

**ANDREA FIALHO DE SOUZA LIMA**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS  
MUCOADESIVAS DE CLARITROMICINA  
PARA TRATAMENTO DO  
*HELICOBACTER PYLORI***

**Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2008**

**ANDREA FIALHO DE SOUZA LIMA**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS  
MUCOADESIVAS DE CLARITROMICINA PARA  
TRATAMENTO DO *HELICOBACTER PYLORI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Gilson Andrade Ramaldes

Co-Orientadora: Profa Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2008

*“É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca.”*

*Dom Hélder Câmara*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo, pela minha vida, inteligência, saúde e determinação.

Ao professor Gilson, pela orientação e pelos ensinamentos proporcionados durante este trabalho.

À professora Mônica, co-orientadora, pela orientação precisa em momentos muito importantes.

À professora Cristina pela dedicação e competência em seu apoio nas fases iniciais dos trabalhos.

Aos professores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela amizade e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo carinho recebido, pela amizade, ajuda e sugestões.

Ao Eduardo, técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pelos auxílios constantes.

Aos meus pais pelo apoio, carinho, amor e educação recebida.

Aos meus irmãos e à Camila pelo amor e amizade.

E, especialmente, ao meu marido Julio pelo amor e carinho diário, apoio, compreensão e força para realizar essa etapa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
1 Estômago.....	17
2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	25
3 Claritromicina.....	28
4 Tratamento da infecção por <i>H. pylori</i> .....	30
5 Formas farmacêuticas de retenção gástrica.....	34
5.1 Quitosana.....	41
5.2 Alginato de sódio.....	42
5.3 Colestiramina.....	43
5.4 Ácido poliacrílico.....	43
5.5 Carbopol.....	44
5.6 Carbopol 934P.....	46
6 Microesferas.....	46
<b>OBJETIVOS</b> .....	50
1 Objetivo geral.....	50
2 Objetivos específicos.....	50
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	51
1 Reagentes e outros materiais.....	51
2 Métodos.....	52
2.1 Doseamento da claritromicina.....	52
2.1.1. Tempo de retenção e simetria do pico.....	53
2.1.2 Linearidade.....	53

2.1.3 Precisão.....	54
2.1.3.1 Repetibilidade.....	54
2.1.3.2 Precisão intermediária.....	55
2.1.4 Seletividade.....	55
2.1.5 Tempo de retenção relativo da claritromicina e da 6,11-O- metileritromicina.....	57
2.1.6 Comparação entre padrão primário e secundário de claritromicina.....	58
2.2 Microesferas de claritromicina.....	59
2.2.1 Preparação das microesferas.....	59
2.2.2 Caracterização morfológica.....	63
2.2.2.1 Microscopia óptica de luz.....	63
2.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	64
2.2.3 Taxa de encapsulação da claritromicina nas microesferas.....	64
2.2.3.1 Teor total de claritromicina nas microesferas.....	64
2.2.3.2 Claritromicina adsorvida na superfície das microesferas.....	65
2.2.3.3 Teor de claritromicina no líquido da primeira lavagem.....	66
2.2.4 Liberação in vitro da claritromicina presente nas microesferas.....	66
2.2.4.1 Doseamento da claritromicina por espectrofotometria no ultravioleta (UV).....	66
2.2.4.2 Preparação do líquido gástrico simulado.....	67
2.2.4.3 Seletividade do método espectrofotométrico.....	68
2.2.4.4 Interferência do líquido gástrico simulado no doseamento da claritromicina por CLAE.....	69
2.2.4.5 Estabilidade da claritromicina na presença do líquido gástrico simulado.....	69
2.2.4.6 Liberação in vitro da claritromicina das microesferas.....	70
2.2.5 Mucoadesão in vitro.....	71
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72
1 Doseamento da claritromicina por CLAE.....	72
1.1 Tempo de retenção e simetria do pico.....	72
1.2 Linearidade.....	78

1.3 Precisão.....	80
1.3.1 Repetibilidade.....	80
1.3.2 Precisão intermediária.....	80
1.3.3 Seletividade.....	81
1.3.4 Tempo de retenção relativo entre claritromicina e 6,11-O- metileritromicina.....	84
1.4 Doseamento do padrão secundário de claritromicina.....	86
2 Microesferas.....	88
2.1 Tamanho e morfologia.....	88
2.2 Taxa de encapsulação da claritromicina nas microesferas.....	91
2.3 Liberação in vitro da claritromicina das microesferas.....	92
2.3.1 Doseamento da claritromicina por espectrofotometria no ultravioleta (UV).....	92
2.3.2 Seletividade do método de dosagem da claritromicina no UV...	94
2.3.3 Estabilidade do padrão de claritromicina no líquido gástrico simulado.....	94
2.3.4 Estudos de liberação in vitro.....	95
2.4 Mucoadesão in vitro.....	98
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Anatomia do estômago (FOX & WANG, 2007).....	17
<b>Figura 2</b> - Anatomia das glândulas gástricas (SCHUBERT & PEURA, 2008).....	19
<b>Figura 3</b> - Modelo ilustrando os receptores das células parietais e da transdução (SCHUBERT & PEURA, 2008).....	21
<b>Figura 4</b> - Estrutura da mucina gástrica.....	24
<b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural da claritromicina.....	29
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da quitosana (SMART, 2005).....	41
<b>Figura 7</b> - Estrutura do alginato mostrando resíduos de ácido D-manurônico e de ácido L-gulurônico (GOMBOTZ & WEE, 1998).....	42
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática das seqüências de poliguluronato do alginato reticulado com íons cálcio (GOMBOTZ & WEE, 1998).....	43
<b>Figura 9</b> - Estrutura química do ácido poliacrílico, R = alil sacarose ou alil pentaeritritol (carbopols); ou divinil glicol (policarbofil) (SMART, 2005).....	44
<b>Figura 10</b> - Estrutura química e molecular da forma ácida das resinas de carbopol (SINGLA <i>et al.</i> , 2000).....	45
<b>Figura 11</b> - Hidratação da resina de carbopol: (a) uma molécula da resina parcialmente solvatada e não neutralizada (dispersão). (b) uma molécula da resina neutralizada e completamente solvatada (mucilagem) (SINGLA <i>et al.</i> , 2000).....	45
<b>Figura 12</b> - Descrição esquemática do processo de mucoadesão com microesferas.....	48
<b>Figura 13</b> - Dispersão de etilcelulose, carbopol e claritromicina.....	60
<b>Figura 14</b> - Aspecto da mistura de parafina light e Span.....	60
<b>Figura 15</b> - Início da adição da dispersão à mistura de parafina light e span.....	61
<b>Figura 16</b> - A mistura foi ficando mais turva à medida que se adicionava a dispersão.....	61



