carreadores pelo sistema fagocitário mononuclear, modificando a taxa de eliminação do fármaco. Após administração retal, a absorção foi mais completa e mais progressiva com nanocápsulas em relação à solução de indometacina. A biodisponibilidade absoluta da indometacina administrada em suspensão de nanocápsulas pela via retal foi próxima a 1, quando comparada com a suspensão de nanocápsulas administrada por via intravenosa. Entretanto, é possível que as concentrações plasmáticas da indometacina nanoencapsulada administrada pela via i.v. sejam reduzidas por sua captação pelo sistema fagocitário mononuclear, o que não aconteceria com a administração por via retal, uma vez que, segundo os autores, a indometacina seria liberada da nanocápsula para então ser absorvida. Assim, a biodisponibilidade absoluta da indometacina quando administrada pro via retal em suspensão de nanocápsulas estaria sendo superestimada. Com relação à proteção tecidual, as nanocápsulas exibiram um efeito protetor em relação ao potencial irritante da indometacina, provavelmente por reduzir o contato direto do fármaco com a mucosa retal.

A capacidade de diferentes carreadores de fármacos de aumentar a biodisponibilidade ocular da indometacina, tais como suspensões de nanopartículas, nanocápsulas e micropartículas de poli(ϵ -caprolactona), foi avaliada por Calvo e colaboradores (1996). Esse estudo evidenciou um aumento na concentração de indometacina na córnea e no humor aquoso, nos tempos de 0,5 e 1 h após a instilação. A biodisponibilidade ocular do fármaco associado a nanopartículas foi de 300% após instilação em comparação com uma solução comercial de indometacina. Esse aumento de biodisponibilidade também foi superior ao obtido quando a indometacina foi associada a micropartículas. A avaliação do mecanismo de interação dos carreadores com o epitélio da córnea mostrou que as partículas em

questão apresentaram comportamento semelhante, indicando que qualquer componente dos sistemas poderia ser responsável pelo aumento na absorção ou estimulação de endocitose pelas células. No entanto, a diferença de biodisponibilidade ocular da indometacina, quando associada aos sistemas nanoparticulados e ao microparticulado, poderia ser explicada pela natureza coloidal das nanopartículas. Segundo os autores, nanopartículas e nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), bem como suspensões submicrométricas representariam uma alternativa promissora para o aumento da biodisponibilidade de fármacos por via ocular para o tratamento do glaucoma.

Kim e colaboradores (2001) prepararam nanoesferas poliméricas compostas de poli(ϵ -caprolactona)-*b*-metóxi-poli(etilenoglicol) para veicular indometacina. A eficiência de encapsulação obtida foi de 42%, quando empregada a proporção de indometacina e polímero 1:1 (m/m). A farmacocinética da indometacina associada a esse sistema foi avaliada em ratos na dose de 10 mg/kg administrada por via intravenosa. A análise dos parâmetros farmacocinéticos, obtidos a partir dos perfis plasmáticos, indicou que a associação de polímeros utilizada no preparo das nanoesferas proporcionou uma liberação sustentada do fármaco e o aumento do tempo de meia-vida da indometacina, sem afetar a taxa de eliminação do fármaco. O aumento do tempo de meia-vida de eliminação, do volume de distribuição em *steady-state* e do tempo de residência médio sugere um aumento na distribuição extravascular da indometacina associada às nanoesferas, quando comparada com indometacina administrada em solução. Os autores consideraram que nanoesferas com essa composição são promissores carreadores de fármacos, especialmente hidrofóbicos, para administração parenteral, visando sistemas de liberação sustentada. Quando avaliada a toxicidade da formulação, a mesma apresentou DL₅₀ de 1,47 g/kg em camundongos e não foram observadas alterações histopatológicas no coração, pulmão fígado e rins (KIM *et al.*, 2003).

O estudo de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de poli(ésteres) e a comparação da estabilidade desses sistemas foi realizado por Pohlmann e colaboradores (2002). Foram avaliadas formulações empregando poli(lactídeo) e poli(ϵ -caprolactona) como polímeros e a taxa de associação de indometacina para todas elas foi de 100%. Após 3 meses de armazenagem à temperatura ambiente, a taxa de indometacina associada aos sistemas sofreu uma redução de 5% para as

nanopartículas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) e de 10% para as nanopartículas preparadas com poli(lactídeo). Quando armazenadas a 50 °C por 3 meses, os sistemas coloidais preparados com poli(lactídeo) apresentaram sinais de agregação, sendo considerados instáveis; os preparados com poli(ϵ -caprolactona) apresentaram recuperação de indometacina em torno de 50% (NC) e 20,4% (NS).

Raffin e colaboradores (2003) estudaram a influência da composição quantitativa de formulações de nanopartículas contendo indometacina secas por nebulização nas características físico-químicas dos pós obtidos, bem como a toxicidade gastrointestinal desses sistemas. As formulações empregaram poli(ϵ -caprolactona) como polímero – no caso de nanocápsulas e nanoesferas – e triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico como óleo – para nanocápsulas e nanoemulsão. Todas as formulações provocaram baixos índices lesionais no estômago, o que pode ser explicado pela circulação entero-hepática desse fármaco em roedores, o que ocasiona uma maior toxicidade intestinal do que gástrica. No intestino delgado, foram observadas ulcerações para todas as formulações avaliadas. Entretanto, os índices lesionais foram significativamente inferiores para o nebulizado de nanocápsulas de indometacina em relação aos demais tratamentos, indicando que tal sistema é efetivo na proteção da mucosa gastrointestinal, ao contrário das outras formulações testadas.

A fim de diferenciar nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, um estudo de difusão do éster etílico de indometacina (IndOEt), uma substância lipofílica, não ionizável em água pura, associada a esses colóides foi realizado (SOARES, 2003; CRUZ *et al.*, 2006a e b). Os perfis de difusão foram comparados com os obtidos para a indometacina (IndOH), um fármaco lipofílico e ionizável. O éster etílico de indometacina foi escolhido por apresentar uma alta afinidade pelo núcleo oleoso da nanocápsula em relação à indometacina e foi preparado conforme indicado na Figura 3. Os sistemas coloidais foram preparados com poli(ϵ -caprolactona) como polímero – para nanocápsulas e nanoesferas – e triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico como óleo – para nanocápsulas e nanoemulsão.

Os resultados de caracterização dos sistemas coloidais obtidos com o fármaco e seu éster estão apresentados na Tabela 5. As formulações apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo. Os diâmetros de partículas foram

inferiores a 300 nm e os valores de pH apresentaram redução após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente em relação aos valores após o preparo, o que foi atribuído ao relaxamento do polímero, expondo grupos ácidos terminais (SOARES, 2003).

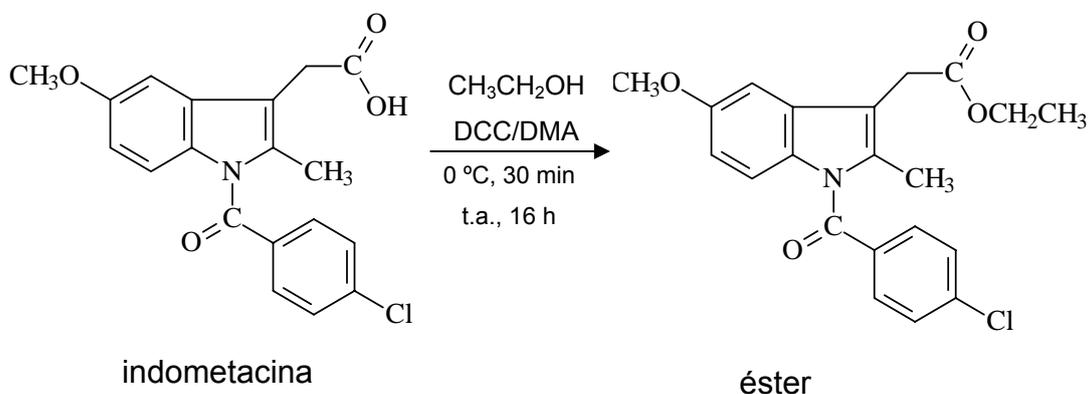


Figura 3. Esquema de preparação do éster etílico de indometacina a partir da indometacina (SOARES, 2003; CRUZ *et al.*, 2006a).

Tabela 5. Tamanho de partícula, pH e doseamento das nanocápsulas com indometacina e com seu éster etílico (SOARES, 2003).

Formulação	Diâmetro ^a (nm) ± D.P. ^b	pH		Concentração da substância ^c ± D.P. ^b (mg/mL)	
		t = 0	t = 30 dias	t = 0	t = 30 dias
NC - IndOEt	278 ± 29	6,30 ± 0,22	4,66 ± 0,16	0,963 ± 0,022	0,963 ± 0,016
NS - IndOEt	208 ± 09	5,74 ± 0,15	4,49 ± 0,11	0,985 ± 0,009	0,981 ± 0,024
NE - IndOEt	250 ± 09	5,63 ± 0,20	3,75 ± 0,32	0,992 ± 0,012	0,989 ± 0,021
NC - IndOH	264 ± 12	5,52 ± 0,31		1,012 ± 0,010	
NS - IndOH	186 ± 09	5,29 ± 0,16		0,995 ± 0,019	
NE - IndOH	236 ± 17	5,25 ± 0,20		0,976 ± 0,028	

^a Amplitude de distribuição < 67 nm; ^b Desvio padrão (D.P.) de triplicata de alíquotas; ^c Substância: IndOEt ou IndOH.

Uma solução aquosa diluída de hidróxido de sódio (NaOH 50 mM) foi utilizada como meio de dissolução para a avaliação da liberação de indometacina e de seu

éster a partir dos sistemas coloidais estudados. Nessas condições, a indometacina foi totalmente liberada e hidrolisada em 3 min, enquanto seu éster associado às NC foi liberado e, então, hidrolizado por 24 h (Figura 4). Esses resultados indicaram que a indometacina estaria preferencialmente localizada na interface da partícula ou gotícula/água, enquanto que o seu éster estaria disperso ou dissolvido nas partículas ou gotículas dos colóides. A liberação de indometacina se daria, portanto, por formação de um sal sódico hidrossolúvel, seguida da hidrólise da função amida, enquanto a liberação do éster, por difusão do mesmo a partir do núcleo oleoso para a interface partícula-água, onde seria hidrolisado. A possibilidade de erosão das nanocápsulas, dependente da molécula associada – o AINE ou seu éster – foi refutada mediante a análise do tamanho de partícula durante o experimento de liberação, no qual se evidenciou a integridade dos sistemas coloidais pela manutenção de seu tamanho de partícula (SOARES, 2003; POHLMANN et al., 2004).

Em continuidade a esse trabalho, o perfil cinético de consumo do éster etílico de indometacina, quando associado às mesmas nanocápsulas do estudo anterior, foi avaliado para diferenciar os sistemas de nanocápsulas contendo 10,0 mg/mL de polímero (NC 100), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE) a partir do perfil de difusão do mesmo éster (CRUZ, 2005; CRUZ *et al.*, 2006a e b). Para os três sistemas coloidais, os perfis cinéticos de liberação evidenciaram uma fase inicial rápida, com tempos de meia-vida de 5,9, 4,4 e 2,7 min, e uma fase de liberação sustentada, com tempos de meia-vida de 288,8, 87,7 e 147,5 min, respectivamente (Figura 5). A redução da concentração de polímero na formulação das nanocápsulas proporcionou um consumo mais rápido do éster, com um mínimo de 18,5 h para as nanocápsulas preparadas com 2 mg/mL de polímero. Os perfis de consumo do éster etílico de indometacina associado a nanoestruturas seguiram um modelo biexponencial que descreve o processo difusivo controlado por duas constantes: k_1 – relacionada com o processo de dessorção do éster e k_2 – relacionada com o processo de difusão do restante do éster a partir das nanoestruturas, correspondente a pelo menos 84% do éster nanoencapsulado.

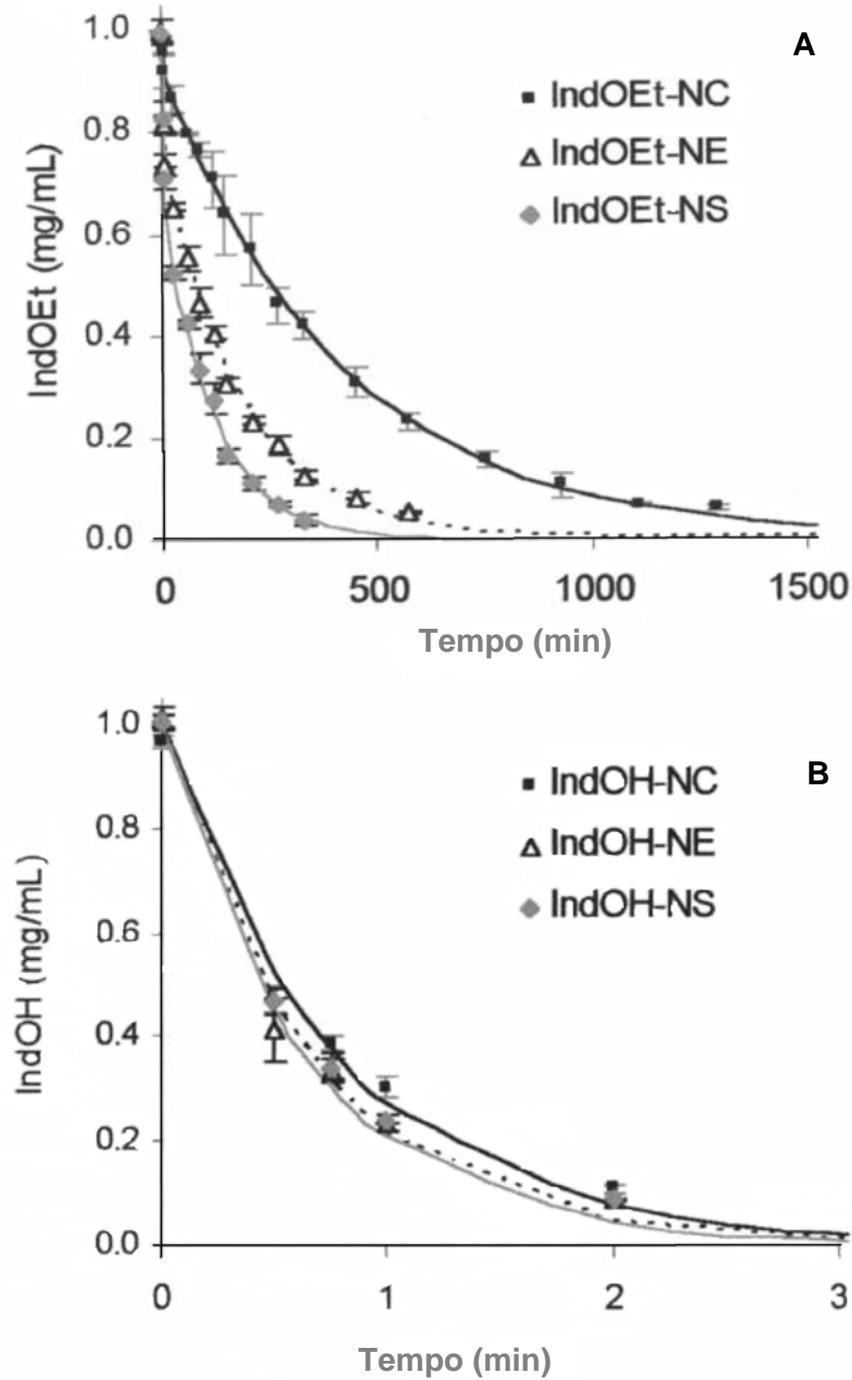


Figura 4. Perfil cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina (IndOEt) (A) e da indometacina (IndOH) (B) associados a nanopartículas (NC, NE, NS) (POHLMANN *et al.*, 2004).

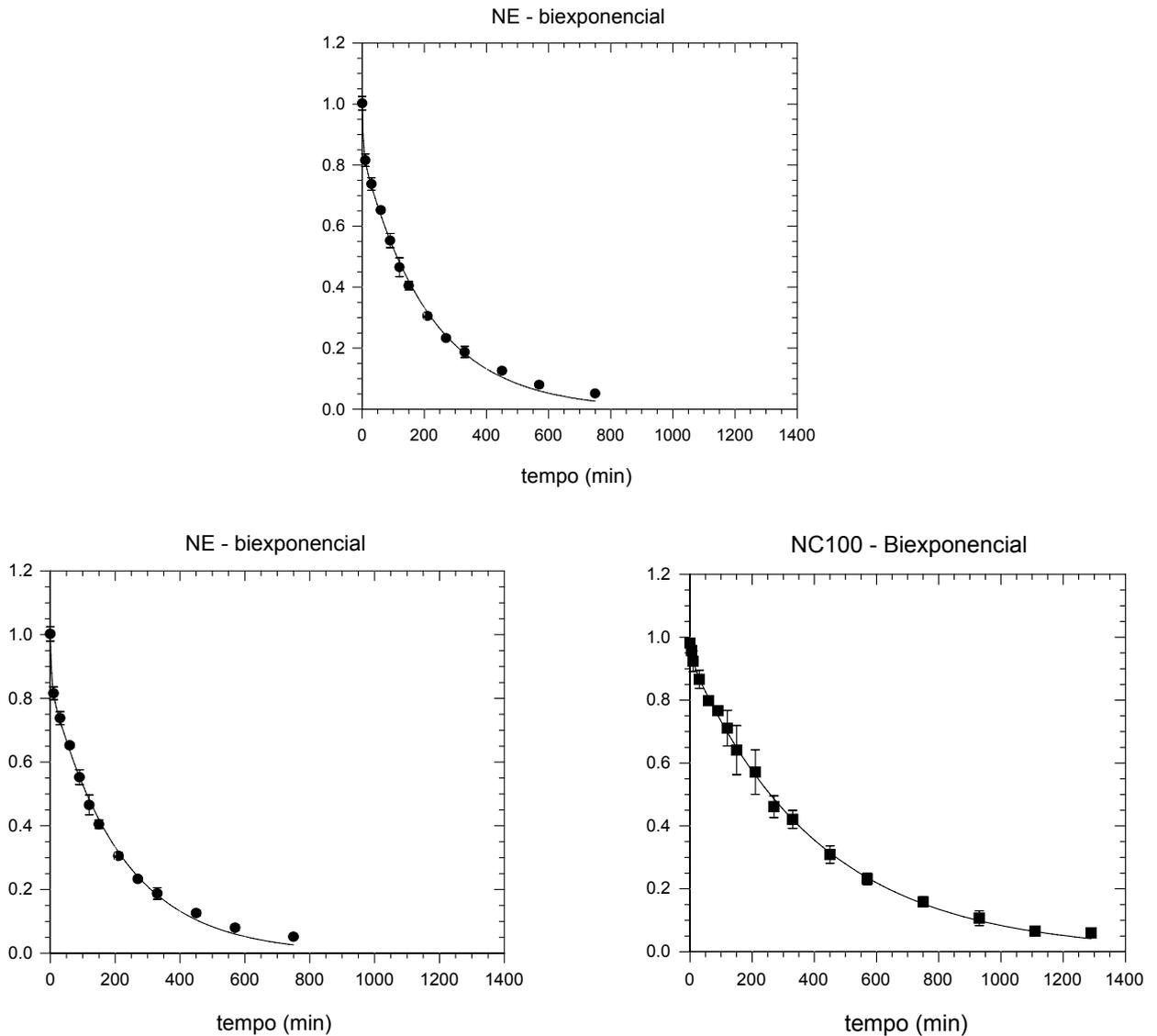


Figura 5. Perfis cinéticos de hidrólise alcalina de NC, NS e NE contendo IndOEt modelados por equação biexponencial (ordenadas em mg/mL).