<b>Figura 17</b> - Aspecto da dispersão após o término da emulsificação.....	61
<b>Figura 18</b> - Aspecto da dispersão após a evaporação da acetona.....	62
<b>Figura 19</b> - Aspecto da dispersão após a evaporação do etanol.....	62
<b>Figura 20</b> - Fotografia das microesferas após lavagem com éter de petróleo.....	63
<b>Figura 21</b> - Eluição cromatográfica da fase móvel sem claritromicina durante 30 minutos por CLAE (n=3).....	72
<b>Figura 22</b> - Eluição cromatográfica de uma solução de claritromicina a 200 µg/mL em fase móvel por CLAE (n=3).....	73
<b>Figura 23</b> - Eluição cromatográfica exploratória de fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina durante 60 minutos por CLAE (n = 3).....	74
<b>Figura 24</b> - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 50 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3).....	76
<b>Figura 25</b> - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 100 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3).....	76
<b>Figura 26</b> - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3).....	77
<b>Figura 27</b> - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 300 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3).....	77
<b>Figura 28</b> - Representação gráfica de três curvas padrões de claritromicina, obtidas por CLAE em dias diferentes.....	78
<b>Figura 29</b> - Representação gráfica da curva padrão de claritromicina, obtidas a partir das três curvas padrões por CLAE nas concentrações de 20 a 60 µg/mL(n=9). $Y = 855,37 X - 617$ ; coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9999 e desvio padrão relativo (%DPR) igual a 0,47%.....	79
<b>Figura 30</b> - Eluição cromatográfica de etilcelulose dispersa em metanol por CLAE (n = 3).....	82
<b>Figura 31</b> - Eluição cromatográfica de carbopol disperso em metanol por CLAE (n = 3).....	82
<b>Figura 32</b> - Eluição cromatográfica dos constituintes das microesferas brancas dispersas em metanol por CLAE (n = 3).....	83

<b>Figura 33</b> - Eluição de claritromicina padrão na concentração teórica de 200 µg/mL por CLAE (n = 3).....	83
<b>Figura 34</b> - Eluição cromatográfica por CLAE de claritromicina a 200 µg/mL (n=3).....	85
<b>Figura 35</b> - Eluição cromatográfica por CLAE de 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL (n=3).....	85
<b>Figura 36</b> - Eluição cromatográfica por CLAE de claritromicina a 200 µg/mL mais 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL (n=3).....	86
<b>Figura 37</b> - Eluição cromatográfica por CLAE do padrão secundário de claritromicina na concentração de 200 µg/mL (n=3).....	87
<b>Figura 38</b> - Eluição cromatográfica por CLAE do padrão primário de claritromicina na concentração de 200 µg/mL (n=3).....	88
<b>Figura 39</b> - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de claritromicina. Ampliação de 5.000 vezes (escala indicada).....	89
<b>Figura 40</b> - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de claritromicina. Ampliação de 10.000 vezes (escala indicada).....	89
<b>Figura 41</b> - Microscopia eletrônica de varredura das “microesferas” sem claritromicina. Ampliação de 5.000 vezes (escala indicada).....	90
<b>Figura 42</b> - Representação gráfica da curva padrão de claritromicina obtida a partir das três curvas padrões pelo método espectrofotométrico nas concentrações de 10 a 50 µg/mL (n = 3). $Y = 0,0179x - 0,015$ ; coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9929 e desvio padrão relativo (%DPR) igual a 5,27%.....	94
<b>Figura 43</b> - Mucosa de rato após incubação sem microesferas e lavagem com solução salina.....	99
<b>Figura 44</b> - Mucosa de rato após adição de microesferas, incubação e lavagem com solução salina pH 1,2.....	99
<b>Figura 45</b> - Mucosa de rato após adição de microesferas, incubação e lavagem com solução salina pH 5,0.....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Exemplo de polímeros mucoadesivos (SALAMAT-MILLER <i>et al.</i> , 2005).....	39
<b>Tabela 2</b> - Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica da fase móvel sem claritromicina durante 30 minutos por CLAE (n=3).....	73
<b>Tabela 3</b> - Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica de uma solução de claritromicina a 200 µg/mL em fase móvel por CLAE (n=2)	74
<b>Tabela 4</b> - Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica exploratória da fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina durante 60 minutos por CLAE (n=3).....	75
<b>Tabela 5</b> - Tempo de retenção e área da eluição cromatográfica por CLAE da fase móvel contendo diferentes concentrações de claritromicina (n=3)	75
<b>Tabela 6</b> - Resultados estatísticos obtidos para as soluções padrões de claritromicina em fase móvel para as diferentes concentrações utilizadas na construção da curva de calibração por CLAE.....	79
<b>Tabela 7</b> - Resultados do teste de repetibilidade para a validação do doseamento cromatográfico de claritromicina por CLAE (n=3).....	80
<b>Tabela 8</b> - Resultados do teste de precisão intermediária, em três dias, para validação do doseamento cromatográfico de claritromicina por CLAE (n=9).....	81
<b>Tabela 9</b> - Resultados do teste de seletividade utilizando etilcelulose, carbopol, microesferas sem claritromicina e solução padrão de claritromicina a 200 µg/mL dispersos em metanol (n=3).....	81
<b>Tabela 10</b> - Tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos por CLAE de claritromicina 200 µg/mL, 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL e claritromicina 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL (n=3).....	84
<b>Tabela 11</b> - Tempo de retenção e área dos picos cromatográficos por CLAE do padrão primário e secundário de claritromicina, ambos a 200 µg/mL (n=3).....	87
<b>Tabela 12</b> – Teor total de claritromicina presente nas microesferas (n=3)....	91

<b>Tabela 13</b> – Claritromicina adsorvida na superfície das microesferas (n=2).	92
<b>Tabela 14</b> - Construção de curva de calibração para determinação da claritromicina por UV (n = 3).....	93
<b>Tabela 15</b> – Teor de claritromicina presente nas microesferas após 2 e 4 horas de incubação em 10 mL de meio gástrico artificial contendo leite (n=3). Os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta de 10 a 50 µg/mL.....	95
<b>Tabela 16</b> – Teor de claritromicina presente nas microesferas após 2 e 4 horas de incubação em 10 mL de meio gástrico artificial contendo leite (n=3). Os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta de 10 a 50 µg/mL.....	96

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CCK2	Colecistocinina
ECL	Células tipo enterocromafins
STP-repeats	Seqüências de repetição rica em serina, treonina e prolina
CMMI	Complexo motor migrante interdigestivo
H. pylori	Helicobacter pylori
PPI	Inibidores de bombas de prótons
TRG	Tempo de retenção gástrico
PGEF-ME	Microesferas de ácido gástrico de poliglicerol
CPD	Microesferas de ácido gástrico de poliglicerol contendo carbopol disperso
CPC	Microesferas de ácido gástrico de poliglicerol contendo carbopol envolvendo a superfície externa
ANP	Peptídeos natriuréticos atrial
CCK2	Colecistocinina
HCl	Ácido clorídrico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

## RESUMO

*Helicobacter pylori*, uma bactéria gram negativa, habita o estômago de aproximadamente metade da população mundial. A infecção causada por esta bactéria está associada com certos tipos de inflamações gastroduodenais podendo levar ao desenvolvimento de gastrite aguda ou crônica, úlcera gástrica ou duodenal e câncer gástrico. A claritromicina, um agente antibiótico macrolídeo, tem sido utilizado como terapia de primeira linha no tratamento do *Helicobacter pylori* associado ao metronidazol ou amoxicilina e um inibidor da bomba de prótons. Entretanto, há uma elevada taxa de falha na erradicação completa da infecção utilizando este tratamento, a qual pode estar ligada ao curto tempo de residência e instabilidade dos antimicrobianos no estômago. O objetivo desse trabalho foi preparar microesferas de claritromicina mucoadesivas e de liberação controlada na mucosa gástrica visando aumentar sua eficácia clínica no tratamento do *Helicobacter pylori*. Primeiramente, foi necessário validar o método de doseamento da claritromicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em seguida, microesferas mucoadesivas contendo claritromicina foram preparadas utilizando etilcelulose como matriz e carbopol 934P como polímero mucoadesivo. Depois, estas microesferas foram caracterizadas em relação ao tamanho, morfologia e perfil de liberação da claritromicina em um meio gástrico artificial contendo leite como padrão alimentar. Por fim, um estudo de mucoadesão *in vitro* foi efetuado. Os resultados mostraram que foi possível validar o método de doseamento da claritromicina por CLAE, que as microesferas apresentaram uma forma esférica e tamanho de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , que aproximadamente 30% da claritromicina encapsulada nas microesferas foi liberada após 4 horas, sugerindo uma ação prolongada, e ainda, que *in vitro* as microesferas aderem à mucosa gástrica. Estes resultados serão posteriormente confirmados *in vivo* antes de propor a utilização desse novo sistema para o tratamento do *Helicobacter pylori*.

**Palavras chaves:** Claritromicina, microesferas mucoadesivas. carbopol, etilcelulose, *Helicobacter pylori*

**ABSTRACT**

*Helicobacter pylori*, a gram negative bacterium, habitats the stomach of about half of the world population. The infection caused by this bacterium is associated with some types of gastroduodenal inflammatory diseases that can reach the stage of an acute or chronic gastritis, gastric or duodenal ulcer and gastric cancer. Clarithromycin, a macrolide antimicrobial agent, has been adopted as a first therapy line for H. pylori infection treatment associated to the metronidazole or to the amoxicillin and a proton pump inhibitor. However there is a high rate of failure in completely infection eradication using this treatment, which can be related to the short permanency time and instability of the antimicrobials agents in stomach. The target of this work was to prepare clarithromycin mucoadhesive microspheres with controlled liberation in the gastric mucosa for improving its clinical efficacy for the *Helicobacter pylori* infection treatment. Firstly, It has been necessary to validate the method for the quantification of clarithromycin by high efficiency liquid chromatography (CLAE). In the following step, mucoadhesive microspheres with clarithromycin were been prepared using as ethylcellulose as the matrix and carbopol 934P as the mucoadhesive polymer. After, these microspheres have been characterized due to their size, morphology and release profile of the clarithromycin in an artificial gastric mean with milk as an alimentary standard. At the end, an in vitro mucoadhesion study has been performed. The results have made evident that it was possible validating clarithromycin quantification method by CLAE, microspheres have presented spherical shape and size from 1 to 2  $\mu\text{m}$ , about 30% of the clarithromycin entrapped in the microspheres has been released after 4 hours and they suggest a long time action, and besides, that microspheres adhere in vitro to the gastric mucosa. These results will be after confirmed in vivo before of proposing this new system for *Helicobacter pylori* treatment

**Keywords:**

Clarithromycin, mucoadhesive microspheres, carbopol, ethylcellulose, *Helicobacter pylori*

## INTRODUÇÃO GERAL

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria gram negativa que geralmente na infância coloniza a mucosa gástrica, constitui um importante fator de risco para várias doenças gastrintestinais podendo persistir por toda a vida sem tratamento específico. A infecção pelo *H. pylori* está associada com certos tipos de inflamações gastroduodenais podendo levar ao desenvolvimento de gastrite aguda ou crônica, úlcera gástrica ou duodenal e câncer gástrico (STADE, 2003). Sua prevalência varia de 20 a 50% em países industrializados e de aproximadamente 80% nos países em desenvolvimento (LEE *et al.*, 2008).