Considerando a seletividade apresentada pelo éster etílico de indometacina sobre a inibição da COX-2 (KALGUTKAR *et al.*, 2000b), e sua baixa solubilidade em fluidos biológicos (menor do que 1 $\mu\text{g/mL}$) (SOARES, 2003), Cruz (2005) avaliou em ratos a atividade antiedematogênica do éster associado a nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões, na dose de 10 mg/kg administrados por via oral. Os resultados indicaram uma inibição significativa do edema para as formulações de nanocápsulas (71% de inibição 4 h após a administração de IndOEt-NC) e de nanoesferas (104% de inibição) (Figuras 6, 7 e 8).

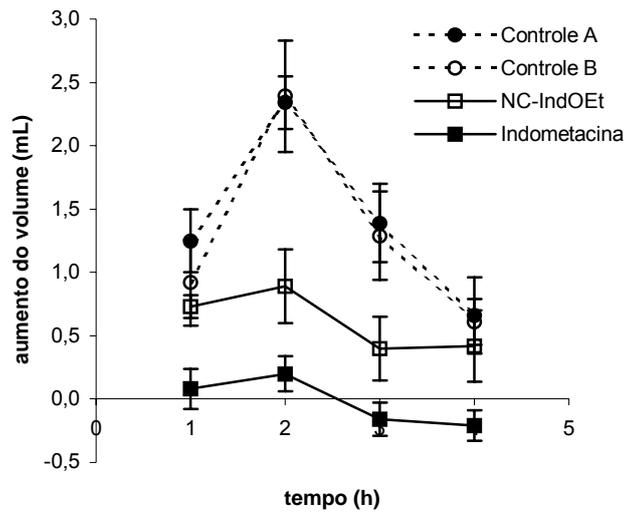


Figura 6. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NC-IndOEt (10 mg/kg p.o.) e respectivos controles (controle A: água destilada; controle B: suspensão de NC na ausência de IndOEt).

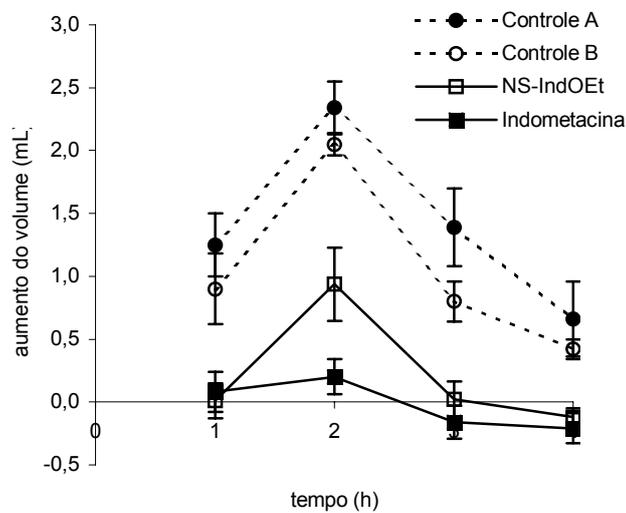


Figura 7. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NS-IndOEt e respectivos controles (controle A: água destilada; controle B: suspensão de NS na ausência de IndOEt).

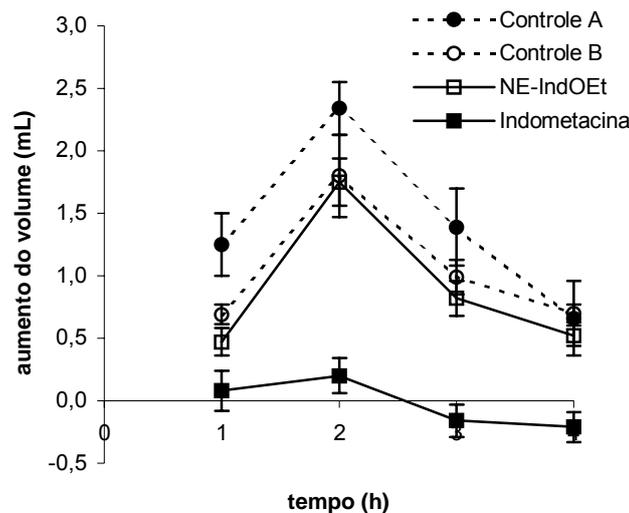


Figura 8. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos provocada por carragenina tratados com NE-IndOEt e respectivos controles (controle A: água destilada; controle B: suspensão de NE na ausência de IndOEt).

Com base nos resultados obtidos por essa série de estudos, os sistemas coloidais empregados foram considerados de grande potencial para possibilitar a administração do IndOEt por via oral, considerando sua baixa solubilidade em fluidos biológicos. Duas hipóteses foram citadas por Cruz (2005) para explicar a absorção do éster etílico de indometacina. As nanopartículas poderiam apresentar propriedades bioadesivas, proporcionadas pelo tensoativo hidrofílico empregado em sua preparação. Assim, um aumento do contato das mesmas com o epitélio intestinal facilitaria a absorção do éster. A outra proposta seria que as próprias nanopartículas atravessariam a membrana gastrointestinal e, assim, alcançariam o sistema linfático mesentérico e a circulação sangüínea (APRAHAMIAN *et al.*, 1987; AMMOURY *et al.*, 1993). Entretanto, apesar de promissor, o estudo de Cruz (2005) não possibilitou a comprovação de uma dessas hipóteses nem a determinação da substância responsável pela atividade – o próprio éster ou a indometacina produzida a partir dele pela hidrólise *in vivo*.

Nos resultados apresentados na Figura 6, pode-se observar que as nanocápsulas apresentaram um perfil bastante promissor, com liberação controlada do IndOEt por 24 h. Além disso, sistemas coloidais tipo nanocápsulas promovem proteção da mucosa gastrointestinal quando administradas por via oral, conforme

observado por Ammoury e colaboradores (1993), Guterres e colaboradores (1995) e Raffin e colaboradores (2003). Esses sistemas coloidais proporcionariam uma liberação lenta de fármacos, como indometacina ou diclofenaco, no estômago e no duodeno. Essa liberação lenta seria responsável por prevenir o contato de altas concentrações de fármaco livre com a mucosa gástrica, seu reduzindo o potencial de toxicidade. Nesse contexto, as nanocápsulas de IndOEt foram avaliadas nesse projeto quanto a sua farmacocinética e formação de indometacina *in vivo*, tanto por apresentar atividade antiedematogênica similar à da indometacina, quanto pela possível proteção à mucosa do trato gastrintestinal que propiciariam.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

- Fármaco: Indometacina (Sigma[®]);
- Polímero: Poli(ϵ -caprolactona): $M_w = 65000$ g/mol (Aldrich[®]);
- Tensoativo lipofílico: Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – EHL = 4,3 (Delaware[®]);
- Tensoativo hidrofílico: Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – EHL = 15,0 (Delaware[®]);
- Fase oleosa: Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Miglyol 810[®]) (Brasquim[®]);
- Reagentes: *N, N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (Sigma[®]);
Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) (Sigma[®]).

4.2 Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético (Vitaris[®]);
- Evaporador rotatório (Buchi[®]);
- Bomba de vácuo (Buchi Vac[®]);
- Balança analítica AB 204 (Mettler Toledo[®]);
- Potenciômetro B474 (Micronal[®]);
- Vórtex Certomat MV (Braun[®]);
- Centrífuga refrigerada para tubos tipo *ependorf* 5417R (Eppendorf[®]);
- Homogeneizador de tecidos PowerGen 125;

- Zetasizer[®] nano- ZS modelo ZEN 3600 (Malvern[®] UK);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de ultravioleta (Waters[®]): injetor 717 plus (Waters[®]); detector UV 2487 *Dual λ Absorbance* (Waters[®]); bomba e controlador 600 (Waters[®]);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10AVP (Shimadzu[®]): injetor SIL-10ADVP (Shimadzu[®]); bomba LC-10ADVP e controlador SCL-10AVP (Shimadzu[®]);
- Programa Shimadzu[®] CLASS-VP (versão 6.12);
- Programa Millenium 1.0 (Waters[®]);
- Programa Excel[®] 2003 (Microsoft[®]);
- Programa WinNonlin[®] v. 1.0 (Scientific Consulting Inc.);
- Programa Scientist 3.02 (Micromath[®]).

4.3 Solventes e outros

- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli Q[®] - Millipore[®]);
- Acetato de etila p.a (Nuclear[®]);
- Acetonitrila grau HPLC (Tedia[®]);
- Acetona p.a. (Quimex[®]);
- Álcool etílico absoluto (Merck[®]);
- Carbonato de sódio p.a. (Nuclear[®]);
- Ciclo-hexano p.a. (Nuclear[®]);
- Diclorometano p.a. (Nuclear[®]);

- Fosfato de amônio monobásico p.a. (Vetec[®]);
- Sílica-gel 60 (70-230 mesh) (Merck[®]);
- Sulfato de sódio anidro p.a. (Nuclear[®]);
- Coluna cromatográfica Nova-Pack C₁₈, 150 mm, 3,9 mm, 4 µm (Waters[®]);
- Pré-coluna com enchimento sílica LiChrosorb RP – 18 (Merck[®]);
- Ultrafree[®] - GMPC 10,000 NMWL Filter Unit (Millipore[®]);
- Filtros Centrifree[®] (Millipore[®]).

4.4 Métodos

4.4.1 Preparação do éster etílico de indometacina

O éster etílico de indometacina foi preparado conforme o protocolo desenvolvido por Pohlmann e colaboradores (2004) a partir da adaptação de Kalgutkar e colaboradores (2000). A indometacina (5,0 mmol) foi dissolvida em etanol absoluto (20 mL) em balão sob agitação. Em seguida, foi adicionado 0,2 mmol de *N,N*-dimetilaminopiridina. A solução foi resfriada a 0 °C por 10 minutos e, posteriormente, foi adicionada diciclo-hexilcarbodiimida (5,0 mmol), mantendo-se a agitação. O balão foi acoplado a um condensador com cápsula dessecante e permaneceu à temperatura de 0 °C. Após 30 minutos, o balão foi mantido à temperatura ambiente e a reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada, usando como eluente ciclo-hexano e acetato de etila (2:1, v/v).

Decorridas 15 a 20 horas, a reação foi interrompida por evaporação do solvente a 45 °C sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e filtrado em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi lavado por três vezes com 10 mL de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, descartando-se a

fase aquosa. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, posteriormente, filtrada em papel filtro. O solvente orgânico foi eliminado por evaporação a 45 °C sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna, empregando-se sílica-gel 60, 70-230 mesh e eluente composto por ciclo-hexano e acetato de etila (2:1, v/v).

As frações obtidas da coluna foram comparadas por cromatografia em camada delgada com padrão de éster etílico de indometacina, a fim de se identificar e reunir as frações que continham apenas o produto de interesse.

O éster etílico de indometacina teve sua identidade confirmada por CLAE-PDA, avaliando-se o teor e a pureza do pico.

4.4.2 Preparação das nanocápsulas

A formulação de nanocápsulas de éster etílico de indometacina foi preparada utilizando-se a composição descrita por Pohlmann e colaboradores (2004) (Tabela 6).

A preparação das nanocápsulas foi realizada seguindo o método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). A fase orgânica foi aquecida a 40 °C sob agitação para fusão do polímero e solubilização do éster. A fase aquosa foi submetida à agitação para dispersão do tensoativo hidrofílico. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente na fase aquosa, sob agitação e com auxílio de um funil. A eliminação do solvente orgânico e a concentração da suspensão de nanocápsulas foram realizadas em evaporador rotatório a 40 °C, até um volume final de 10,0 mL, medido em balão volumétrico. A concentração de éster etílico de indometacina na formulação foi determinada por CLAE, empregando-se metodologia previamente validada (SOARES, 2003).

Tabela 6. Composição da formulação de nanocápsulas de éster etílico de indometacina.

Constituintes	Quantidades
Fase Aquosa	
Água destilada	53 mL
Polissorbato 80	77 mg
Fase orgânica	
Acetona	27 mL
Monoestearato de sorbitano	77 mg
Poli(ϵ -caprolactona)	100 mg
Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico	0,33 mL
Éster etílico de indometacina	10 mg

4.4.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

4.4.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado em triplicata com a utilização de um potenciômetro, previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0. Essa determinação foi empregada para todas as formulações produzidas.

4.4.3.2 Determinação do tamanho de partícula

As suspensões foram diluídas em água Milli Q, previamente filtrada, e a avaliação do diâmetro e distribuição do diâmetro das nanopartículas em suspensão foi determinada através de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de

correlação de fótons) por Zetasizer[®] nano- ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, UK).

4.4.4 Metodologia analítica

4.4.4.1 Adaptação da metodologia analítica

A partir da metodologia analítica para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrita por Pohlmann e colaboradores (2004), foram determinadas as condições cromatográficas para determinação simultânea do éster etílico de indometacina e da indometacina a partir dele formada em plasma e em homogeneizado de tecidos. Inicialmente, foi empregada a fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30, v/v), fluxo de 1 mL/min e detecção por detector de ultravioleta a 267 nm. Foram testados diferentes valores de pH da fase aquosa (3 a 7,5), visando determinar o que proporcionasse melhor resolução do pico de indometacina, sem afetar a estabilidade do éster etílico de indometacina.

As condições escolhidas incluíram o uso de coluna cromatográfica C₁₈ de 15 cm e pré-coluna preenchida com sílica LiChorsorb RP – 18 (Merck[®]). A fase móvel foi composta por acetonitrila e fosfato de amônio monobásico 0,02 M (70:30) com pH aparente de 5,0 regulado por adição de ácido fosfórico 0,1 M e gradiente de fluxo iniciando em 0,8 mL/min, mantido até 3,5 min de análise, aumentando para 1,3 mL/min até 4,5 min e mantidos até 6 min. Antes de sua utilização, a fase móvel foi filtrada através de filtro de membrana Millipore[®] e desgaseificada por 10 min em banho de ultra-som. A detecção foi realizada por detector de ultravioleta a 267 nm e a coluna cromatográfica foi mantida sob aquecimento a 45,0 ± 0,2 °C. As amostras foram analisadas em um volume de 50 µL com auxílio de autoinjeter.

4.4.4.2 Preparação das amostras

As amostras de plasma e de homogeneizado de tecidos (100 µL) foram submetidas a processamento para precipitação de proteínas pela adição de acetnitrila (200 µL) à temperatura ambiente e posterior mistura em vórtex por 10 s. As amostras foram então centrifugadas a 14000 rpm (20200 x g) por 15 min e o sobrenadante separado para análise por CLAE.

4.4.4.3 Preparação das soluções da curva padrão

Para a curva padrão, foram pesados 10,0 mg de IndOH em balança analítica e solubilizados em acetnitrila até um volume de 25,0 mL em balão volumétrico, resultando em uma solução-mãe de 400 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução-mãe de IndOEt. As soluções foram submetidas a sucessivas diluições em acetnitrila até ser alcançada a faixa de 5 a 400 µg/mL. Alíquotas de 10 µL das soluções finais de IndOH e de IndOEt foram adicionadas a 100 µL de plasma, sendo então agitadas em vórtex por 10 s. Posteriormente, cada ponto da curva padrão foi submetido à precipitação das proteínas do plasma por adição de 180 µL de acetnitrila, procedimento semelhante ao empregado para as amostras (item 4.4.4.2). O sobrenadante resultante de tal processamento foi analisado por CLAE. Para análise das substâncias em homogeneizado de tecido hepático e intestinal, as curvas padrão foram preparadas na mesma matriz biológica da amostra.

4.4.4.4 Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica desenvolvida foi validada de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), avaliando-se

seletividade, exatidão, precisão intermediária, repetibilidade e linearidade.

Para tal fim, foram utilizadas curvas padrão e controles de qualidade contendo ambos os analitos em quantidades conhecidas. A faixa de concentrações dos analitos na curva de calibração foi determinada a partir de estudo piloto em ratos, a fim de representar as concentrações esperadas nas amostras. O limite inferior de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada com os valores de exatidão e precisão preconizados pelo FDA, bem como pelo uso da Equação 1

$$LIQ = \frac{DP_a}{IC} * 10 \quad (1)$$

onde DP_a é o valor de desvio padrão do intercepto de pelo menos 3 curvas padrão contruídas contendo concentrações da substância próximas ao suposto limite de quantificação com o eixo y e IC é o valor médio de inclinação das curvas padrão (ANISA, 2003).

A metodologia foi validada em plasma contemplando a faixa de concentração de 0,5 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$ (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 $\mu\text{g/mL}$) para cada um dos analitos e controles de qualidade de 0,8, 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$. Foram analisadas três curvas padrão por dia, preparadas a partir de diferentes soluções mãe (item 4.4.4.3), por três dias consecutivos avaliando-se linearidade e limite inferior de quantificação. Análise de variância foi empregada para análise estatística da linearidade e de desvio da linearidade. Os controles de qualidade foram preparados para cada curva a partir de soluções mãe diferentes das utilizadas para as curvas padrão. Os controles de qualidade foram avaliados nos parâmetros de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão. A especificidade do método foi verificada pela inexistência de picos interferentes aos picos de IndOH e IndOEt e pela avaliação ds valores de fator de separação (α), determinado pela razão entre os tempos de retenção do dois picos adjacentes, e pela resolução (R), que relaciona as distâncias relativas de dois picos adjacentes e suas larguras de base médias, conforme Equação 2, onde Δt é a diferença entre os tempos de retenção de dois picos adjacentes e W_{bn} é a largura da base de cada pico. Valores de α superiores a 1 e de R superiores a 1,5 indicam uma separação completa entre os picos.

$$R = \frac{\Delta t}{\left(\frac{Wb1 + Wb2}{2} \right)} \quad (2)$$

4.4.5 Avaliação farmacocinética da indometacina e do éster etílico de indometacina

4.4.5.1 Avaliação da recuperação de éster etílico de indometacina nanoencapsulado em sangue e plasma

A fim de se avaliar a recuperação do éster em sangue e plasma de rato, alíquotas de 10 µL de éster etílico de indometacina nanocapsulado foram adicionadas a 390 µL de plasma ou sangue de rato e homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à precipitação de proteínas (item 4.4.4.2) e, então, analisadas por CLAE para quantificação dos analitos. As amostras em plasma e em sangue foram preparadas em triplicata e a concentração dos analitos foi calculada a partir de curvas padrão preparadas nas mesmas matrizes biológicas das amostras.

4.4.5.2 Animais

Na etapa de avaliação do perfil farmacocinético da indometacina e do éster etílico de indometacina, foram utilizados ratos Wistar machos adultos (n = 5 a 11/grupo), pesando entre 270 e 310 g, provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS.