No tratamento desta infecção é recomendada uma terapia tripla que corresponde ao uso de dois antibióticos em combinação com um inibidor de bomba de prótons (PPI). Essa terapia, que é de primeira linha em populações com prevalência de resistência à claritromicina menor que 15 a 20%, utiliza um PPI em dose padrão, 500 mg de claritromicina e 1 g de amoxicilina duas vezes ao dia. Em populações com prevalência de resistência ao metronidazol menor que 40% a associação de um PPI, claritromicina e 400 ou 500 mg de metronidazol é preferível. Entretanto, a taxa de erradicação é baixa, aproximadamente 80%. As principais causas que contribuem para a falha do tratamento são a falta de adesão dos pacientes e a resistência aos antibióticos (WOLLE & MALFERTHEINER, 2007). Outras razões para a incompleta erradicação do *H. pylori* podem estar ligados ao curto tempo de residência do agente antimicrobiano, claritromicina ou amoxicilina, no estômago e a instabilidade desses antimicrobianos em meio ácido (NAGAHARA *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2005).

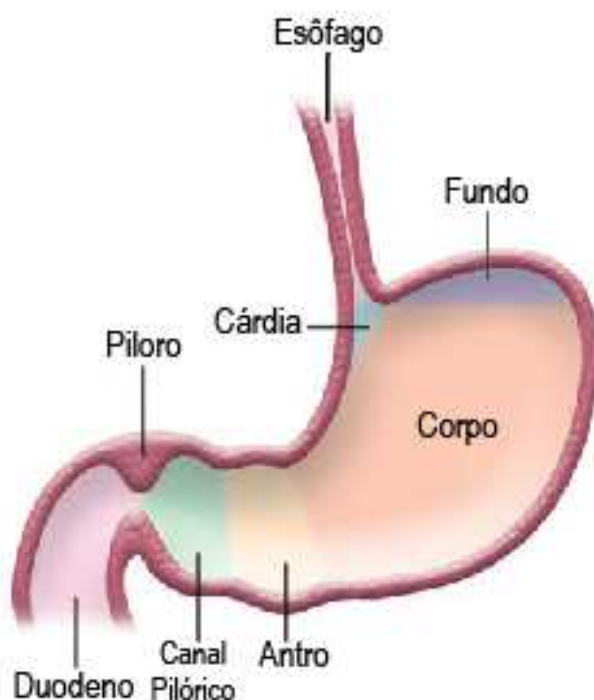
Nosso estudo pretende desenvolver e avaliar um novo produto tecnológico, microesferas mucoadesivas de claritromicina, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica do tratamento do *Helicobacter pylori* através da redução da dose empregada no tratamento, o que leva a uma maior adesão do paciente, e um maior tempo de contato e de residência do antimicrobiano na mucosa gástrica, com conseqüente erradicação das doenças gastroduodenais causadas por esse microrganismo.



## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 Estômago

O estômago consiste de três regiões topográficas denominadas de fundo, corpo e antro. O fundo e o corpo compreendem 80% do órgão e o antro 20% (**Figura 1**) (KLEINMAN, 2008).

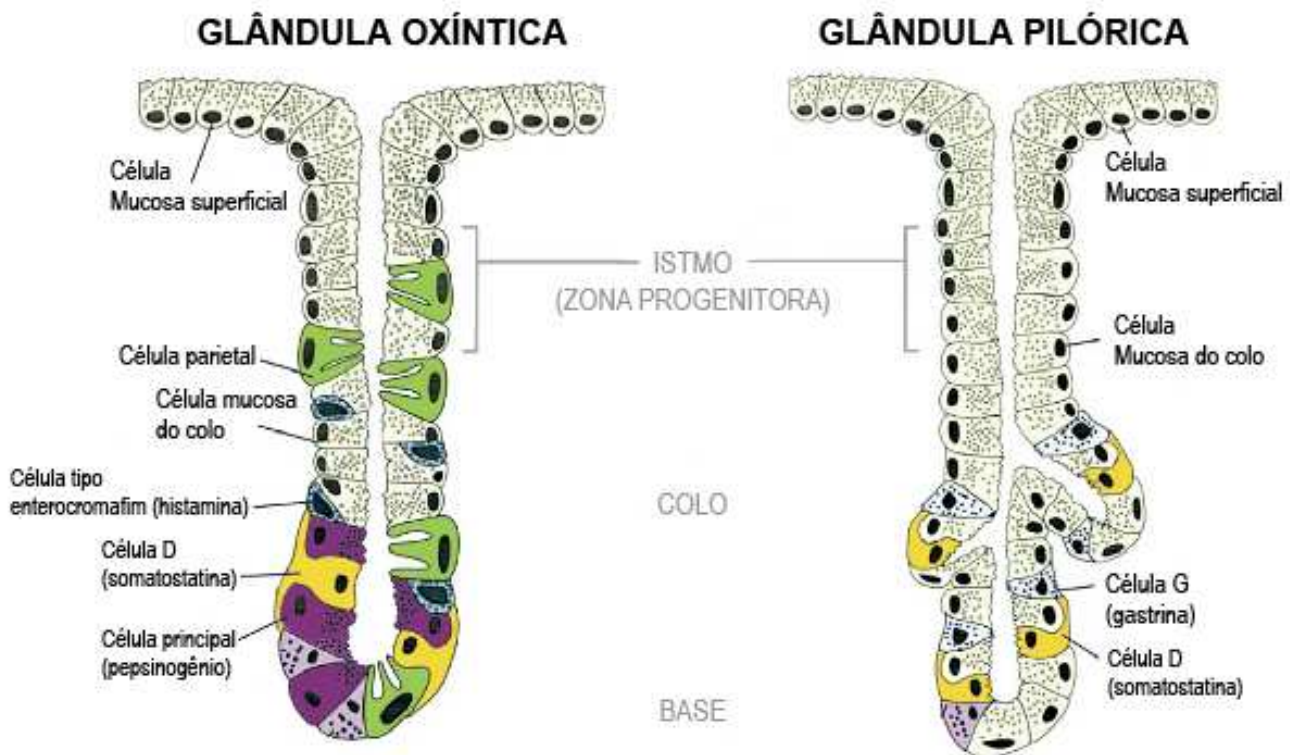


**Figura 1** - Anatomia do estômago (FOX & WANG, 2007).

O estômago possui três funções motoras que são armazenamento, mistura e esvaziamento. A parte proximal do estômago, fundo e corpo, atua como um reservatório para os materiais não digeridos e é responsável pelo esvaziamento de líquidos. Os líquidos são eliminados do estômago devido à pressão intragástrica que é gerada por contrações musculares na região do corpo do estômago. A parte distal do estômago, antro, é responsável pela trituração e mistura dos alimentos sólidos e atua como uma bomba para o esvaziamento dos

sólidos através de ações propulentes. Portanto, através da secreção de suco gástrico e contrações do estômago na região do antro os alimentos são triturados e amassados promovendo a mistura e homogeneização (HEJAZI & AMIJI, 2003). A ingestão de comida e a distensão do estômago induzem a secreção de 2 a 3 litros de suco gástrico por dia, que é constituído principalmente por HCl, pepsinogênio, muco e água e é influenciado pela quantidade e viscosidade do alimento ingerido e pelo conteúdo de proteína. O HCl promove a desnaturação ácida das partículas de alimento, ativa o pepsinogênio e mata a maioria das bactérias ingeridas. Ondas peristálticas originadas da parede do estômago propagam-se em direção ao antro ocasionando mistura do conteúdo antral e forçando-o em direção ao piloro. A primeira porção de alimento passa diretamente para o duodeno desencadeando o fechamento do esfíncter pilórico. Ocorre novamente mistura do conteúdo gástrico que foi impelido de volta e os sólidos são evacuados pelo piloro lentamente e regularmente. Durante esse processo o estômago transforma seu conteúdo em uma mistura denominada quimo que é constituída por solução aquosa, gorduras e sólidos. As ondas peristálticas intensas promovem o esvaziamento antral, permitindo que o conteúdo gástrico passe através do piloro para o duodeno. O tamanho das partículas que passam do estômago para o duodeno são menores que 1 a 2 mm entretanto 90% dos alimentos sólidos são esvaziadas como partículas menores que 0,25 mm em diâmetro (DRESSMAN *et al.*, 1998; KONG & SINGH, 2008).

A mucosa do estômago é constituída de diferentes tipos celulares incluindo células superficiais e várias células secretoras localizadas nas glândulas gástricas que são invaginações tubulares originadas a partir do assoalho do estômago. Na região do corpo e fundo estão localizadas as glândulas oxínticas enquanto na região do antro estão localizadas as glândulas pilóricas (**Figura 2**) (SCHUBERT & PEURA, 2008).