Os animais foram mantidos em ciclo artificial de luminosidade (12 horas claro – 12 horas escuro) à temperatura média de 22 ± 2 °C e umidade relativa do ar em torno de 64%. Alimentação e água estiveram disponíveis por todo o período de

experimentação, exceto para o grupo que foi submetido à administração por via oral. Os animais que receberam a dose por via oral foram submetidos a jejum por 12 horas antes da administração e até as primeiras quatro horas de experimento, recebendo água somente duas horas após a administração do produto. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Protocolo 2005478) (Anexo 1).

4.4.5.3 Protocolo experimental

Os animais receberam a suspensão aquosa de IndOH ou a suspensão coloidal contendo IndOEt nanoencapsulado por via oral e por via intravenosa. IndOEt foi também administrado sob a forma de suspensão aquosa, apenas por via oral. A escolha das doses foi feita considerando as condições empregadas no estudo de atividade antiedemetogênica (CRUZ *et al.*, 2006b), em que a IndOH foi administrada na forma de suspensão aquosa (1,0 mg/mL) contendo 1% de polissorbato 80 e o IndOEt foi administrado nanoencapsulado (1,0 mg/mL), ambos por via oral na dose de 10 mg/kg. A administração intravenosa do IndOEt nanoencapsulado foi realizada visando a determinação da biodisponibilidade dessa formulação por via oral e a caracterização dos perfis plasmáticos a partir da formulação, sem absorção pelo trato gastrointestinal. Nesse caso, os animais receberam uma dose menor, de 5 mg/kg, uma vez que o volume de suspensão de nanocápsulas necessário para uma dose mais elevada seria superior ao limite preconizado na literatura para administração intravenosa (WAYNFORT e FLECKNELL, 1994). A Tabela 7 mostra os grupos estudados e os respectivos tamanhos amostrais.

Tabela 7. Protocolo experimental utilizado para a realização dos experimentos de farmacocinética.

Grupo				
Substância administrada	Veículo	Dose (mg/kg)	Via de administração	n
IndOH suspensão (2 mg/mL)	glicose 5% com 6% de polissorbato 80	10	i.v.	9
IndOH suspensão (1 mg/mL)	água com 1% polissorbato 80	10	p.o.	7
IndOEt suspensão (1 mg/mL)	água	10	p.o.	7
IndOEt suspensão (1 mg/kg)	água com 1% de polisorbato 80	10	p.o.	11
IndOEt (1 mg/kg)	nanocápsulas	10	p.o.	8
IndOEt (1 mg/kg)	nanocápsulas	5	i.v.	5

n = tamanho amostral.

Para o preparo da suspensão aquosa de IndOH para a administração oral, a mesma foi pesada em balança analítica e suspensa em água destilada e 1% de polissorbato 80 até uma concentração final de 1,0 mg/mL, conforme descrito por Cruz e colaboradores (2006b). A suspensão foi submetida à vigorosa agitação em agitador magnético por 2 h para homogeneização da suspensão e redução dos tamanhos de partícula. Empregando-se procedimento similar, preparou-se as suspensões aquosas de IndOEt (1,0 mg/mL), com e sem a adição de polissorbato 80, e submetendo-as a sonicação por 30 min e posterior agitação a 45 °C.

No preparo da suspensão de IndOH para administração intravenosa, a IndOH foi suspensa em glicose 5% e 6% de polissorbato 80 até uma concentração final de 2,0 mg/mL e submetida a agitação *over night*.

A administração por via oral se deu por gavagem com auxílio de uma sonda rígida conectada a uma seringa de 3,0 mL. A administração por via i.v. foi realizada na veia caudal lateral dos animais, devidamente imobilizados em caixas de

contenção, com uso de butterfly 25G e seringa de 3,0 mL. As doses administradas por via intravenosa respeitaram o volume máximo de administração de 1,5 mL de formulação (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1994), tanto para a suspensão aquosa de IndOH quanto para o IndOEt nanoencapsulado.

Após a administração, foram coletadas, em tempos pré-determinados por meio de um estudo piloto, amostras de sangue da veia caudal dos animais com auxílio de butterfly 25G ambientado com solução salina heparinizada. Na avaliação farmacocinética de IndOH administrada p.o., foram coletadas amostras de plasma nos tempos de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0, 18,0, 24,0 h. No caso dos experimentos com administração por via i.v., bem como nos experimentos com administração p.o. de IndOEt, foram incluídos os tempos de coleta 0,08, 0,17 h, visando uma apurada caracterização do perfil plasmático e uma cuidadosa avaliação da possível hidrólise do IndOEt e formação de IndOH. Nos casos em que a concentração plasmática da substância ultrapassou o limite superior de quantificação, as amostras foram diluídas pela adição de plasma e, então, submetidas a procedimento para a precipitação de proteínas conforme descrito no item 4.4.4.2.

Para a realização das coletas, os animais, não anestesiados, foram imobilizados em caixas de contenção de acrílico. As amostras coletadas foram transferidas para tubos de reação heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm (14811 x g) para a separação do plasma. O plasma foi transferido para tubos de reação e congelado a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior análise por CLAE.

Após o término do período de coletas, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 . Os corpos foram devidamente acondicionados e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em freezer apropriado, para posterior coleta especial pelo Departamento Metropolitano de Limpeza Urbana (DMLU) da Prefeitura de Porto Alegre.

4.4.5.4 Avaliação do perfil de concentração plasmática *versus* tempo da IndOH e do IndOEt

As concentrações plasmáticas da indometacina e do éster etílico de indometacina e da indometacina formada a partir dele, dependendo do grupo investigado, foram usadas para a avaliação do perfil farmacocinético das substâncias mediante análise não-compartimental e compartimental, utilizando-se os programas Excel[®] 2000 (Microsoft[®]) e Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]), respectivamente.

4.4.5.4.1 Análise Não-compartimental

A análise não-compartimental foi realizada para os perfis individuais dos animais que compuseram cada grupo experimental. Foram determinados os parâmetros farmacocinéticos biodisponibilidade absoluta, *clearance*, tempo de meia-vida, volume de distribuição, tempo de residência médio, tempo para atingir o pico plasmático máximo e concentração plasmática máxima, empregando-se as equações listadas a seguir (GIBALDI e PERRIER, 1982).

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo de cada animal, empregando-se os últimos três ou quatro pontos dos perfis. A partir do valor de λ determinado, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da substância avaliada foi determinada pela Equação 3:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (3)$$

A área sob a curva, um indicativo da extensão de absorção, foi calculada pelo método trapezoidal dos tempos 0 a t (ASC_{0-t}), onde t é o último tempo de coleta. Essa área foi acrescida da área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}), sendo então denominada $ASC_{0-\infty}$, conforme equações 3 e 4:

$$ASC_{0-t} = \frac{(C_0 + C_1)}{2} * (t_1 - t_0) + \frac{(C_1 + C_2)}{2} * (t_2 - t_1) + \dots + \frac{(C_{t-1} + C_t)}{2} * (t_t - t_{t-1}) \quad (3)$$

$$ASC_{ext} = \frac{C_t}{\lambda} \quad (4)$$

onde C_t é a concentração plasmática no último tempo de coleta, C_{t-1} é a concentração plasmática no penúltimo tempo de coleta.

O *clearance* total foi estimado pela equação 5, onde D é dose administrada e f (Equação 6) é a biodisponibilidade da formulação em relação à indometacina i.v., enquanto os valores de t_{max} e C_{max} foram estimados a partir dos perfis individuais de concentração por tempo

$$Cl_{TOTAL} = \frac{f * D}{ASC_{0-\infty}} \quad (5)$$

$$f = \frac{ASC_{0-\infty Subst.} * D_{IndOH i.v.}}{ASC_{0-\infty IndOH i.v.} * D_{Subst.}} \quad (6)$$

A área sob a curva do primeiro momento ($ASMC_{0-\infty}$) foi determinada pelo método trapezoidal (Equações 7 e 8) somando-se o valor obtido até o tempo t com o valor de $ASMC_{ext}$.

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{(C_0 * t_0) + (C_1 * t_1)}{2} \right) * (t_1 - t_0) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} * t_{t-1}) + (C_t * t)}{2} \right) \quad (7)$$

$$ASMC_{ext} = \left(\frac{C_t * t}{\lambda} \right) + \left(\frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad (8)$$

Para os dados de administração i.v., foi calculado o tempo de residência médio (MRT) a partir dos valores de $ASC_{0-\infty}$ e $ASMC_{0-\infty}$ (Equação 9). Também para os dados de administração i.v., foi determinado o Vd_{SS} a partir do MRT i.v. e Cl_{TOT} (Equação 10).

$$MRT_{i.v.} = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (9)$$

$$Vd_{SS} = MRT_{i.v.} * Cl_{TOT} \quad (10)$$

4.4.5.4.2 Análise Compartmental

A análise compartimental foi realizada avaliando-se o modelo farmacocinético que mais se ajustava aos dados experimentais. A qualidade da modelagem foi avaliada pelo ajuste visual dos pontos experimentais aos perfis obtidos como modelo, pelo coeficiente de correlação (r) e pelo critério de seleção do modelo (MSC), calculado pelo programa Scientist[®]. O MSC representa a adequação do modelo proposto para descrever os dados experimentais. Assim, quanto maior o seu valor, maior a correlação entre os valores experimentais e os determinados a partir do modelo empregado.

Os modelos testados para os dados experimentais dos grupos com administração i.v. foram os modelos de 1 e de 2 compartimentos aberto, sendo o último escolhido como mais adequado (Equação 11) (SHARGEL, WU-PONG e YU, 2004).

$$Cp = a * e^{-\alpha * t} + b * e^{-\beta * t} \quad (11)$$

onde Cp é a concentração plasmática a cada tempo, a e b são os interceptos no tempo zero das fases de distribuição e eliminação, respectivamente, e α e β são as velocidades das fases de distribuição e eliminação.

As microconstantes que descrevem esse modelo foram calculadas, após a modelagem dos dados, com uso das equações 12 a 14 (SHARGEL, WU-PONG e YU, 2004).

$$k_{10} = \frac{\alpha * \beta}{k_{21}} \quad (12)$$

$$k_{21} = \frac{(a * \beta) + (b * \alpha)}{(a + b)} \quad (13)$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad (14)$$

onde, k_{10} é a velocidade de eliminação do compartimento central, k_{12} é a velocidade de distribuição do compartimento central para o periférico e k_{21} é a velocidade de redistribuição do compartimento periférico para o central.

A partir das microconstantes, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos $ASC_{0-\infty}$, volume do compartimento central (V_c), volume de distribuição no *steady-state* (Vd_{ss}), Cl_{TOT} , tempo de meia-vida da fase de distribuição e de eliminação ($t_{1/2\alpha}$ e $t_{1/2\beta}$, respectivamente) (Equações 15 a 20) (SHARGEL, WU-PONG e YU, 2004).

$$ASC_{0-\infty} = \left(\frac{a}{\alpha}\right) + \left(\frac{b}{\beta}\right) \quad (15)$$

$$V_c = \frac{D}{(a+b)} \quad (16)$$

$$Vd_{ss} = \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}\right) * V_c \quad (17)$$

$$Cl_{TOTAL} = \frac{D}{ASC_{0-\infty}} \quad (18)$$

$$t_{1/2\alpha} = \frac{0,693}{\alpha} \quad (19)$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{0,693}{\beta} \quad (20)$$

Para os dados dos grupos experimentais com administração p.o. foram testados os modelos de 1 e de 2 compartimentos com absorção de primeira ordem e de 1 compartimento com absorção de primeira ordem com *lag time*. O modelo escolhido foi o de 1 compartimento com absorção de primeira ordem, descrito pela Equação 21 (SHARGEL, WU-PONG e YU, 2004).

$$C_p = \left(\frac{f * D}{V_d}\right) * \left(\frac{ka}{ka - ke}\right) * (e^{-ke*t}) * (e^{-ka*t}) \quad (21)$$

onde f é a biodisponibilidade, D é a dose administrada, Vd é o volume de distribuição, k_a é a constante de velocidade de absorção e k_e de eliminação.

A partir dos parâmetros farmacocinéticos obtidos pela modelagem dos dados experimentais, foram calculados $ASC_{0-\infty}$, Cl_{TOT} , C_{max} e t_{max} , (Equações 22 a 25) (SHARGEL, WU-PONG e YU, 2004)

$$ASC_{0-\infty} = \frac{f * D}{Cl_{TOT}} \quad (22)$$

$$Cl_{TOT} = k_e * Vd_{SS} \quad (23)$$

$$Cp_{MAX} = \left(\frac{f * D}{Vd_{SS}} \right) * \left(e^{-k_e * t_{MAX}} \right) \quad (24)$$

$$t_{MAX} = \ln \left(\frac{k_e / k_a}{k_e - k_a} \right) \quad (25)$$

4.4.5.5 Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos da IndOH determinados a partir dos perfis plasmáticos resultantes da administração i.v. e p.o. de IndOH e de IndOEt, livre e nanoencapsulado, obtidos pelas duas abordagens farmacocinéticas foram comparados estatisticamente por teste t de Student ($\alpha = 0,05$) a fim de confirmar a adequação do modelo compartimental escolhido.

Comparações também foram realizadas entre parâmetros farmacocinéticos determinados para os diferentes grupos experimentais. No caso de comparações entre dois grupos (IndOH i.v. e IndOEt i.v.), foi empregado teste t de Student com $\alpha = 0,05$. No caso de parâmetros farmacocinéticos determinados para os diversos grupos com administração oral a comparação foi realizada por ANOVA ($\alpha = 0,05$). As diferenças significativas evidenciadas foram determinadas por teste de Tuckey, empregando-se $\alpha = 0,05$.

4.4.5.6 Avaliação do local de absorção após administração oral de IndOEt nanoencapsulado

Para avaliação do local da absorção de IndOEt nanoencapsulado pela via oral, a suspensão da substância foi administrada p.o. a ratos Wistar machos submetidos a jejum de 18 h, na dose de 10 mg/kg, a mesma utilizada nos experimentos de farmacocinética. Quatro animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos tempos de 15 min, 1 e 2 h. Imediatamente após sacrifício, coletou-se, com uso de seringas de 1 mL, sangue da veia porta e sangue periférico por punção cardíaca. O sangue foi transferido para tubos tipo Eppendorf previamente heparinizados e centrifugados conforme descrito no item 4.4.5.2. Posteriormente, foram retirados cirurgicamente uma porção do fígado, baço e o intestino delgado, sendo esse separado em duodeno (primeira porção correspondente a 17% do intestino delgado), jejuno (segunda porção equivalente a 34% do intestino delgado) e íleo (porção restante, do fim do jejuno à junção ileocecal).

As porções de fígado e o baço de cada animal foram pesados, embalados em papel alumínio e congelados - 4 °C. Cada porção de intestino coletada teve seu conteúdo removido mecanicamente da parede com auxílio de 0,3 mL de Ringer e, imediatamente após a pesagem, foram homogeneizadas por 3 minutos, em banho de gelo, com uso de acetonitrila (3,0 mL para as paredes e 1,0 mL para os conteúdos). Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos Falcon e centrifugadas por 20 min a 5100 rpm (5292 x g). Um volume de 100 µL de sobrenadante foi diluído pela adição de 200 µL de acetonitrila e, posteriormente analisado por CLAE para quantificação de IndOEt e IndOH. Adicionalmente, quatro animais foram avaliados quanto a uma possível bioadesão das nanopartículas e a contaminação do conteúdo nas amostras de parede. Para tanto, quatro animais foram sacrificados 1 h após a administração das nanocápsulas e, uma vez retirados fígado, baço e porções do intestino delgado, esses foram pesados. As porções do intestino delgado tiveram seu conteúdo separado da parede com auxílio de 0,3 mL de Ringer. Posteriormente, a parede de cada porção foi aberta longitudinalmente e limpa com algodão embebido em salina para remoção do conteúdo restante e do

muco aderido. O processamento das amostras foi realizado conforme descrito anteriormente.

A análise por CLAE para quantificação de IndOEt e IndOH em fígado e baço foi precedida pelo processamento das amostras. As porções de fígado e o baço foram descongeladas e processadas conforme descrito para as amostras de intestino descritas previamente. As concentrações de IndOEt e IndOH foram determinadas por CLAE e a quantidade de cada um dos analitos determinada em função do peso do órgão (Equação 26), como descrito previamente por NIX e colaboradores (1991):

$$C_T = \frac{C_s * V_s}{P} \quad (26)$$

onde C_T é a quantidade do analito no tecido (g/mL), C_s , a concentração de analito no sobrenadante ($\mu\text{g/mL}$), V_s , o volume do sobrenadante (mL) e P , a massa de amostra tecidual (g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do éster etílico de indometacina

O éster etílico de indometacina foi obtido por condensação do etanol com IndOH após adição de diciclohexilcarbodiimida (DCC) para ativação do grupamento ácido carboxílico. O ácido ativado resultante reagiu com o etanol, completando a reação.

O rendimento após purificação por cromatografia em coluna foi de 75%. A pureza do IndOEt foi avaliada por CLAE com detecção por arranjo de diodos. O cromatograma não apresentou outros picos além do relacionado com o próprio produto, o teor de pureza do respectivo pico foi de 1,00, indicando a ausência de contaminantes passíveis de serem detectados. O éster etílico foi utilizado na preparação das nanocápsulas conforme descrito no item 4.4.2.

5.2 Caracterização das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas preparadas foram avaliadas em relação a seu aspecto macroscópico, doseamento, pH e tamanho de partícula.

As formulações empregadas nos estudos farmacocinéticos apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, com teor de $1,04 \pm 0,09$ mg/mL. Os valores de pH apresentaram média de $5,62 \pm 0,45$ e a média do diâmetro de partícula foi de 267 ± 31 nm. Esses resultados reproduziram os relatados por Cruz (2005), em que os resultados de teor, pH e diâmetro de partícula para as nanocápsulas contendo IndOEt foram de $0,98 \pm 0,01$ mg/mL, $5,31 \pm 0,06$ e 278 ± 29 nm, respectivamente.

A taxa de associação do IndOEt ao sistema nanoparticulado foi considerada de 100%, uma vez que sua solubilidade em meio aquoso é inferior a 1 µg/mL. A possibilidade de estabilização de nanocristais pelos tensoativos presentes na formulação foi descartada por Pohlmann e colaboradores (2004), através da avaliação da uma nanodispersão do éster em água na presença de polissorbato 80

e de monoestearato de sorbitano. Nesse experimento, foi observada a formação imediata de um precipitado, que apresentou ponto de fusão compatível com o do éster etílico de indometacina, indicando que os tensoativos não foram capazes de proporcionar a dispersão do mesmo em meio aquoso.

Considerando os resultados obtidos para a caracterização das nanopartículas, essas foram consideradas adequadas para a realização dos estudos de farmacocinética.

5.3 Validação da metodologia analítica por CLAE

A validação de métodos bioanalíticos inclui todos os procedimentos que demonstram que um método usado para a medida quantitativa de um analito em uma matriz biológica é confiável e reproduzível para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados em uma validação são seletividade, linearidade, exatidão, precisão intermediária e repetibilidade (FDA, 2001).