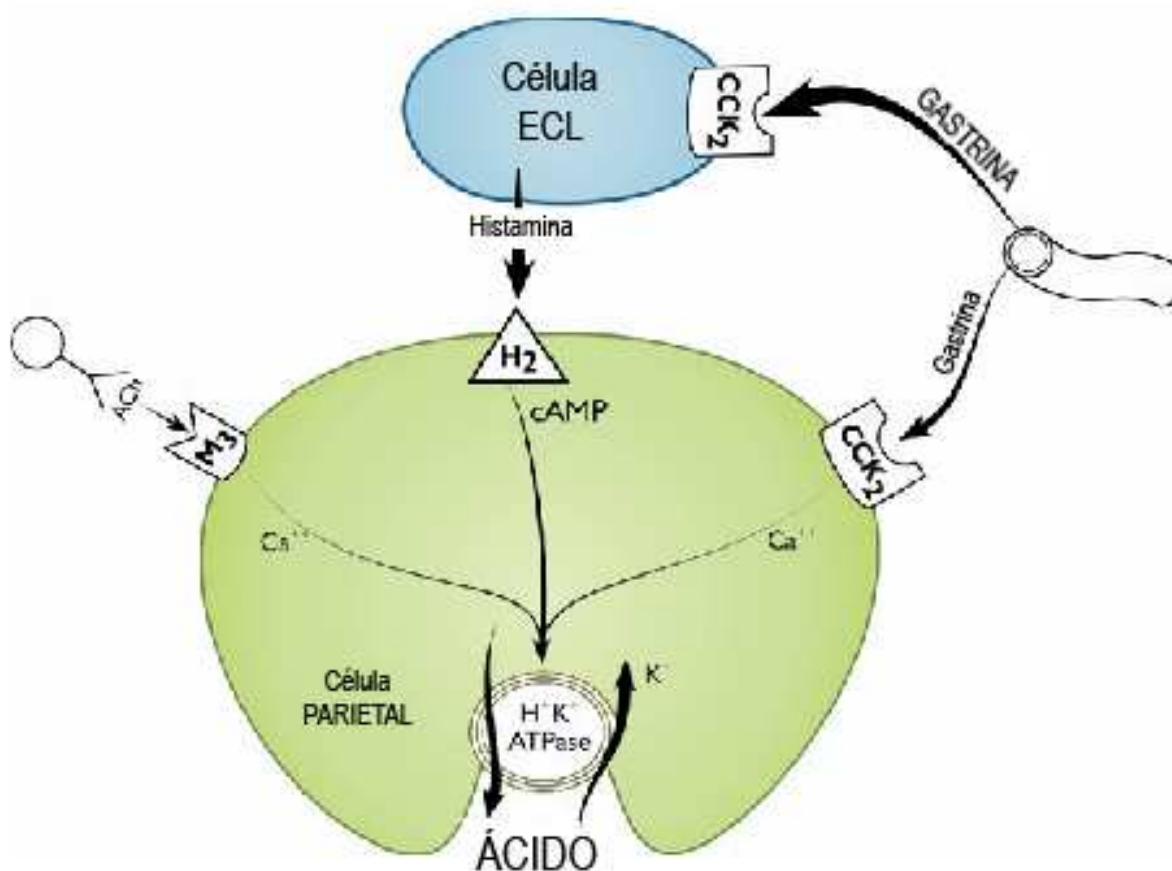


**Figura 2** - Anatomia das glândulas gástricas (SCHUBERT & PEURA, 2008).

As glândulas oxínticas são organizadas em unidades tubulares verticais. Cada unidade consiste de uma região apical contendo uma abertura, um istmo e a região glandular, a qual é representada na parte inferior da unidade e é formada de um colo e de uma base. Na região do istmo localizam-se as células progenitoras responsáveis pela formação de todas as células epiteliais gástricas. As células mucosas produtoras de muco localizam-se acima da região do istmo em direção ao lúmen, as células parietais que são responsáveis pela produção de ácido clorídrico localizam-se na região mediana e mais inferior da glândula, já as células zimogênicas predominam na base da glândula e secretam pepsinogênio e leptina. No interior da glândula também estão contidas células neuroendócrinas como as células tipo enterocromafins (ECL) que contém histamina, células D que contém somatostatina e amilina, células enterocromafins que contém peptídeos natriuréticos atrial (ANP) e células tipo A ou Gr que contém gelim e obestatin. Nas glândulas pilóricas estão presentes as células G secretoras de gastrina, células D

contendo somatostatina cuja função nessa região é exercer um controle parácrino da secreção gástrica pelas células G. As glândulas pilóricas também contêm células enterocromafins e células tipo K ou células Gr. A secreção ácida gástrica está sujeita a uma complexa regulação por mediadores endócrinos, parácrinos e neurócrinos que interagem extensivamente. Os principais estimulantes são a histamina, a gastrina e a acetilcolina (POHL *et al.*, 2008). Esses agentes interagem com receptores associados aos dois principais sinalizadores de transdução sendo adenilato ciclase no caso da histamina e intracelular de cálcio no caso de gastrina e acetilcolina. Cada um desses agentes atua diretamente estimulando a célula parietal ou indiretamente modulando a secreção pelas células neuroendócrinas (SCHUBERT & PEURA, 2008).

A histamina, produzida pelas células tipo enterocromafins, estimula a produção e a secreção ácida diretamente ligando-se aos receptores H2 das células parietais ou indiretamente ligando-se aos receptores H3 das células D inibindo a somatostatina e conseqüentemente estimulando histamina e a secreção ácida. A gastrina, produzida pelas células G, é o principal estimulante de secreção ácida durante a ingestão de alimentos. Ela media uma ação estimulante nas células parietais indiretamente, induzindo a liberação de histamina pelas células tipo enterocromafins ao se ligar aos seus receptores CCK2 (colecistocinina 2), e diretamente ligando-se a receptores CCK2 das células parietais, sendo este de menor importância fisiológica. A acetilcolina, liberada pelos neurônios entéricos pós-ganglionares, estimula a liberação de secreção ácida diretamente ligando-se aos receptores muscarínicos M3 localizados nas células parietais. A acetilcolina também estimula a secreção ácida indiretamente por ativação dos receptores M2 e M4 localizados nas células D para inibir a secreção de somatostatina e conseqüentemente remover o controle exercido por esse peptídeo sobre a gastrina, ECL e células parietais (**Figura 3**) (POHL *et al.*, 2008; SCHUBERT & PEURA, 2008).



**Figura 3** - Modelo ilustrando os receptores das células parietais e da transdução (SCHUBERT & PEURA, 2008).

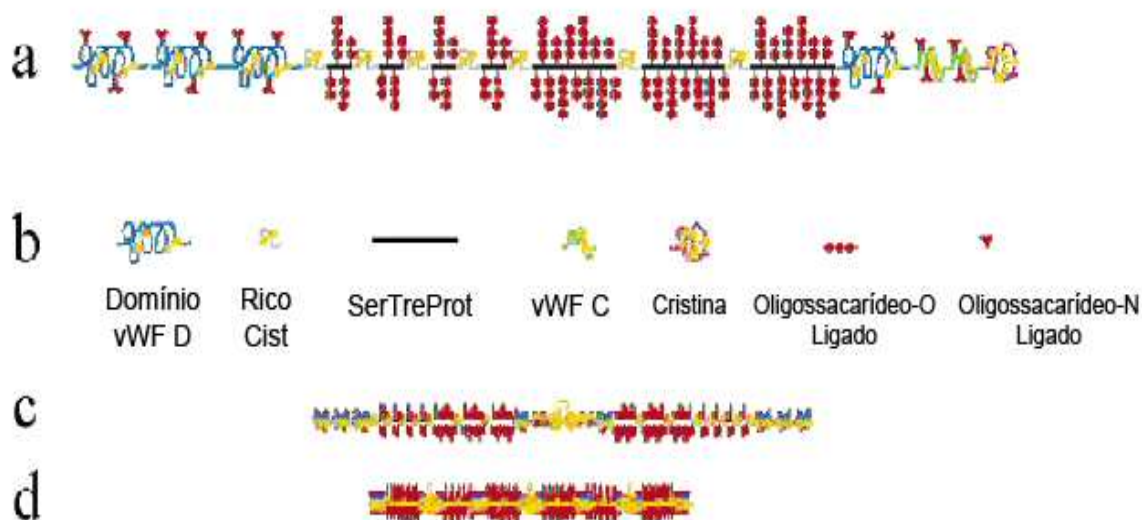
O trato gastrointestinal é constituído por quatro camadas: a mucosa (camada mais interna), a submucosa, a camada muscular externa e a serosa. A mucosa é coberta por uma camada de muco secretada pelas células epiteliais que constituem a camada mais superficial da mucosa. No estado em jejum o pH do estômago varia de 0,8 a 2,0 devido a secreção de íons hidrogênio. A ingestão de alimentos causa o aumento do pH para 4 ou 5 devido aos efeitos de diluição e tamponamento. A secreção de bicarbonato no duodeno neutraliza o ácido gástrico aumentando o pH para aproximadamente 5,5 no estado alimentado ou em jejum (VARUM *et al.*, 2008). A mucosa gástrica mantém sua integridade estrutural e funcional apesar da contínua exposição a fatores nocivos, incluindo HCl 0,1 mol/L e pepsina que são capazes de digerir tecidos. Sob condições normais, a

integridade da mucosa é mantida por mecanismos de defesa, os quais incluem fatores pré-epiteliais caracterizado pela barreira muco-bicarbonato-fosfolipídeos e pela barreira epitelial caracterizada pela justaposição das células epiteliais e secreção de bicarbonato, muco, fosfolipídeos, peptídeos e prostaglandinas. Outros mecanismos de defesa importantes estão ligados à contínua renovação celular, ao contínuo fluxo sanguíneo através dos capilares da mucosa, a inervação sensorial e a geração de prostaglandinas e ácido nítrico. A lesão da mucosa pode ocorrer quando os fatores nocivos oprimem a defesa intacta da mucosa ou quando a defesa da mucosa é prejudicada (LAINE *et al.*, 2008). A primeira linha de defesa da mucosa é formada por gel mucoso, bicarbonato e fosfolipídeos que cobrem a superfície da mucosa. O pH do lúmen gastroduodenal se aproxima de 2 enquanto que na camada adjacente ao epitélio o pH é aproximadamente neutro (pH 7). Este gradiente de pH que ajuda a proteger a membrana mucosa da digestão pela pepsina, uma enzima ácido-dependente, é mantido pela secreção de íons bicarbonato e pelo muco produzidos pelas células epiteliais gástricas (BARDONNET *et al.*, 2006). Como resultado da erosão ocasionada por proteases luminal e fratura mecânica, a mucina precisa ser constantemente secretada para a preservação da camada de muco. Em condições fisiológicas normais a secreção do muco é proporcional ao processo de erosão e, portanto, mantém uma adequada proteção da camada (HOU *et al.*, 2003). Embora a secreção de muco possa variar dependendo da idade, sexo, localização no corpo e condições de saúde, a média de renovação do muco é de aproximadamente 6 horas (SERRA *et al.*, 2008). A renovação celular contínua das células progenitoras mantém a integridade estrutural da mucosa. O epitélio é continuamente renovado por uma proliferação bem coordenada e controlada de células progenitoras permitindo a substituição de células epiteliais velhas ou agredidas. A completa substituição da superfície epitelial gástrica ocorre entre 3 a 7 dias, enquanto meses são requeridos para substituir as células glandulares (LAINE *et al.*, 2008).

O muco protege a mucosa gástrica contra agressões físicas ou químicas através de uma variedade de mecanismos (KLEINMAN, 2008). Sua função primária é lubrificar e proteger o epitélio contra dano mecânico causado pela

presença do alimento, enzimas digestivas, toxinas, carcinógenos e radicais livres. Ele provê um micro ambiente de pH estável para as células subjacentes e atua como uma barreira de difusão entre o lúmen e o epitélio (VARUM *et al.*, 2008). A camada do muco varia de 100 a 200  $\mu\text{m}$  em espessura dependendo da localização gástrica (BARDONNET *et al.*, 2006) e é composto por duas camadas: a primeira camada está aderida firmemente à mucosa gástrica e a camada seguinte que representa 40 a 60 % do muco, está em contato com o lúmen e adere frouxamente à camada mucosa (HOU *et al.*, 2003). O muco gástrico é composto por aproximadamente 95% de água, mas também contém mucinas, lipídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, colesterol e proteínas. As mucinas, principais componentes responsáveis pela elevada viscosidade do muco, são macromoléculas glicoproteicas extracelulares, com massa molar variando de 0,5 a 20 KDa. Do ponto de vista polimérico, as mucinas são copolímeros em bloco constituídos por blocos ramificados e não ramificados. Os dois tipos de blocos possuem esqueleto protéico em sua constituição sendo que os blocos ramificados possuem cadeias oligossacarídicas altamente ramificadas ligadas a eles e representam 75% do comprimento do esqueleto protéico. Nos blocos ramificados os principais aminoácidos presentes são serina, treonina e prolina. As cadeias laterais oligossacarídicas compostas por 2 a 19 monômeros exibem moderada ramificação e são constituídas por galactose, fucose, n-acetilglucosamina, n-acetilgalactosamina e ácido siálico (ácido N-acetilneurâmico), além de traços de manose e sulfato. Os oligossacarídeos são ligados à cadeia polipeptídica através de ligações O-glicosídicas e organizados em uma configuração “bottle-brush” sobre o núcleo protéico, onde as cadeias ramificadas são mais estendidas que as não ramificadas. Os açúcares são importantes para manter a conformação estendida da mucina. Os blocos não ramificados são regiões que possuem poucos oligossacarídeos O-glicosilados, contêm alguns oligossacarídeos N-ligados e são ainda regiões ricas em aminoácidos cisteína e aminoácidos como aspartato e glutamato que parecem estar envolvidas em dimerização através de formação de ligações dissulfeto e subseqüentemente polimerização dos dímeros para formar multímeros. Estas regiões têm uma composição de aminoácidos mais

representativa de proteínas globulares e têm sua conformação dependente da composição de aminoácidos e do meio de solução, sendo possíveis três conformações: rigid helix, random coil e compact globules (PEPPAS & HUANG, 2004). O núcleo protéico é organizado em distintas regiões sendo uma região central glicosilada compreendida por sequências de repetições rica em serina, treonina e prolina (STP repeats) e outra região rica em cisteína que se localiza em carboxila e amino terminal ou intercaladas entre STP-repeats (**Figura 4**) (HONG *et al.*, 2005; BANSIL & TURNER, 2006).



**Figura 4** - Estrutura da mucina gástrica. (a) Monômero de mucina gástrica consistindo de regiões glicosiladas e regiões de pouca glicosilação; (b) símbolos dos diferentes domínios; (c) formação de dímeros por ligação de duas unidades monoméricas via ligações dissulfeto na região não glicosilada; (d) formação de multímeros (HONG *et al.*, 2005).