5.3.1 Seletividade

A seletividade se refere à capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes na amostra (FDA, 2001). A Figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos após a análise de branco de plasma, amostra da curva contendo IndOH e IndOEt em plasma e uma amostra obtida experimentalmente após administração p.o. de IndOEt nanoencapsulado. Tais cromatogramas evidenciam que tanto a IndOH quanto o IndOEt, com tempos de retenção de 2,6 min e 5,4 min respectivamente, estão isentos de picos interferentes em todas as situações analisadas. Os cromatogramas relativos à amostra obtida experimentalmente demonstram que possíveis metabólitos formados *in vivo* não prejudicam a determinação dos analitos. O valor de fator de separação entre os

picos de plasma (pico 1, Figura 9) e de IndOH foi de 1,4; entre os picos do provável metabólito (cromatograma V, pico 2) e IndOH, de 1,3 e entre IndOH e IndOEt, de 1,9. O valor de resolução entre os picos de plasma (pico 1) e de IndOH foi de 1,75, entre os picos do provável metabólito (cromatograma IV, pico 2) e IndOH, de 1,22 e entre IndOH e IndOEt de 4,14. Apesar do valor de R entre os picos 2 do cromatograma IV e o pico de IndOH ser inferior a 1,5, consideramos os valores obtidos adequados, comprovando a seletividade do método empregado.

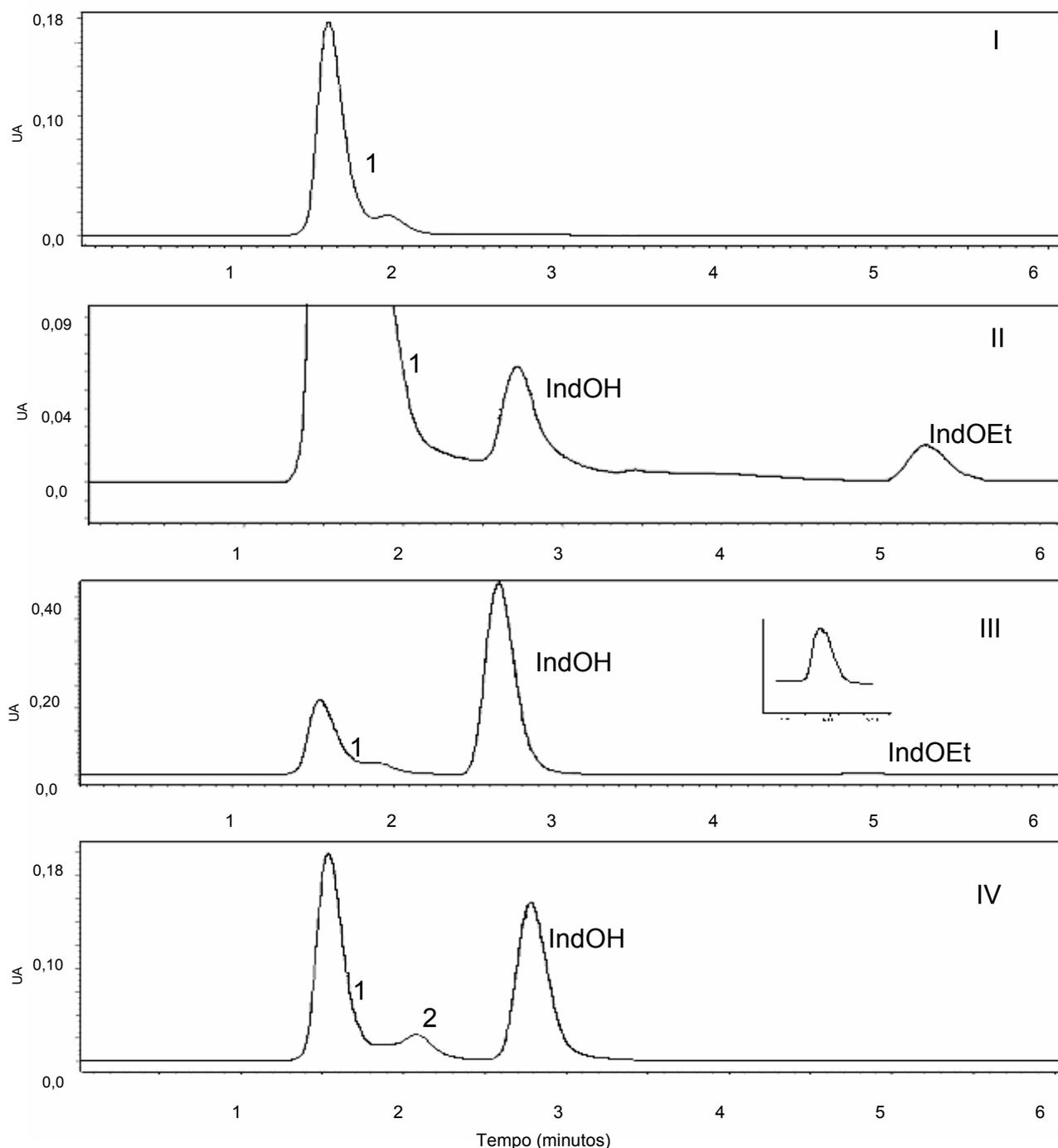


Figura 9. Cromatogramas obtidos por análise por CLAE: (I) branco de plasma; (II) amostra da curva contendo IndOH e IndOEt na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em plasma; (III) amostra obtida experimentalmente 5 minutos após administração i.v. de IndOEt nanoencapsulado (5 mg/kg), correspondente a IndOH e IndOEt nas concentrações de 88,5 e 2,9 $\mu\text{g/mL}$; (IV) amostra obtida experimentalmente 6 horas após administração oral de IndOH (10 mg/kg), correspondente à concentração de 30,0 $\mu\text{g/mL}$. 1. Pico de plasma, 2. pico de provável metabólito da IndOH.

5.3.2 Linearidade

O parâmetro linearidade é avaliado através da verificação de uma relação linear entre a concentração do analito na amostra e a resposta produzida no detector (FDA, 2001). Para a avaliação da linearidade de cada analito foram preparadas três curvas padrão por três dias, totalizando nove curvas, compreendendo a faixa de concentração de 0,5 a 40,0 µg/mL de cada analito (IndOEt e IndOH) em plasma de ratos. Visando a utilização da faixa de concentração mencionada, foi necessário o emprego de fator de peso 1/x no cálculo da regressão linear para ambos analitos. O emprego de fator de peso pode ser justificado pela ampla faixa de concentração empregada na validação da metodologia analítica, necessária para a determinação dos perfis plasmáticos obtidos em todos os experimentos.

As curvas padrão em plasma de IndOH e de IndOEt analisadas têm sua média apresentada nas Figuras 10 e 11, respectivamente. O coeficiente de correlação (r) e a equação da reta foram calculados para as nove curvas de IndOH e de IndOEt avaliadas durante a validação e os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Os coeficientes de correlação calculados para as curvas padrão de ambos analitos apresentaram valores superiores a 0,999, compatíveis com o valor mínimo de 0,98 estipulado para métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003).

A linearidade foi confirmada pelo emprego de ANOVA ($\alpha = 0,05$) demonstrando ausência de desvio de linearidade e comprovando a existência de regressão linear significativa.

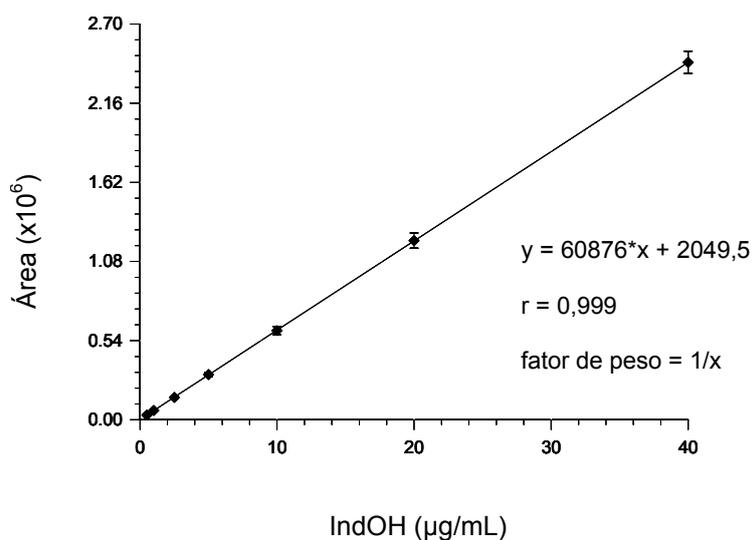


Figura 10. Média das nove curvas padrão de IndOH em plasma empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (média \pm desvio padrão).

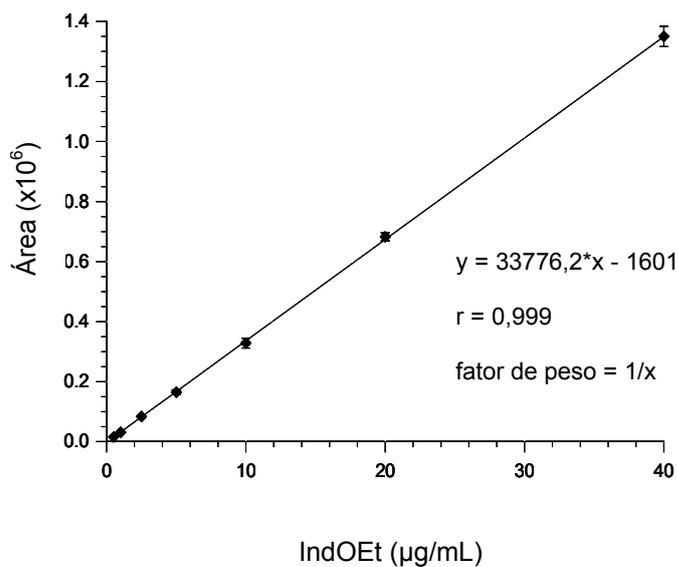


Figura 11. Média das nove curvas padrão de IndOEt em plasma empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação (média \pm desvio padrão).

Tabela 8. Valores individuais de coeficiente de correlação e de intercepto e inclinação obtidos para as curvas padrão de IndOH avaliadas na validação.

Dias	Curvas	Intercepto	Inclinação	Coeficiente de correlação
1	1	5073,1	61497	0,99996
	2	1508,3	57347	0,99987
	3	-198,96	61298	0,99979
2	1	-403,57	63154	0,99999
	2	-1026,3	61018	0,99988
	3	-379,91	60074	0,99980
3	1	3784,7	63651	0,99967
	2	4691	60453	0,99973
	3	5397,1	59397	0,99958
Média geral		2049,5	60876,6	0,99981
D.P.		2670,81	1901,88	
D.P.R.			3,0	

D.P.: desvio padrão; D.P.R.: desvio padrão relativo.

Tabela 9. Valores individuais de coeficiente de correlação e de intercepto e inclinação obtidos para as curvas padrão de IndOEt avaliadas na validação

Dias	Curvas	Intercepto	Inclinação	Coeficiente de correlação
1	1	677,13	33442	0,99981
	2	-2086	33919	0,99948
	3	2097	33862	0,99969
2	1	-3684,1	32754	0,99989
	2	-2254,1	33786	0,99989
	3	-1844,5	32974	0,99959
3	1	-1663	34328	0,99939
	2	-2216,3	33906	0,99986
	3	-3435,3	35015	0,99993
Média geral		-1601,0	33776,2	0,99973
D.P.		1859,86	678,59	
D.P.R.			2,0	

D.P.: desvio padrão; D.P.R.: desvio padrão relativo.

5.3.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico descreve o quão próximo os valores de concentração determinados estão dos valores reais (FDA, 2001). Na Tabela 10, constam os valores médios e as faixas de exatidão do limite inferior de quantificação e dos controles de qualidade (0,8, 8,0 e 32,0 µg/mL) obtidos ao longo dos três dias de validação do método analítico. Tanto para a IndOH quanto para o IndOEt, os valores de exatidão calculados para as concentrações dos controles de qualidade avaliadas permaneceram entre os limites estipulados pelo FDA (2001), de 15% de desvio do valor real e 20% para o limite inferior de quantificação.

Tabela 10. Valores de exatidão calculados para amostras de LIQ e controle de qualidade de IndOH e de IndOEt analisados por CLAE ao longo da validação (*LIQ: limite inferior de quantificação; DP: desvio padrão).

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Faixa de concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	Média* ($\mu\text{g/mL}$)	D.P.R.	Faixa de exatidão (%)
IndOH				
LIQ*	0,47 - 0,54	0,50	0,024	93,2 – 107,7
0,8	0,73 - 0,88	0,86	0,079	91,3 – 110,0
8,0	7,59 - 9,15	8,29	0,569	94,9 – 114,4
32,0	29,2 - 35,1	31,83	1,985	91,2 – 109,7
IndOEt				
LIQ*	0,49 - 0,55	0,51	0,019	97,8 – 110,4
0,8	0,73 - 0,88	0,8	0,052	91,2 – 110,0
8,0	7,88 - 9,02	8,43	0,409	98,5 – 112,8
32,0	31,7 - 34,2	32,7	0,971	99,0 – 106,9

* n = 9; D.P.: desvio padrão; D.P.R.: desvio padrão relativo.

5.3.4 Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados de uma série de medidas realizadas empregando-se o método analítico a amostras equivalentes. A precisão pode ser baseada na avaliação dos coeficientes de variação dessas medidas, quando realizadas em análises individuais – precisão intermediária ou interdica - e quando realizadas em curto período de tempo – repetibilidade ou precisão intradia (FDA, 2001).

A avaliação da repetibilidade e precisão intermediária calculadas com base nas concentrações determinadas em triplicata dos controles de qualidade de IndOH e de IndOEt estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. Os valores de coeficiente de variação calculados para as amostras avaliadas de ambos os analitos apresentaram

valores inferiores ao limite de 15% preconizado pelo FDA (2001), indicando que o método é preciso quando executado várias vezes no mesmo dia e em dias diferentes.

Tabela 11. Coeficiente de variação intradia e interdia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de IndOH em plasma de ratos.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média*	D.P.	D.P.R. (%)
Varição intradia				
LIQ**	1	0,51	0,016	3,08
	2	0,52	0,007	1,44
	3	0,47	0,007	1,45
0,8	1	0,88	0,10	11,80
	2	0,84	0,07	8,24
	3	0,79	0,05	6,18
8,0	1	8,45	0,65	7,73
	2	8,13	0,36	4,46
	3	8,15	0,80	9,78
32,0	1	32,66	2,00	6,12
	2	30,99	1,08	3,48
	3	32,01	2,91	9,09
Varição interdia				
LIQ**		0,52	0,03	4,84
0,8		0,86	0,08	6,86
8,0		8,29	0,57	6,24
32,0		31,83	1,99	9,16

* n = 3/dia; ** LIQ: limite inferior de quantificação; D.P.: desvio padrão; D.P.R.: desvio padrão relativo.

Tabela 12. Coeficiente de variação intradia e interdia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de IndOEt em plasma de ratos.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média*	D.P.	D.P.R. (%)
Varição intradia				
LIQ**	1	0,52	0,03	6,18
	2	0,52	0,01	1,83
	3	0,50	0,01	2,69
0,8	1	0,81	0,03	3,88
	2	0,8	0,08	9,57
	3	0,76	0,05	5,89
8,0	1	8,18	0,36	4,34
	2	8,68	0,42	4,87
	3	8,25	0,39	4,70
32,0	1	32,42	0,76	2,34
	2	32,99	1,17	3,53
	3	32,75	1,26	3,85
Varição interdia				
LIQ**		0,52	0,02	3,75
0,8		0,80	0,05	6,48
8,0		8,43	0,41	4,85
32,0		32,70	0,97	2,97

* n = 3/dia; ** LIQ: limite inferior de quantificação; D.P.: desvio padrão; D.P.R.: desvio padrão relativo.

5.3.5 Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação de uma curva padrão é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão

de 20% e exatidão de 80 a 120% (FDA, 2001). O método analítico para determinação de IndOH e IndOEt por CLAE apresentou um limite inferior de quantificação de 0,5 µg/mL para ambos os analitos. O limite inferior de quantificação também foi determinado pela Equação 1, apresentando valores de 0,55 µg/mL para IndOEt e de 0,44 µg/mL para IndOH.

Como todos os parâmetros determinados encontraram-se dentro dos limites oficiais preconizados (FDA, 2001), o método foi considerado validado para quantificação de IndOEt e de IndOH simultaneamente.

5.4 Avaliação da recuperação do éster etílico de indometacina nanoencapsulado em sangue e plasma

O éster etílico de indometacina nanoencapsulado, quando adicionado a plasma e a sangue de ratos em uma concentração de 20 µg/mL (ou $6,48 \times 10^{-5}$ mmol/mL), apresentou recuperação em torno de 100%, entretanto foi parcialmente hidrolisado em todas as amostras (Tabela 13). A hidrólise do éster foi mais pronunciada em sangue do que em plasma, possivelmente devido à presença de esterases não só plasmáticas, mas também nos eritrócitos, aumentando assim a taxa de formação de indometacina (O'DRISCOLL, 2002). Apesar da hidrólise parcial do éster observada no experimento, a recuperação em torno de 100% comprova a eficiência do processo de precipitação empregando com acetonitrila para a retirada do éster do plasma e do sangue, mesmo quando nanoencapsulado, garantindo a acurácia das concentrações plasmáticas determinadas nas amostras obtidas dos experimentos de farmacocinética.

Soares (2003) avaliou a hidrólise *in vitro* de IndOEt nanoencapsulado em plasma e não evidenciou a formação de IndOH até 24 h de experimento. Esse resultado foi atribuído à manutenção do éster no núcleo da nanocápsula, em função de sua baixa solubilidade em água e fluidos biológicos. A repetição do experimento de Soares não reproduziu os resultados inicialmente obtidos, pois se pode observar a hidrólise do éster e a presença de IndOH nas amostras. Desse modo, os resultados aqui obtidos são mais compatíveis com os descritos por CRUZ e

colaboradores (2006a) que evidenciaram a presença de pequena quantidade de éster adsorvida na matriz polimérica das nanocápsulas, a qual pode ser rapidamente hidrolisada, levando a formação de IndOH em sangue e plasma.

Tabela 13. Concentrações médias de éster etílico de indometacina e de indometacina formada em sangue e em plasma de ratos.

Amostra	Conc. Média IndOEt* (mmol/mL)	Conc. Média IndOH* (mmol/mL)	Conc. Total (mmol/mL)	Recuperação (%)
Sangue	2,20E ⁻⁰⁵	4,12E ⁻⁰⁵	6,32E ⁻⁰⁵	97,48
Plasma	4,90E ⁻⁰⁵	1,84E ⁻⁰⁵	6,74E ⁻⁰⁵	104,01

* n = 3

5.5 Avaliação farmacocinética da indometacina e do éster etílico de indometacina

A indometacina em suspensão aquosa e seu éster etílico nanoencapsulado foram avaliados quanto a sua farmacocinética após administração oral e intravenosa em dose única de 10 mg/kg. Apenas no caso do IndOEt nanoencapsulado administrado i.v., os animais receberam a dose de 5 mg/kg, em virtude do alto volume de suspensão de nanocápsulas necessário para uma dose mais elevada. A escolha das doses foi feita considerando as condições empregadas no estudo de atividade antiedemetogênica (CRUZ *et al.*, 2006b), em que os animais receberam suspensão aquosa de IndOH (1,0 mg/mL) contendo 1% de polissorbato 80 ou nanocápsulas de IndOEt (1,0 mg/mL) por via oral na dose de 10 mg/kg.

O IndOEt foi, adicionalmente, administrado por via oral (10 mg/kg) na forma de suspensão aquosa (1,0 mg/mL) contendo 1% de polissorbato 80, para facilitar a dispersão do éster, e na forma de suspensão aquosa sem adição de tensoativo. Tais experimentos visaram estabelecer uma comparação entre a velocidade e extensão da absorção do IndOEt livre e nanoencapsulado, bem como avaliar a influência do tensoativo na biodisponibilidade do IndOEt quando administrado na forma livre.

Uma tabela com o resumo dos principais parâmetros farmacocinéticos determinados para cada grupo investigado encontra-se no Anexo 2, para facilitar a comparação dos resultados obtidos descritos a seguir.

5.5.1 Perfis plasmáticos de IndOH

O perfil plasmático médio de IndOH obtido após a administração da suspensão de IndOH i.v. na dose de 10 mg/kg está apresentado na Figura 12. Os perfis individuais permitiram a determinação dos parâmetros farmacocinéticos médios por abordagem não-compartimental apresentados na Tabela 14.

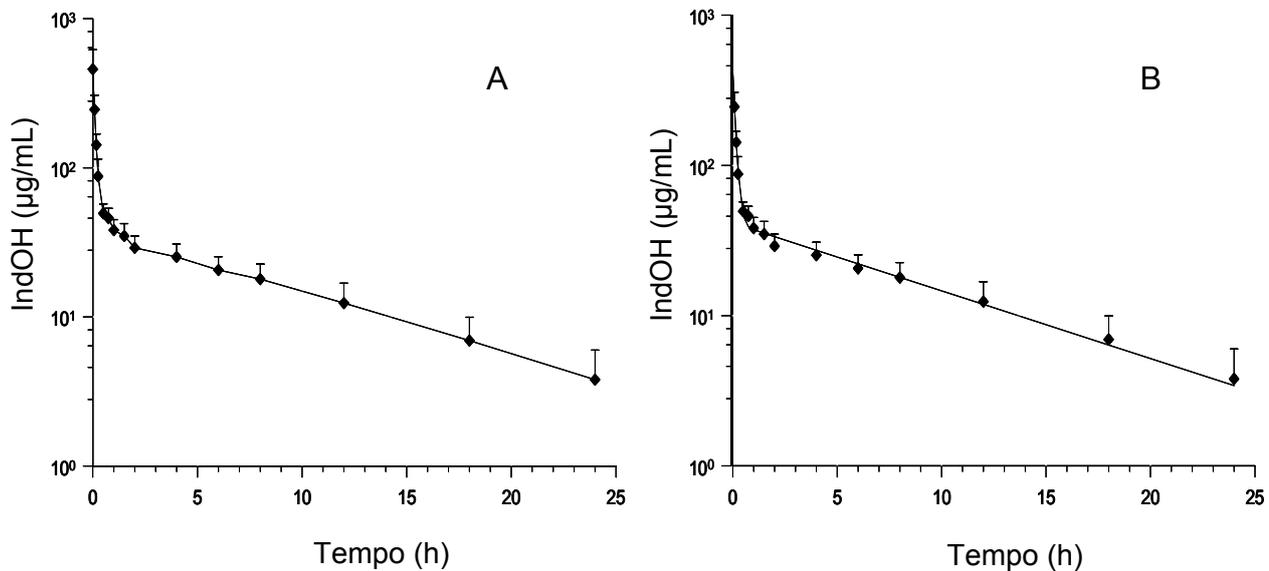


Figura 12. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração da dose de 10 mg/kg i.v. a ratos machos Wistar (n = 9) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) modelado pelo modelo aberto de 2 compartimentos.

A análise farmacocinética de perfis plasmáticos tem com o pré-requisito a realização de coletas de amostras por um tempo que corresponda a, pelo menos, 80% da $ASC_{0-\infty}$ calculada com base nesse perfil. Para garantir que tal requisito fosse cumprido, foram realizadas coletas por até 24 h após a administração do fármaco assegurando a confiabilidade no cálculo dos parâmetros, especialmente

relacionados com a fase de eliminação das substâncias. Como se determinou um tempo de meia-vida em torno de 7 h, as coletas corresponderam a pelo menos três $t_{1/2}$, e a $ASC_{EXTRAPOLADA}$ variou de 3,9 a 10,8%, assegurando o cumprimento do critério.

Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH i.v. 10 mg/kg (n = 9).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
λ (h^{-1})	0,11 ± 0,04
$t_{1/2}$ (h)	6,8 ± 2,0
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL/h}$)	475 ± 109
Cl_{TOT} (mL/h/kg)	22,2 ± 5,5
MRT (h)	8,6 ± 2,6
Vd_{SS} (mL/kg)	180 ± 28

D.P.: desvio padrão

A constante de eliminação apresentou valor de $0,11 \pm 0,04 h^{-1}$ e o tempo de meia-vida, $6,8 \pm 2,0 h$. O Cl_{TOT} foi de $22,2 \pm 5,5 \text{ mL/h/kg}$ e o de Vd_{SS} , $180,2 \pm 27,8 \text{ mL/kg}$. Tais resultados estão de acordo com o encontrado na literatura. Valores de constante de velocidade de eliminação entre $0,13$ e $0,05 h^{-1}$ têm sido relatados para IndOH administrada i.v., assim como valores de Cl_{TOT} $4,9 \pm 0,66$ e $4,07 \pm 0,26 \text{ mL/h}$ e de $ASC_{0-\infty}$ $499,05 \pm 72,7 \mu\text{g/mL/h}$ para dose de 12 mg/kg (SRINATH e DIWAN, 1998; SRINATH *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; PALAKURTHI *et al.*, 2005). Nesse trabalho, a $ASC_{0-\infty}$ apresentou um valor de $475 \pm 109 \mu\text{g/mL/h}$, demonstrando a proximidade dos parâmetros determinados .

O perfil plasmático de IndOH após a administração i.v. apresenta características de 2 compartimentos, com uma inclinação referente à fase de distribuição e outra referente à fase de eliminação. A análise compartimental dos perfis individuais obtidos com a administração de IndOH i.v. (10 mg/kg) foi realizada com o modelo aberto de 2 compartimentos com uso de fator de peso igual a 1,

permitindo assim melhor caracterização da fase de eliminação. A adequabilidade do modelo foi avaliada pelo ajuste do modelo aos perfis plasmáticos (Figura 12B), bem como pelo coeficiente de correlação calculado a partir da regressão e do valor de MSC. Os valores de coeficiente de correlação variaram entre 0,989 e 0,999 e os de MSC, entre 3,3 e 5,9, indicando um ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

Os parâmetros farmacocinéticos médios calculados com base na análise compartimental estão apresentados na Tabela 15. A comparação estatística, empregando teste t ($\alpha = 0,05$), entre os parâmetros farmacocinéticos calculados pelas análises não-compartimental e compartimental também é considerada uma ferramenta para comprovar a adequação do modelo compartimental escolhido. Quando avaliados os parâmetros $ASC_{0-\infty}$, Vd_{SS} , Cl_{TOT} e tempo de meia-vida, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas, sendo o modelo aberto de 2 compartimentos considerado adequado para descrever os dados experimentais.

Tabela 15. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental empregando modelo aberto de 2 compartimentos aos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH i.v. 10 mg/kg (n = 9).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
A (µg/mL)	421,1 ± 161,2
B (µg/mL)	41,4 ± 6,4
α (h ⁻¹)	8,4 ± 2,6
β (h ⁻¹)	0,11 ± 0,03
k_{21} (h ⁻¹)	0,89 ± 0,25
k_{10} (h ⁻¹)	1,11 ± 0,46
k_{12} (h ⁻¹)	82,1 ± 50,7
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	450 ± 112
V _C (mL/kg)	26,9 ± 19,2
Vd _{SS} (mL/kg)	192 ± 26
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	23,5 ± 6,2
t _{½α} (h)	0,09 ± 0,04
t _{½β} (h)	6,75 ± 1,90

D.P.: desvio padrão.

O perfil plasmático médio de IndOH, obtido após a administração oral da dose de 10 mg/kg pode ser observado na Figura 13.

Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da análise não-compartimental estão apresentados na Tabela 16. A constante de velocidade de eliminação determinada apresentou um valor médio de 0,12 ± 0,01 h, não diferindo estatisticamente ($\alpha = 0,05$) do valor determinado a partir dos perfis de IndOH i.v., assim como o tempo de meia-vida, que apresentou um valor de 5,7 ± 0,7 h, e o Cl_{TOT}, 22,6 ± 6,9 mL/h/kg. A ausência de diferença entre tais parâmetros apenas

indica a manutenção da magnitude do metabolismo e da eliminação da indometacina em diferentes vias de administração. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais de mesma magnitude foram encontrados na literatura, tais como de tempo de meia-vida de 4,5 h, $C_{p_{max}}$ de $22,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, $ASC_{0-\infty}$ de $189,3 \mu\text{g/mL/h}$ e t_{max} de 2 e 3,6 h (doses de 5 e 20 mg/kg) determinados para IndOH após administração por via oral a ratos (AMMOURY *et al.*, 1991 e GABR, 1997). A $ASC_{EXTRAPOLADA}$ variou de 3,9 a 10,8%, assegurando uma adequada caracterização da fase de eliminação da indometacina após administração oral.

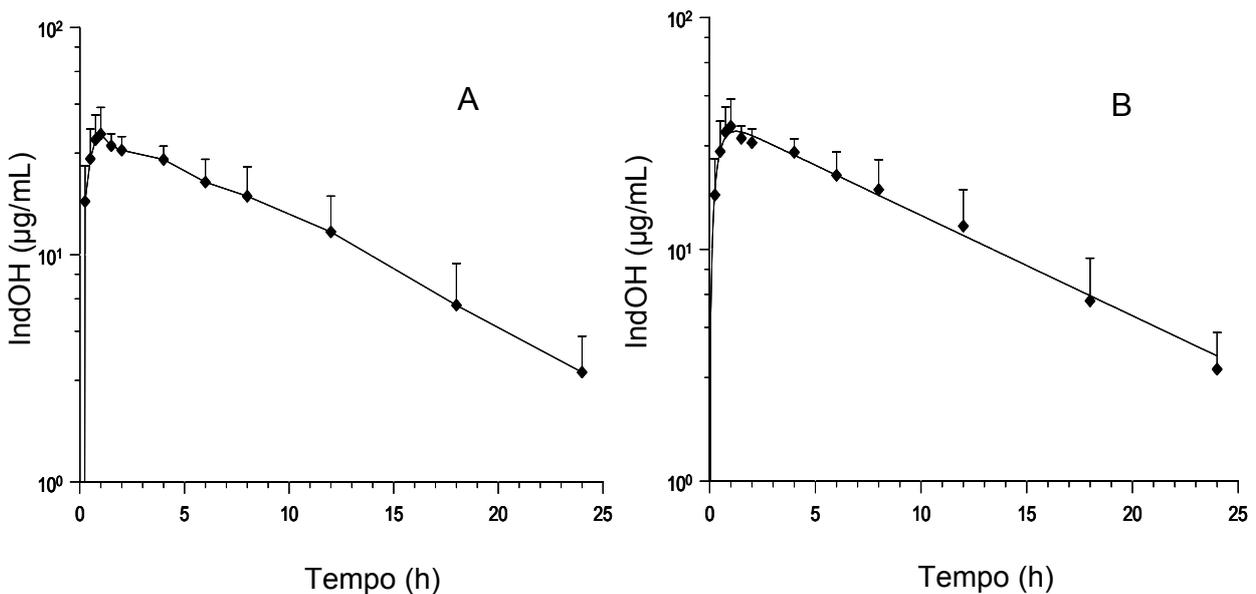


Figura 13. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 7) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) modelado pelo modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem.

A $ASC_{0-\infty}$ média determinada para os perfis da IndOH quando administrada p.o. também não apresentou diferença significativa do valor médio obtido para IndOH i.v. (365 ± 97 e $475 \pm 109 \mu\text{g/h/mL}$, respectivamente), indicando uma absorção quase completa da indometacina administrada p.o. Esse dado pode ser confirmado pela biodisponibilidade absoluta (f) que se aproxima de 80%.

Os perfis plasmáticos individuais foram adequadamente descritos pelo modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem, como pode ser observado na Figura 13B para o perfil médio.

Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH p.o. 10 mg/kg (n = 7).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
λ (h ⁻¹)	0,12 ± 0,01
t _{1/2} (h)	5,7 ± 0,7
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	365 ± 97
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	22,6 ± 6,9
Cp _{max} (µg/mL)	35,8 ± 9,1
t _{max} (h)	1,2 ± 0,6
f (%)	77

D.P.: desvio padrão.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos pela abordagem compartimental têm seus valores médios apresentados na Tabela 17. Para análise compartimental dos perfis individuais empregou-se peso 1, resultando em valores de coeficiente de correlação entre 0,964 e 0,998 e MSC entre 2,17 e 4,96, que podem ser considerados adequados.

A comparação por teste t dos parâmetros ASC_{0-∞}, Cp_{max}, t_{max}, Cl_{TOT}, ke e t_{1/2}, determinados por ambas abordagens, confirmou a adequação do modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem para a descrição dos dados experimentais, uma vez que nenhuma diferença estatística foi observada (α = 0,05). Assim como os parâmetros farmacocinéticos determinados por abordagem não-compartimental para IndOH administrada p.o., os obtidos pela abordagem compartimental não apresentaram diferenças significativas em relação aos determinados para a IndOH administrada i.v.

Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental empregando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem aos dados plasmáticos resultantes da administração de IndOH p.o. 10 mg/kg (n = 7).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
ka (h ⁻¹)	2,8 ± 1,4
ke (h ⁻¹)	0,11 ± 0,04
t _{1/2} (h)	6,75 ± 2,29
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	366 ± 109
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	22,7 ± 7,8
Vd _{SS} (mL/kg)	203 ± 32
Cp _{max} (µg/mL)	32,7 ± 5,6
t _{max} (h)	1,4 ± 0,5

D.P.: desvio padrão.

5.5.2 Perfis plasmáticos de IndOEt e de IndOH formada *in vivo*

5.5.2.1 Perfis plasmáticos obtidos após administração oral e intravenosa de IndOEt nanoencapsulado

A administração de IndOEt nanoencapsulado pela via i.v. na dose de 5 mg/kg possibilitou a quantificação de IndOEt apenas nos tempos de 5 e 10 min pós administração, em alguns animais. As concentrações determinadas nesses casos apresentaram médias de 1,25 e 0,36 µg/mL para 5 e 10 min, respectivamente, sendo essa última abaixo do limite inferior de quantificação do método. Nos tempos subsequentes os níveis foram indetectáveis. Assim, foi inviabilizado o monitoramento do desaparecimento do IndOEt *in vivo* a partir das nanocápsulas administradas. Os perfis de IndOH após administração do éster nanoencapsulado foram construídos para todos os animais. A impossibilidade de se construir um perfil

plasmático de IndOEt indica um rápido desaparecimento da substância no plasma, seja por liberação da nanopartícula e posterior hidrólise, seja por uma rápida distribuição das nanopartículas para os tecidos, com participação do sistema fagocitário mononuclear. O perfil médio da IndOH formada *in vivo* (Figura 14) apresenta-se semelhante ao perfil de IndOH administrada i.v., porém em concentrações menores, confirmando a hipótese de uma rápida remoção do IndOEt do plasma, com surgimento de IndOH.

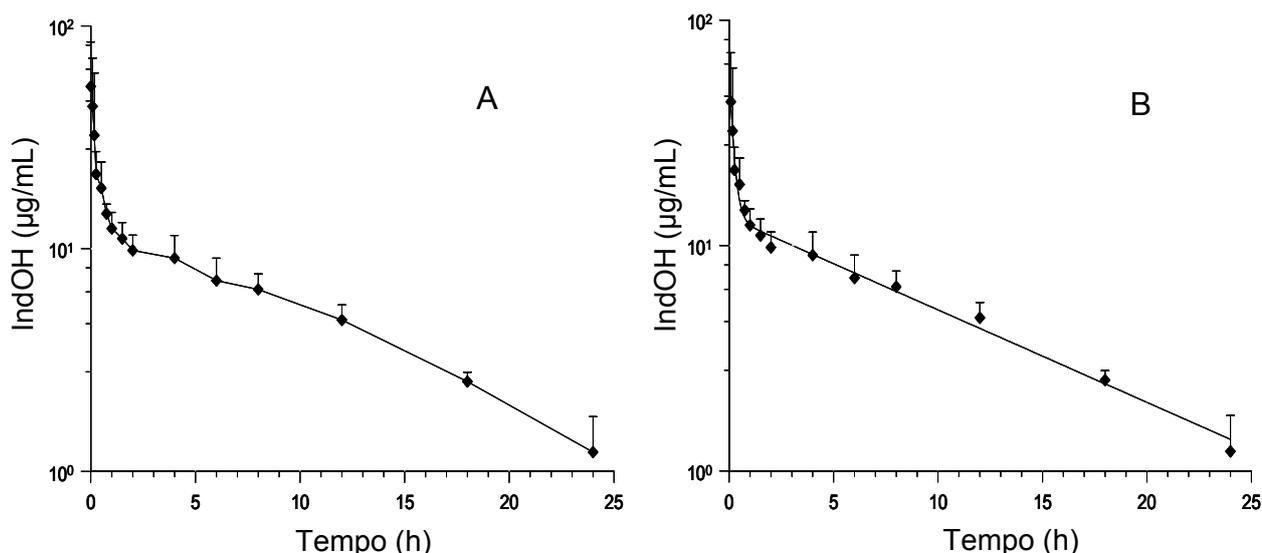


Figura 14. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração i.v. *bolus* da dose de 5 mg/kg de IndOEt nanoencapsulado a ratos Wistar machos (n = 7) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) utilizando pelo modelo aberto de 2 compartimentos.

A partir dos perfis individuais obtidos com a administração intravenosa de IndOEt nanoencapsulado, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos para IndOH por abordagem não-compartimental (Tabela 18). Os valores calculados de constante de velocidade de eliminação e de tempo de meia-vida ($0,12 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ e $6,3 \pm 2,3 \text{ h}$, respectivamente) não foram significativamente diferentes daqueles calculados com base nos perfis de IndOH administrada como tal pela via i.v. ($\alpha = 0,05$). A $ASC_{\text{EXTRAPOLADA}}$ variou de 2,9 a 13,9%, assegurando uma adequada caracterização da fase de eliminação da indometacina.

A diferença de $ASC_{0-\infty}$ para os dois grupos pode ser explicada parcialmente pela diferença de doses administradas, ou seja, 10 mg/kg para IndOH i.v. e 5 mg/kg

para IndOEt nanoencapsulado i.v. Além disso, a dose de 5 mg/kg de IndOEt, quando convertida em IndOH *in vivo*, produz concentrações plasmáticas inferiores àquelas obtidas se fosse administrada a mesma dose de IndOH i.v., devido à relação de massas moleculares: IndOEt tem massa molecular de 385,67 g/mol e IndOH, de 357,65 g/mol. Assim, a dose teórica de IndOH administrada na dose de 5 mg/kg de IndOEt é de 4,64 mg/kg. A relação de ASC_{0-∞} médias de IndOH administrada i.v. e IndOH formada *in vivo* a partir do éster nanoencapsulado i.v., quando ajustadas à dose correspondente em IndOH, foi de 0,68, sugerindo que outros fatores estão levando à diferença de ASC, além da diferença de dose de IndOH administrada.

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração i.v. bolus de IndOEt nanoencapsulado na dose de 5 mg/kg (n = 7).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
λ (h ⁻¹)	0,12 ± 0,04
t _{1/2} (h)	6,3 ± 2,4
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	151 ± 30 ^a
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	31,7 ± 7,1 ^a
MRT (h)	9,5 ± 1,2
Vd _{SS} (mL/kg)	295 ± 42 ^a
ASC _{0-∞} IndOEt i.v./ ASC _{0-∞} IndOH i.v. (%)	68

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação aos parâmetros calculados após administração i.v. de 10 mg/kg de IndOH (Tabela 14); D.P.: desvio padrão.

Os valores dos parâmetros Vd_{SS}, Cl_{TOT} e ASC_{0-∞} apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$) quando comparados aos obtidos com o grupo IndOH i.v. O aumento do Vd_{SS}, quando comparado ao da IndOH i.v., pode ser atribuído a distribuição diferenciada desses sistemas e a uma retirada parcial das nanocápsulas contendo IndOEt da circulação por células do sistema fagocitário mononuclear, apesar das nanocápsulas estarem revestidas com polissorbato 80, o que dificultaria a opsonização. A distribuição das nanocápsulas e sua retirada da circulação, imediatamente após a administração, reduziriam a quantidade de IndOEt

disponível para hidrólise no plasma, diminuindo a quantidade de IndOH formada e, portanto, justificaria as concentrações plasmáticas de IndOH formada inferiores às obtidas após sua administração i.v. O aumento do Cl_{TOT} observado em relação ao da IndOH i.v. também pode ser relacionado com a retirada das nanocápsulas contendo IndOEt da circulação, que levou à diminuição dos níveis de IndOH e à conseqüente redução de $ASC_{0-\infty}$. O aumento do Cl_{TOT} , na mesma magnitude do aumento de Vd_{SS} , levou à manutenção dos valores de tempo de meia-vida e de constante de velocidade de eliminação, indicando a manutenção da farmacocinética da indometacina. Assim, o aumento observado do Vd_{SS} e do Cl_{TOT} de IndOH após a administração de IndOEt nanoencapsulado estaria relacionado com uma distribuição diferenciada das nanopartículas contendo o éster e não representaria uma verdadeira mudança na farmacocinética da indometacina. As nanocápsulas contendo IndOEt poderiam apresentar uma distribuição preferencial para o fígado e baço, em função de sua possível captação por células do sistema fagocitário mononuclear. Uma acentuada distribuição para o cérebro também seria possível, uma vez que o revestimento de nanocápsulas com polissorbato 80 favorece a vetorização das mesmas para esse tecido e possibilita uma maior interação das nanocápsulas com a barreira hemato-encefálica, favorecendo a difusão e a captação do fármaco do pelo endotélio cerebral (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

O modelo selecionado para descrever a IndOH formada *in vivo* foi, assim como para os resultados de IndOH i.v., o de 2 compartimentos aberto com peso igual a 1. O perfil médio modelado resultante da análise compartimental desses dados está mostrado na Figura 14B. Os valores obtidos para coeficiente de correlação (0,973 a 0,994) e de MSC (2,37 a 3,88) corroboram a escolha do modelo.

A análise compartimental dos perfis individuais proporcionou o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, cuja média pode ser observada na Tabela 19. A análise estatística comparando os parâmetros farmacocinéticos determinados pelas abordagens não-compartimental e compartimental confirmou a adequação do modelo escolhido aos dados experimentais, uma vez que não houve diferenças significativas entre $ASC_{0-\infty}$, Vd_{SS} , Cl_{TOT} e tempo de meia-vida.

Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental empregando modelo de aberto de 2 compartimentos aos dados plasmáticos de IndOH formada *in vivo* pela administração i.v. *bolus* de IndOEt nanoencapsulado na dose de 5 mg/kg (n = 5).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
A (µg/mL)	75,3 ± 61,5
B (µg/mL)	13,3 ± 3,2
α (h ⁻¹)	8,7 ± 8,0
β (h ⁻¹)	0,10 ± 0,01
k ₂₁ (h ⁻¹)	1,4 ± 0,8
k ₁₀ (h ⁻¹)	0,55 ± 0,35
k ₁₂ (h ⁻¹)	55,5 ± 70,3
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	147 ± 29 ^a
Vc (mL/kg)	106 ± 100
Vd _{SS} (mL/kg)	322 ± 90 ^a
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	32,5 ± 7,3 ^a
t _{½α} (h)	0,20 ± 0,20
t _{½β} (h)	7,3 ± 0,7

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação aos parâmetros calculados após administração i.v. de 10 mg/kg de IndOH (Tabela 15); D.P.: desvio padrão

A administração p.o. de IndOEt nanoencapsulado, a exemplo do observado no grupo i.v., não possibilitou o acompanhamento do perfil plasmático de IndOEt em nenhum dos animais estudados. Assim, o perfil plasmático médio obtido após a administração oral de 10 mg/kg (Figura 15) está apresentado em função das concentrações plasmáticas de IndOH determinadas.

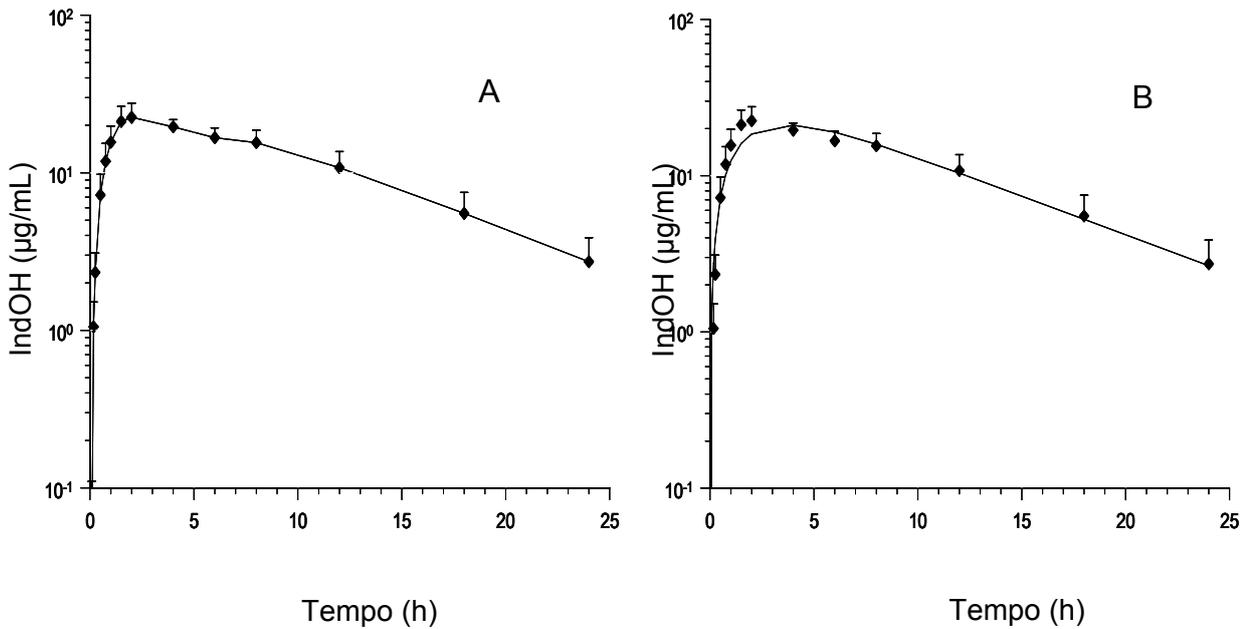


Figura 15. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral de IndOEt nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 8) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) utilizando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem.

Os parâmetros farmacocinéticos determinados por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos estão apresentados na Tabela 20. A biodisponibilidade da IndOH formada *in vivo* em relação à IndOH administrada como tal pela via i.v., compensando-se as diferenças de massas, foi de 0,65, levemente inferior à determinada para IndOH administrada pela via oral (Tabela 16). A $ASC_{EXTRAPOLADA}$ variou de 2,3 a 12,6%, assegurando uma adequada caracterização da fase de eliminação da indometacina.

A comparação estatística evidenciou diferenças significativas apenas dos parâmetros $C_{p_{max}}$ e t_{max} ($24,2 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$ e $2,2 \pm 0,8 \text{ h}$) obtidos para IndOH após a administração oral de IndOEt nanoencapsulado em relação aos calculados para o grupo IndOH p.o. ($35,8 \pm 9,1 \mu\text{g/mL}$ e $1,2 \pm 0,6 \text{ h}$). Tal diferença sugere uma absorção mais lenta de IndOH quando administrada como éster nanoencapsulado, o que pode estar relacionado tanto com a liberação de IndOEt a partir da formulação administrada – suspensão de nanocápsulas – como com a velocidade de formação de indometacina a partir do pró-fármaco no local de absorção.

Tabela 20. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg (n = 8).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
λ (h ⁻¹)	0,12 ± 0,03
t _{1/2} (h)	6,1 ± 1,4
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	289 ± 54
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	21,7 ± 3,8
Cp _{max} (µg/mL)	24,2 ± 3,5 ^a
t _{max} (h)	2,2 ± 0,8 ^a
f (%)	65 ^b

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOH 10 mg/kg (Tabela 16); ^bbiodisponibilidade determinada em relação à IndOH administrada i.v., compensando a diferença de massas das doses; D.P.: desvio padrão.

A Figura 15B mostra o perfil plasmático médio de IndOH após administração oral de IndOEt nanoencapsulada utilizando o modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem e peso 1. Os valores de coeficiente de correlação da modelagem individual variaram de 0,946 a 0,987 e os de MSC, de 1,68 a 3,00.

Os parâmetros farmacocinéticos médios determinados a partir da análise compartimental dos dados experimentais estão apresentados na Tabela 21. Os valores individuais de ASC_{0-∞}, Cl_{TOT}, ke e t_{1/2} obtidos a partir das abordagens não-compartimental e compartimental foram comparados estatisticamente por teste t. A análise estatística demonstrou ausência de diferenças significativas entre os mesmos, confirmando a qualidade da modelagem resultante do uso do modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem.

Tabela 21. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos para IndOH por abordagem compartimental empregando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem aos dados plasmáticos resultantes da administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg (n = 8).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
ka (h ⁻¹)	0,50 ± 0,22 ^a
ke (h ⁻¹)	0,13 ± 0,04
t _{1/2} (h)	5,5 ± 1,5
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	259 ± 53
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	24,3 ± 4,6
Vd _{SS} (mL/kg)	189 ± 47
Cp _{max} (µg/mL)	19,5 ± 1,9 ^a
t _{max} (h)	3,9 ± 0,9 ^a

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOH 10 mg/kg (Tabela 17); D.P.: desvio padrão.

A comparação da constante de velocidade de absorção (ka) da IndOH administrada via oral com a obtida a partir da administração oral de IndOEt nanoencapsulado evidenciou diferença significativa entre eles, reforçando as hipóteses apontadas anteriormente, ou seja, que a absorção mais lenta de IndOH estaria relacionada com a nanoencapsulação do IndOEt ou, ainda, com a velocidade de sua hidrólise após liberação para formação de IndOH.

5.5.2.2 Perfis plasmáticos obtidos após administração oral de IndOEt em suspensão aquosa

O IndOEt também foi administrado p.o. na forma de suspensão aquosa contendo 1% de polissorbato 80, do mesmo modo que a suspensão de IndOH foi administrada por essa via, a fim de se avaliar a disponibilidade para a absorção do IndOEt ou da IndOH dependendo da dissolução do IndOEt e não de sua liberação. A

suspensão de IndOEt obtida com a adição do tensoativo apresentou-se heterogênea, com partículas de diferentes tamanhos. Após a administração dessa suspensão, a análise das amostras obtidas evidenciou apenas a presença de IndOH no plasma. Assim, novamente, os perfis de concentração por tempo foram expressos em função das concentrações de IndOH formada (Figura 16).

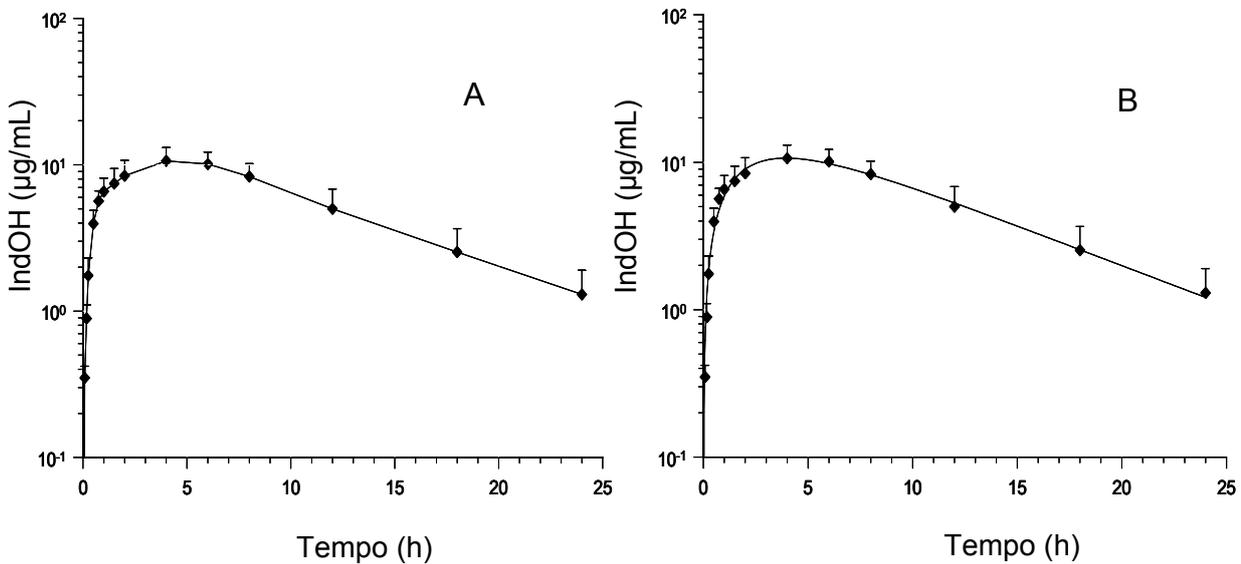


Figura 16. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa contendo 1% de polissorbato 80 a ratos machos Wistar (n = 11) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) utilizando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem.

Os parâmetros farmacocinéticos determinados pela abordagem não-compartimental estão apresentados na Tabela 22. A $ASC_{EXTRAPOLADA}$ variou de 3,8 a 14,9%, assegurando uma adequada caracterização da fase de eliminação da indometacina. A biodisponibilidade da IndOH a partir da administração da suspensão aquosa com 1% de polissorbato 80 de IndOEt em relação à IndOH i.v. foi de 32%, indicando uma menor absorção, quando comparada às nanocápsulas administradas p.o., que apresentaram uma biodisponibilidade absoluta de 65%. Essa absorção reduzida pode ser explicada pela dificuldade de solubilização do IndOEt em meio aquoso, mesmo na presença de tensoativo. Por outro lado, o resultado mostrou que, após a administração oral a ratos da suspensão de IndOEt, a IndOH foi detectável no plasma, sugerindo que o IndOEt é parcialmente solubilizado na luz do trato gastrointestinal, seja para ser absorvido e sofrer hidrólise, seja para sofrer hidrólise,

permitindo a absorção de IndOH.

Tabela 22. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa contendo 1% de polissorbatos 80 (n = 11).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
λ (h ⁻¹)	0,12 ± 0,03
t _{1/2} (h)	6,0 ± 1,5
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	142 ± 32 ^a
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	22,5 ± 7,3
Cp _{max} (µg/mL)	10,9 ± 2,34 ^a
t _{max} (h)	4,9 ± 1,0 ^a
f (%)	32 ^b

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg (Tabela 20);
^bbiodisponibilidade determinada em relação à IndOH administrada i.v., compensando a diferença de massas das doses. D.P.: desvio padrão.

A análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos por teste ANOVA evidenciou reduções significativas da ASC_{0-∞}, Cp_{max} e aumento significativo de t_{max} em relação aos calculados com base nos dados do grupo que recebeu IndOEt nanoencapsulado p.o (Tabela 20). Tais diferenças, assim como a biodisponibilidade relativa (49%), podem ser atribuídas à solubilização parcial do IndOEt na luz do trato gastrointestinal. A dissolução do éster provavelmente foi ocorrendo lentamente, em função de sua baixa solubilidade, levando a uma menor extensão da absorção e a um maior tempo para atingir a concentração plasmática máxima de IndOH.

Os parâmetros farmacocinéticos Cl_{TOT}, t_{1/2} e constante de velocidade de eliminação não apresentaram diferenças significativas em relação aos do grupo que recebeu IndOEt nanoencapsulado p.o.

A análise por abordagem compartimental dos dados experimentais desse grupo também foi realizada empregando o modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem. O uso de fator de peso igual a 1 possibilitou um ajuste

aos dados plasmáticos individuais, conforme ilustra a Figura 16B. A avaliação da qualidade desse ajuste, pela determinação do coeficiente de correlação, que variou de 0,972 a 0,996 nos ajustes individuais, e do MSC, que variou de 2,34 a 3,99, foi mais uma ferramenta que indicou a adequação do modelo.

A análise compartimental proporcionou o cálculo de parâmetros farmacocinéticos cujas médias estão apresentadas na Tabela 23. A comparação por teste t entre os parâmetros $ASC_{0-\infty}$, Cl_{TOT} , ke e $t_{1/2}$, calculados a partir das duas abordagens empregadas, confirmou o emprego do modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem para os dados experimentais em questão.

Tabela 23. Parâmetros farmacocinéticos médios da IndOH obtidos por abordagem compartimental empregando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem aos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa (1,0 mg/kg) contendo 1% de polissorbato 80 (n=11) (média e desvio padrão).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± D.P.
ka (h^{-1})	0,46 ± 0,13
ke (h^{-1})	0,14 ± 0,06
$t_{1/2}$ (h)	5,6 ± 2,0
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu g/mL/h$)	130 ± 31 ^a
Cl_{TOT} (mL/h/kg)	24,8 ± 7,9
Vd_{SS} (mL/kg)	192 ± 74
Cp_{max} ($\mu g/mL$)	9,83 ± 1,95 ^a
t_{max} (h)	3,9 ± 0,5 ^a

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg (Tabela 21); D.P.: desvio padrão.

A comparação entre os parâmetros farmacocinéticos compartimentais determinados para IndOH após administração oral de IndOEt nanoencapsulado e na forma de suspensão aquosa com 1% de polissorbato 80 não mostrou diferença significativa, exceto para Cp_{max} e $ASC_{0-\infty}$, confirmando uma maior extensão de absorção a partir do éster etílico nanoencapsulado.

A menor extensão da absorção observada quando administrado IndOEt em suspensão aquosa com 1% de polissorbato 80 e a diferença significativa dos parâmetros farmacocinéticos anteriormente comentados levou à investigação da influência do polissorbato 80 na absorção da IndOH formada *in vivo*. Assim, o IndOEt foi administrado em suspensão aquosa sem a presença de qualquer tensoativo. A formulação obtida apresentou aspecto heterogêneo, assim como a suspensão com polissorbato 80, sendo submetida à agitação e aquecimento em banho-maria (45 °C) antes da administração.

Os perfis obtidos foram, mais uma vez, expressos em função de concentração plasmática de IndOH por tempo, devido à impossibilidade de determinação do IndOEt no plasma. O perfil médio obtido está apresentado na Figura 17.

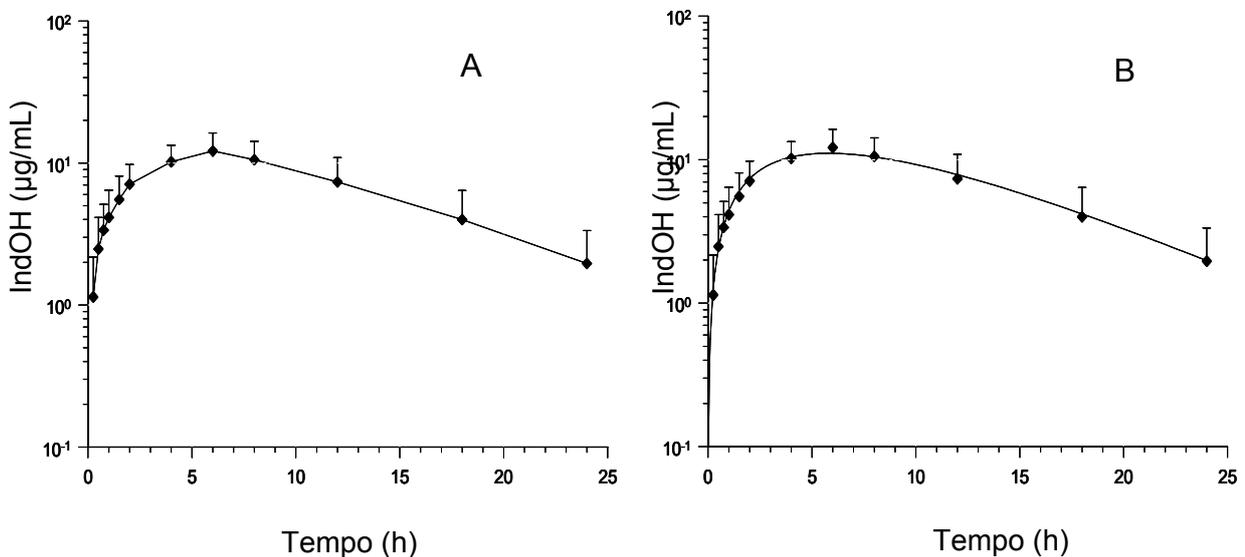


Figura 17. Perfil de concentração plasmática médio de IndOH após administração oral da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo a ratos machos Wistar (n = 7) (média + desvio padrão): (A) sem modelagem; (B) utilizando modelo aberto de 2 compartimentos.

Os parâmetros farmacocinéticos médios determinados a partir dos perfis podem ser observados nas Tabelas 24 e 25 para análise não-compartimental e compartimental, respectivamente.

A $ASC_{EXTRAPOLADA}$ variou de 4,3 a 17,2%, assegurando uma adequada caracterização da fase de eliminação da indometacina. A biodisponibilidade absoluta determinada foi de 40%, próxima àquela calculada para a suspensão de IndOEt

contendo o tensoativo. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre $ASC_{0-\infty}$ e Cp_{max} também indica uma absorção na mesma magnitude para ambas as suspensões aquosas. O t_{max} , entretanto, apresentou um valor significativamente maior no caso da administração da suspensão de IndOEt sem tensoativo, fato que sugere uma solubilização mais rápida do IndOEt no meio gastrintestinal pela presença do polissorbato 80, sem entretanto, influenciar a extensão da absorção. Os resultados indicam que o polissorbato 80, insuficiente para solubilizar o IndOEt em água, pode ter levado à redução do tamanho das partículas aumentando sua superfície de contato e, assim, possibilitando uma solubilização mais rápida do IndOEt que resultou em um tempo menor para o pico de concentração plasmática de IndOH. Todos os outros parâmetros farmacocinéticos avaliados não apresentaram diferenças significativas, demonstrando a influência do polissorbato 80 apenas no tempo para o pico de concentração plasmática.

Tabela 24. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo (n = 7).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± DP
λ (h^{-1})	0,12 ± 0,03
$t_{1/2}$ (h)	6,0 ± 1,3
$ASC_{0-\infty}$ ($\mu g/mL/h$)	176 ± 73 ^a
Cl_{TOT} (mL/h/kg)	24,8 ± 11,7
Cp_{max} ($\mu g/mL$)	12,4 ± 3,8 ^a
t_{max} (h)	6,3 ± 1,4 ^a
f (%)	40 ^b

^adiferença significativa ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOEt nanoencapsulado 10 mg/kg (Tabela 20);

^bbiodisponibilidade determinada em relação à IndOH administrada i.v., compensando a diferença de massas das doses. D.P.: desvio padrão.

A análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos médios (Tabela 24) e sua comparação com os determinados para o grupo que recebeu IndOEt nanoencapsulado p.o. evidencia semelhança apenas entre constante de eliminação

e $t_{1/2}$. As diferenças entre $ASC_{0-\infty}$, $C_{p_{max}}$ e t_{max} calculados sustentam a hipótese de que as partículas insolúveis presentes na suspensão aquosa não só retardam a absorção, como também diminuem a sua extensão. Tal observação pode ser também verificada pela biodisponibilidade relativa da suspensão sem tensoativo em relação às nanocápsulas de IndOEt, cujo valor foi de 61%.

Os dados de concentração por tempo foram submetidos à análise compartimental e o modelo mais apropriado foi, novamente, o de 1 compartimento com absorção de primeira ordem. Nesse caso, o fator de peso não foi empregado, uma vez que seu uso impossibilitou a análise dos dados experimentais. O coeficiente de correlação e o MSC apresentaram valores que variaram entre 0,958 e 0,990 e 1,64 e 3,43, respectivamente, sendo considerados indicadores de uma modelagem adequada. O perfil médio modelado pode ser observado na Figura 17B.

A partir da análise compartimental dos dados pelo modelo selecionado, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos, cujas médias estão apresentadas na Tabela 25. Dentre tais parâmetros, $ASC_{0-\infty}$, Cl_{TOT} , k_e e $t_{1/2}$ foram comparados por teste t com aqueles obtidos pela análise não-compartimental. A ausência de diferença significativa entre os mesmos ($\alpha = 0,05$) foi mais um indicativo da qualidade do ajuste do modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem aos dados experimentais.

Os resultados obtidos com as diferentes formulações de IndOEt administradas pela via oral mostraram que a formação de IndOH *in vivo*, a partir do éster etílico livre ou nanoencapsulado não altera a farmacocinética da IndOH, exceto em termos de extensão e velocidade de absorção. Entretanto, apenas a caracterização dos perfis plasmáticos realizada não foi suficiente para indicar em que momento e em que compartimento ocorreu a hidrólise do IndOEt, formando a IndOH. Desse modo, a elucidação dessa questão se fazia necessária.

Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos médios de IndOH obtidos por abordagem compartimental empregando modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem aos dados plasmáticos resultantes da administração p.o. da dose de 10 mg/kg de IndOEt em suspensão aquosa sem tensoativo (n = 7).

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± DP
ka (h ⁻¹)	0,21 ± 0,05 ^{a,b}
ke (h ⁻¹)	0,16 ± 0,05
t _{1/2} (h)	4,9 ± 2,0
ASC _{0-∞} (µg/mL/h)	170 ± 74 ^a
Cl _{TOT} (mL/h/kg)	26,1 ± 12,5
Vd _{SS} (mL/kg)	168 ± 51
Cp _{max} (µg/mL)	10,3 ± 3,4 ^a
t _{max} (h)	5,7 ± 0,9 ^{a,b}

^adiferenças significativas ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOEt nanoencapsulado (Tabela 20); ^bdiferenças significativas ($\alpha = 0,05$) em relação ao valor determinado após administração oral de IndOEt em suspensão aquosa contendo polissorbato 80 (10 mg/kg) (Tabela 22); D.P.: desvio padrão.

5.6 Avaliação do local de absorção oral de IndOEt nanoencapsulado

Esse experimento foi realizado para avaliar o local de penetração de IndOEt nanoencapsulado, bem como o local de formação da IndOH, após administrado pela via oral, proporcionando assim maior clareza em relação aos processos envolvidos desde a administração até a determinação das concentrações plasmáticas de IndOH resultantes.

A dose de IndOEt nanoencapsulado administrada (10 mg/kg) foi a mesma no experimento de avaliação dos perfis plasmáticos e nos experimentos de edema de pata de rato realizados por Cruz e colaboradores (2005 e 2006b). A determinação das concentrações de ambas as substâncias na parede e no respectivo conteúdo

das diferentes porções do intestino delgado teve como objetivo determinar onde ocorre a absorção do IndOEt ou sua hidrólise. Além do intestino delgado, foram avaliados o fígado, o baço, o plasma da veia porta e o plasma periférico, nos mesmos tempos de coleta, visando à confirmação da forma de indometacina absorvida (ácido ou éster) e avaliando um possível metabolismo de primeira passagem do IndOEt, levando à formação de IndOH no fígado.

O tempo de coleta de 15 minutos foi escolhido para possibilitar um acompanhamento do início da absorção, uma vez que, no experimento de avaliação dos perfis plasmáticos após administração oral, concentrações de IndOH foram observadas a partir de 10 minutos da administração, indicando que a hidrólise do IndOEt já estaria ocorrendo. O tempo de coleta de 1 e 2 h foi incluído no experimento com intuito de permitir a observação de uma etapa da absorção anterior ao pico de concentração plasmática, na qual a formulação de IndOEt estaria em contato com o meio gastrointestinal por um tempo mais prolongado. O grupo adicional de 1 h, em que as paredes do intestino foram limpas com algodão embebido em salina, teve a finalidade de remover o restante do conteúdo e o muco aderido, visando à determinação apenas das substâncias presentes no interior das células da parede.

Na avaliação do plasma periférico, apenas a IndOH pode ser observada em todos os tempos, alcançando concentrações plasmáticas coerentes com as obtidas no experimento de avaliação dos perfis plasmáticos. O plasma da veia porta também não apresentou concentrações detectáveis de IndOEt em nenhum dos tempos avaliados, ao contrário da IndOH, que pode ser quantificada em todos os tempos avaliados, apresentando concentrações crescentes com o tempo. Assim como o sangue da veia porta, no fígado e no baço apenas IndOH pode ser determinada, apresentando concentrações quantificáveis e semelhantes entre si, exceto no fígado, em que as concentrações de IndOH foram superiores (Figura 18).

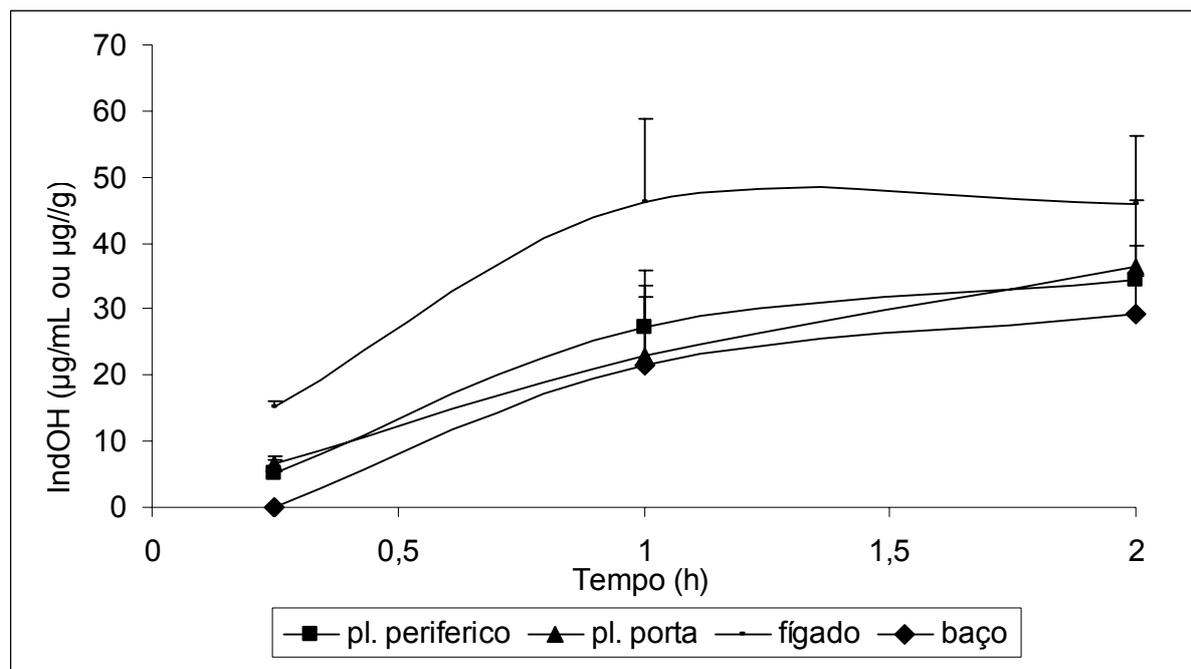


Figura 18. Perfil de IndOH em plasma periférico, plasma da veia porta e em tecido hepático e baço após administração de IndOEt nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg por via oral ($n = 4/\text{tempo}$) (média \pm desvio padrão).

A ausência de IndOEt no fígado e no plasma da veia porta torna improvável a hipótese de que o IndOEt poderia ser conduzido até o fígado pelo sistema porta-hepático e então hidrolisado. Esses resultados podem indicar que o IndOEt não é absorvido como tal, sendo liberado das nanopartículas e convertido em IndOH no trato gastrointestinal. Essa hipótese justificaria o fato de apenas a IndOH ser encontrada no plasma ou no fígado nos tempos avaliados. Outra possibilidade seria o IndOEt, nanoencapsulado ou já liberado do sistema carreador, ser absorvido como tal, mas sofrer uma degradação quase imediata no plasma, antes mesmo da coleta, dificultando sua detecção no plasma com o método analítico empregado. Nesse caso, sua presença deveria ser detectada na parede e/ou no conteúdo intestinal.

As análises de parede e conteúdo do intestino delgado evidenciaram a presença tanto de IndOEt quanto IndOH nas diferentes porções. A Figura 19 mostra os resultados das concentrações médias. Apesar da metodologia empregada no processamento das amostras (item 4.4.5.6) não possibilitar a diferenciação entre IndOEt nanoencapsulado e livre, os resultados indicam que a liberação do IndOEt a partir dos sistemas coloidais tem início no trato gastrointestinal. Uma vez liberado das

nanopartículas, o IndOEt é convertido em IndOH ainda na luz intestinal, como ilustram as concentrações de IndOH observadas ao longo do intestino delgado. Tais concentrações são muito inferiores às de IndOEt, provavelmente em virtude da rápida absorção da IndOH a medida que foi sendo formada. A formação de indometacina no lúmen intestinal pode ocorrer tanto por ação de enzimas da flora intestinal, quanto por ação de lípases ou colesteril-esterases, liberadas no processo digestivo (SMITH e CLARK, 1998).

A localização das nanopartículas no lúmen intestinal, se livre no conteúdo ou aderida à parede intestinal, devido às propriedades bioadesivas das nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 (PONCHEL e IRACHE, 1998), merece considerações. A hipótese da nanocápsula se encontrar aderida à parede é plausível uma vez que altas concentrações de IndOEt foram observadas, especialmente na parede do estômago, duodeno e do jejuno. Corroborando essa hipótese, as concentrações de éster sofreram redução significativa, quando as paredes foram limpas com algodão embebido em salina em relação ao mesmo tempo de avaliação em que as amostras não sofreram limpeza, enquanto as concentrações de indometacina se mantiveram na mesma ordem de magnitude. Assim, o IndOEt pode estar sendo liberado das nanocápsulas enquanto essas estão aderidas ao muco, sendo absorvido como tal e rapidamente hidrolisado na parede e/ou no sangue. A hidrólise do éster, antes de alcançar a circulação, justificaria as elevadas concentrações de indometacina na parede do jejuno, bem como a ausência de éster no plasma, tanto periférico quanto na veia porta. O éster que, intacto, atinge a parede intestinal pode ser hidrolisado pela ação do citocromo P450 existente nos enterócitos (O'DRISCOLL, 2002), justificando as concentrações observadas para o éster e a indometacina ao longo da parede do intestino delgado. O éster liberado da nanocápsulas no intestino delgado pode ser absorvido na forma por transporte transcelular, preferencial no caso de moléculas lipofílicas. O éster pode também ser absorvido ainda nanoencapsulado, por transporte transcelular, paracelular ou através das células M (O'DRISCOLL, 2002). Uma vez no plasma, o éster pode sofrer ação de esterases plasmáticas, carboxipeptidases, bem como de esterases presentes nos eritrócitos (SMITH e CLARK, 1998).

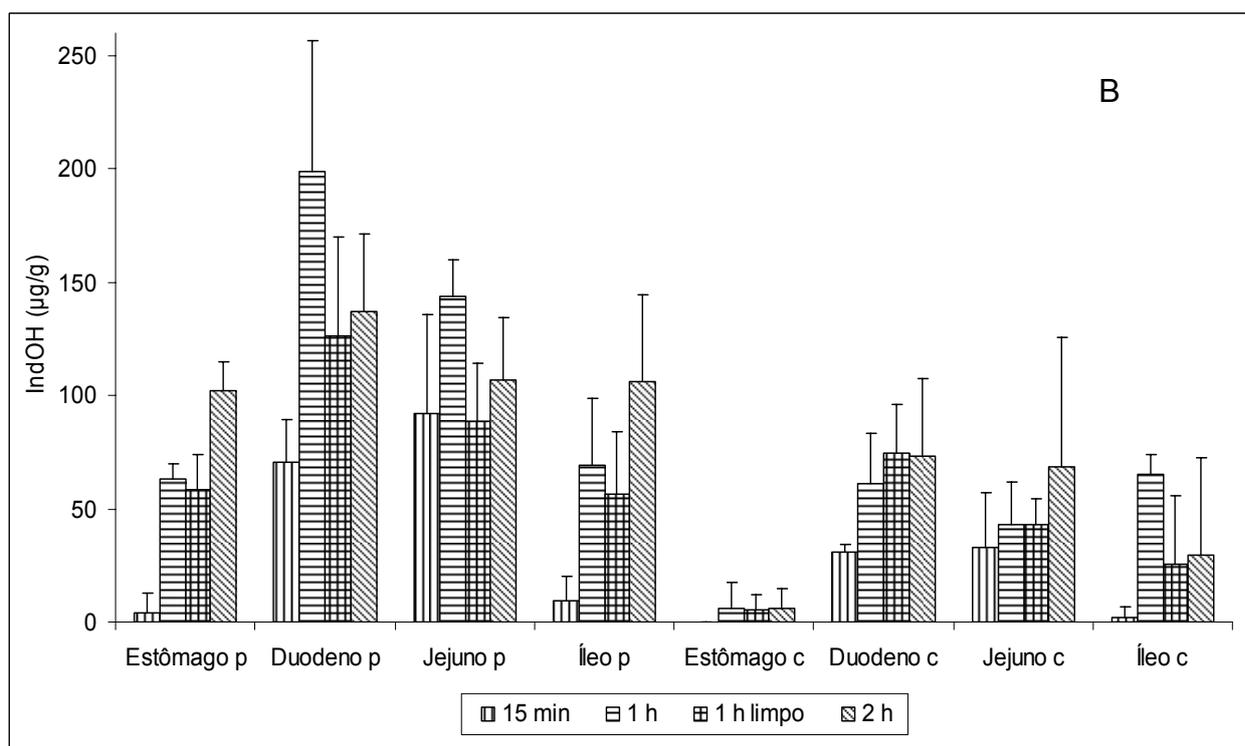
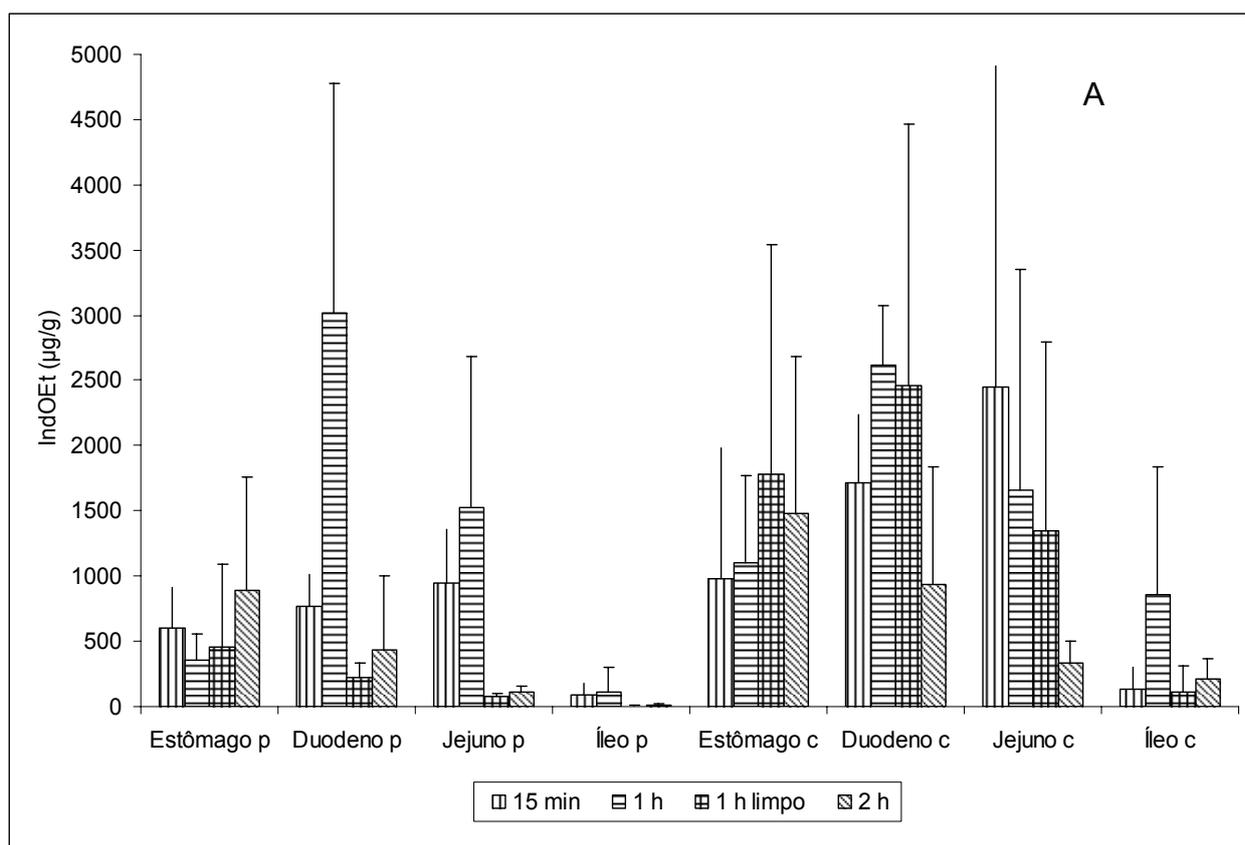


Figura 19. Quantidade de IndOEt (A) e de IndOH (B) no estômago e em diferentes porções do intestino delgado: parede (P) e conteúdo (C) (média + D.P.).

Os resultados obtidos, tanto nos experimentos de farmacocinética plasmática quanto no experimento de avaliação de absorção intestinal indicam que a substância responsável pela atividade antiedematogênica após a administração oral de 10 mg/kg de nanocápsulas contendo IndOEt, relatada por Cruz e colaboradores (2005 e 2006b), é a IndOH, sendo o éster etílico um pró-fármaco.

Os resultados de atividade antiedematogênica observados por Cruz e colaboradores (2005 e 2006b) para o IndOEt nanoencapsulado administrado por via oral (10 mg/kg) demonstraram uma inibição do edema de pata de rato induzido por carragenina de 62%, 2 horas após a administração, atingindo um máximo de 71% de inibição em 3 horas. A indometacina, no mesmo experimento, apresentou uma inibição do edema de 110% 3 h após a administração de 10 mg/kg por via oral. Os resultados dos experimentos de farmacocinética demonstraram que, quando administrada na forma de éster nanoencapsulado, a concentração plasmática de indometacina 4 h após a administração ($19,5 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$) equivalem a aproximadamente 74% da concentração de indometacina administrada como tal pela via oral no mesmo tempo de coleta ($26,3 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$). Apesar da variabilidade intrínseca desses experimentos, pode-se observar uma relação direta entre os níveis plasmáticos de indometacina e o efeito de inibição do edema induzido por carragenina, confirmando que a indometacina formada *in vivo* a partir do seu éster etílico nanoencapsulado é a substância responsável pela atividade farmacológica observada.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica por CLAE para a determinação simultânea de indometacina e de seu éster etílico em amostras de plasma foi validada, apresentando-se adequada para quantificação dos analitos;
- A indometacina formada *in vivo*, após a administração intravenosa de nanocápsulas de éster etílico de indometacina (5 mg/kg), possui perfil farmacocinético semelhante ao determinado para indometacina administrada como tal pela mesma via (10 mg/kg);
- A indometacina determinada em plasma após administração oral de éster etílico de indometacina nanoencapsulado ou livre, com ou sem tensoativo, na dose de 10 mg/kg, apresenta alterações na velocidade e extensão de absorção em comparação com o perfil obtido após administração oral de indometacina na mesma dose;
- A administração oral do éster etílico de indometacina nanoencapsulado proporcionou maior extensão de absorção de indometacina e perfis plasmáticos mais homogêneos do que a administração do éster na forma de suspensão aquosa com ou sem tensoativo;
- Após a administração oral de éster etílico de indometacina nanoencapsulado, este seria liberado na luz do trato gastrointestinal, sendo hidrolisado à indometacina, que é então absorvida;
- Tanto na administração intravenosa como na administração oral de éster etílico de indometacina nanoencapsulado, pode-se determinar o perfil plasmático apenas da indometacina formada *in vivo*, evidenciando que a indometacina é a substância responsável pelo efeito antiedematogênico observado previamente em ratos após a administração oral de éster etílico de indometacina nanoencapsulado (10 mg/kg), em modelo de edema de pata induzido por carragenina.

7 REFERÊNCIAS

AMMOURY, N.; DUBRASQUET, M.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. Indomethacin-loaded poly(D, L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. *Clinical Materials*, v. 13, p. 121-130, 1993.

ANVISA. Resolução RE n° 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em 23 jul. 2005.

ARAUJO, L.; SHEPPARD, M.; LÖBENBERG, R.; KREUTER, J. Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and in oil vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 176, p. 209-224, 1999.

BAHRENS, I.; PENA, A. I. V.; ALONSO, M. J.; KISSEL, T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of the mucus on particle adsorption and transport. *Pharmaceutical research*, v. 19, n. 8, p. 1185-1193, 2002.

BARTHE, L.; BESSOUET, M.; WOODLEY, J. F.; HOUIN, G. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 173, p. 255-258, 1998.

BARTON, A. E.; BAYLEY, D. L.; MIKAMI, M.; LLEWELLYN-JONES, C. G.; STOCKLEY, R. A. Phenotypic changes of neutrophils related to anti-inflammatory therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1500, p. 108-118, 2000.

BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual Acting Anti-inflammatory Drugs: A Reappraisal. *Pharmacological Research*, v. 44, n. 6, p. 437-450, 2001.

BLACK, W. C.; BAYLY, C.; BELLEY, M.; CHAN, C-C.; CHARLESON, S.; DENIS, D.; GAUTHIER, J. Y.; GORDON, R.; GUAY, D.; KARGMAN, S.; LAU, C. K.; LEBLANC, Y.; MANCINI, J.; OUELLET, M.; PERCIVAL, D.; ROY, P.; SKOREY, K.; TAGARI, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; XU, L.; PRASIT, P. From Indomethacin to a Selective COX-2 Inhibitor: Development of Indolalkanoic Acids as Potent and Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 6, n. 6, p. 725-730, 1996.

BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; DE CAPRARIIS, P.; PALAGIANO, F.; CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of triethylene glycol indomethacin ester as a new oral prodrug. *Journal of Controlled Release*, v. 41, p. 187-193, 1996.

BONINA, F.; TROMBETTA, D.; BORZI, A.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral prodrugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 156, p. 245-250, 1997.

CALVO, P.; VILA-JATO, L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L. *Estudo Físico-químico Comparativo de Sistemas Nanoestruturados Contendo Indometacina ou seu Éster Etilico e Avaliação In Vivo da Atividade Antiedematogênica*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 198-205, 2006a.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; DALLA COSTA, T.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, p. 3154-3162, 2006b.

FAWAZ, F.; BONINI, F.; GUYOT, M.; LAGUENY, A. M.; FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. Disposition and protective effect against irritation after intravenous and rectal

administration of indomethacin loaded nanocapsules to rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 133, p. 107-115, 1996.

FDA. Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*. May 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>>. Acesso em 15 dez. 2006.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E. Cyclo-oxygenase isoenzymes. Structural basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases by anti-inflammatory agents. *Digest Liver Disease*, v. 33, suplemento 2, p. S2-S7, 2001.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 433-442, 2001.

FLORENCE, A. T. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 259-266, 1997.

GABR, K. E. Influence of indomethacin-mastic combinations on dissolution, absorption and gastrointestinal mucosal damage in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 158, p. 137-145, 1997.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. *Pharmacokinetics*. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1982.

GÜRSOY, A.; EROGLU, L.; ULUTIN, S.; TASYÜREK, M.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet aggregation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 52, p. 101-108, 1989.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Poly(D, L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 10, 1995.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and

targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, p. 319-327, 2002.

HÄRTEL, C.; VON PUTTKAMER, J.; GALLNER, F.; STRUNK, T.; SCHULTZ, C. Dose-dependent Immunomodulatory Effects of Acetylsalicylic Acid and Indomethacin in Human Whole Blood: Potential Role of Cyclooxygenase-2 Inhibition. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 60, p. 412-420, 2004.

HAZZARD, R. A.; HODGES, G. M.; SCOTT, J. D.; McGUINNESS, C. B.; CARR, K. E. Early intestinal microparticle uptake in the rat. *Journal of Anatomy*, v. 189, p. 265-271, 1996.

HILLERY, A. M.; FLORENCE, A. T. The effect of adsorbed poloxamer 188 and 407 surfactants on the intestinal uptake of 60 nm polystyrene particles after oral administration in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 132, p. 123-130, 1996.

JACOBS, J. W. G.; BIJLSMA, J. W. J. NSAIDs: a critical appraisal. *Netherlands Journal of Medicine*, v. 51, p. 198-204, 1997.

KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, A. B.; KOZAK, K. R.; REMMEL, R. P.; MARNETT, L. J. Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *PNAS*, v. 92, n. 2, p. 925-930, 2000 (a).

KALGUTKAR, A., S.; MARNETT, A. B.; CREWS, B. C.; REMMEL, R. P.; MARNETT, L. J. Ester and Amide Derivatives of the Nonsteroidal Antiinflammatory Drug, Indomethacin, as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 15, p. 2860-2870, 2000 (b).

KIM, S. Y.; LEE, Y. M.; SHIN, H. J.; KANG, J. S. Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone)diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats. *Biomaterials*, v. 22, p. 2049-2056, 2001.

KIM, S. Y.; LEE, Y. M.; BAIK, D. J.; KANG, J. S. Toxic characteristics of methoxy

poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) nanospheres; in vitro and in vivo studies in the normal mice. *Biomaterials*, v. 24, p. 55 – 63, 2003.

LE RAY, A. M.; VERT, M.; GAUTIER, J. C.; BENÔIT, J. P. Fate of [^{14}C]poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles after intravenous and oral administration to mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 106, p. 201-211, 1994.

LIMPANUSSORN, J.; SIMON, L.; DAYAN, A. D. Transepithelial transport of large particles in rat: a new model for the quantitative study of particle uptake. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 50, p. 753-760, 1998.

NAVARRO, C.; BRAVO, M. L.; CARULLA, C.; BULBENA, O. Gastrotoxic Activity and Inhibitory Effects on Gastric Mucosal PGE₂ Production With Different Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs: Modifications Induced by Pretreatment With Zinc Acexamate. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 50, p. 305-310, 1994.

NISHIOKA, Y.; YOSHINO, H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 55-64, 2001.

NIX, D. E.; GOODWIN, S. D.; PELOQUIN, C. A.; ROTELLA, D. L.; SCHENTAG, J. J. Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 10, p. 1947-1952, 1991.

O'DRISCOLL, C. Drug delivery to the intestinal lymphatic system. *The Drug Delivery Companies Report*. 2002

OGISO, T.; IWAKI, M.; KINOSHITA, T.; TANINO, T.; PAKU, T. Pharmacokinetics of Indomethacin Octyl Ester (Prodrug) and Indomethacin Produced from the Prodrug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, n. 1, p. 34-37, 1994.

PALAKURTHI, S.; VYAS, S. P.; DIWAN, P. V. Biodisposition of PEG-coated lipid microspheres of indomethacin in arthritic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 290, p. 55-62, 2005.

PATRIGNANI, P.; TACCONELLI, S.; SCIULLI, M. G.; CAPONE, M. L. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Research Reviews*, 2004.

- PATRONO, C.; PATRIGNANI, P.; RODRÍGUEZ, L. A. G. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *Journal of Clinical Investigation*, v. 108, p. 7-13, 2001.
- PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. *Journal of Physiology-Paris*, v. 95, p. 3-9, 2001.
- POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 305-312, 2002.
- POHLMANN, A. R.; SOARES, L. U.; CRUZ, L.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association form of Indomethacin in Nanocapsules Prepares with Poly(ϵ -Caprolactone). *Current Drug Delivery*, v. 1, p. 103-110, 2004.
- PONCHEL, G.; IRASHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 191-219, 1998.
- RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrintestinal em ratos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.
- RAINSFORD, K. D. Profile and Mechanisms of Gastrointestinal and Other Side Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *The American Journal of Medicine*, v. 107, n. 6A, p. 27S–35S, 1999.
- RAO, G. C. S.; KUMAR, M. S., MATHIVANAN, N.; RAO, M. E. B. Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems. *Pharmazie*, v. 59, p. 5-9, 2004.
- ROBBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Anagesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Ed.) *Goodman e Gilman's The Pharmacocological*

Basis of Therapeutics. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 27, p. 687-731.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. *In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Ed.) Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001. Cap. 60, p. 1649-1678.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. B. C.; *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2004.

SHOJI, Y.; MIZUSHIMA, Y.; YANAGAWA, A.; SHIBA, T.; TAKEI, H.; FUJI, M.; AMINO, M. Enhancement of antiinflammatory effects of biphenyl acetic acid by its incorporation into lipid microspheres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, p. 118-121, 1986.

SMITH, F. T.; CLARK, C. R. Drug Latention and Prodrugs. *In: DELGADO, J. N.; REMERS, W. A. (Ed.) Wilson & Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 11 ed. Phyladelphia: Lippincott-Raven, 1998. Cap. 4, p. 123-138.

SOARES, L. U. *Estudo Cinético da Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina Associado a Nanopartículas de Poli(ε-caprolactona)*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SRINATH, P.; DIWAN, P. V. Pharmacodinamic and pharmacokinetic evaluation of lipid microspheres of indomethacin. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 73, p. 199-203, 1998.

SRINATH, P.; CHARY, M. G.; VYAS, S. P.; DIWAN, P. V. Long-circulating liposomes of indomethacin in arthritic rats – a biodisposition study. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 74, p. 399-404, 2000.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 289-314, 2000.

TAMMARA, V. K.; NARURKAR, M. M.; CRIDER, A. M.; KHAN, M. A. Synthesis and Evaluation of Morpholinoalkyl ester Prodrugs of Indomethacin and Naproxeno. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 8, p. 1191-1199, 1993.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T.; HWANG, H. J.; MIO, M.; TSUCHIYA, T.; MIZUSHIMA, T. Role of direct cytotoxic effect of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochemical Pharmacology*, v. 67, n. 3, p. 575-585, 2004.

VENUTI, M. C.; YOUNG, J. M.; MALONEY, P. J.; JOHNSON, D.; MCGREEVY, K. Synthesis and Biological Evaluation of Ω -(N, N, N-Trialkylammonium)alkyl Esteres and Thioesteres of Carboxylic Acid Nonsteroidal Antiinflammatory Agents. *Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 10, p. 867-873, 1989.

WANNAMACHER, L. E FERREIRA, M. B. Antiinflamatórios Esteróides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. (Ed.). *Farmacologia Clinica Fundamentos da Terapeutica Racional*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. Cap. 23, p. 296-305.

WANNAMACHER, L. E FERREIRA, M. B. Antiinflamatórios Não-esteróides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. (Ed.). *Farmacologia Clinica Fundamentos da Terapêutica Racional*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. Cap. 21, p. 187-193.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P.A. *Experimental and surgical technique in the rat*. 2 ed., London: Academic Press, 1994.



Grupo	Parâmetros farmacocinéticos						f ou relação
	ka (h ⁻¹)	λ (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	ASC _{0-∞} (μg/mL/h)	Cl _{TOT} (mL/h)	Vd _{SS} (mL/kg)	ASC (%)
IndOH i.v. (10 mg/kg)	-	0,11 ± 0,03	6,75 ± 1,90	450 ± 112	23,5 ± 6,2	192 ± 26	-
IndOH p.o. (10 mg/kg)	2,8 ± 1,4	0,11 ± 0,04	6,75 ± 2,29	366 ± 109	22,7 ± 7,8	203 ± 32	77
IndOEt-NC i.v. (5 mg/kg)	-	0,10 ± 0,01	7,3 ± 0,7	147 ± 29 ^a	32,5 ± 7,3	322 ± 90	68
IndOEt-NC p.o. (10 mg/kg)	0,50 ± 0,22	0,13 ± 0,04	5,5 ± 1,5	259 ± 53	24,3 ± 4,6	189 ± 47	65
IndOEt 1% tween 80 [®] p.o. (10 mg/kg)	0,46 ± 0,13	0,14 ± 0,06	5,6 ± 2,0	130 ± 31	24,8 ± 7,9	192 ± 74	32
IndOEt p.o. (10 mg/kg)	0,21 ± 0,05	0,16 ± 0,05	4,9 ± 2,0	170 ± 74	26,1 ± 12,5	168 ± 51	40

λ: constante de velocidade de eliminação.