Uma molécula de mucina é composta por 4 subunidades e cada subunidade é constituída por domínios-T. Cada domínio-T é composto por um bloco peptídico ramificado e um ou dois blocos peptídicos não ramificados terminais. Em solução aquosa, o esqueleto protéico é neutro ou hidrofóbico enquanto as cadeias oligossacarídicas são altamente hidrofílicas. Portanto se a densidade das cadeias



oligossacarídicas for muito alta e as cadeias forem longas, outras moléculas somente terão contato com as cadeias hidrofílicas dos oligossacarídeos, protegendo o segmento protéico. Além disso, a função das cadeias de açúcares ramificadas na conformação estendida é principalmente devido ao primeiro ou segundo resíduo de açúcar enquanto os outros resíduos são menos importantes (PEPPAS & HUANG, 2004). A carga elétrica das glicoproteínas é determinada pela presença de ácido siálico (pka aproximadamente 2,6) e resíduos de sulfato presente em grupos esterificados (HOU *et al.*, 2003; BARDONNET *et al.*, 2006).

## **2 *Helicobacter pylori***

O *H. pylori* é uma bactéria gram negativa que habita atualmente o estômago de aproximadamente 50% da população mundial (ALGOOD & COVER, 2006; FOX & WANG, 2007). Inicialmente, esta bactéria foi chamada de *Campylobacter pyloridis* e posteriormente *Campylobacter pylori*, mas, devido às características genéticas, estruturais e morfológicas específicas foi classificada em um novo gênero, o *Helicobacter* (STADE, 2003). A morfologia do *H. pylori*, observada à microscopia ótica e eletrônica, é homogênea, apresentando-se com estrutura encurvada ou espiralada, de superfície lisa e extremidades arredondadas. Eles são móveis, possuem de 4 a 6 flagelos, medem aproximadamente 0,5 a 0,1 µm de largura e 3 µm de comprimento, podem distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica, localizando-se no interior ou por baixo da camada de muco que recobre o epitélio da superfície do estômago. O *H. pylori* possui capacidade excepcional de aderência e é adaptado para colonizar somente a mucosa gástrica, sendo encontrado raras vezes em área de metaplasia intestinal. No duodeno a bactéria pode colonizar áreas de metaplasia gástrica. A afinidade do *H. pylori* pelas células mucíparas gástricas deve-se à composição neutra do muco gástrico, que difere dos mucopolissacarídeos ácidos produzidos pelas células caliciformes da metaplasia intestinal (LADEIRA *et al.*, 2003).

A infecção pelo *H. pylori* apresenta distribuição universal, embora seja significativamente menos prevalente nos países industrializados em todas as

faixas etárias, é adquirida principalmente na infância e adolescência, entretanto, a infecção é seguida por um longo período de fase de quiescência onde há uma gastrite crônica de intensidade variável, mas com sintomas mínimos, ou seja, a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática (FOX & WANG, 2007). A taxa de prevalência aumenta com a idade e isso parece ser devido ao contínuo risco de infecção. Em indivíduos com idade superior a 60 anos a curva de prevalência atinge um patamar ou entra em leve declínio. Quanto aos fatores de risco que influenciam a prevalência e a transmissão do *H. pylori*, estudos constataram que além da idade às baixas condições de saneamento básico e maior densidade de moradia parecem ser as variáveis mais importantes. O mecanismo exato de transmissão da bactéria continua desconhecido, embora saiba-se que a bactéria só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca por se tratar de microrganismo não invasivo (KODAIRA *et al.*, 2002) e a transmissão acontece principalmente dentro das famílias (MALATY, 2007). A presença do *H. pylori* associada com certos tipos de inflamações gastroduodenais podem levar ao desenvolvimento de gastrite aguda ou crônica, úlcera gástrica ou duodenal e câncer gástrico. A localização da úlcera e o desenvolvimento de câncer dependem do tipo e localização da gastrite (STADE, 2003), por exemplo, gastrite crônica predominantemente antral está relacionada à úlcera duodenal e representa menor risco de desenvolvimento de câncer gástrico do que a gastrite presente concomitantemente no antro e corpo. Estudos demonstraram que a gastrite crônica foi mais intensa em indivíduos com câncer gástrico do que em indivíduos com úlcera duodenal, ou seja, adenocarcinoma gástrico foi freqüentemente encontrado em áreas de inflamação crônica e em áreas de atrofia gástrica e metaplasia intestinal. Apesar disso, somente 10 a 15% dos indivíduos infectados com *H. pylori* desenvolvem úlcera péptica e estima-se que o risco de desenvolvimento de câncer gástrico seja aproximadamente de 1 a 3%. Já a úlcera péptica tende a se desenvolver em pacientes com 20 ou 30 anos enquanto câncer gástrico surge décadas mais tarde (FOX & WANG, 2007). Apesar de todas estas informações, *H. pylori* é uma espécie muito diversificada e o risco de adquirir

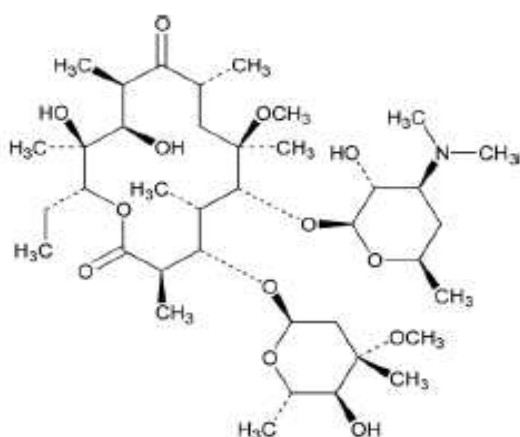
câncer pode ser aumentado com cepas que possuem genes associados à virulência, e ainda, devido aos fatores genéticos e ambientais (CONWAY, 2005).

A resistência ao ácido clorídrico é de vital importância na patogênese do *H. pylori*, visto que, sem esse atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. A bactéria sintetiza a enzima urease que atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia e dióxido de carbono e disparando mecanismos que possibilitam a entrada de uréia em seu interior e o refluxo de urease. A urease atua como receptor de  $H^+$  gerando pH neutro no interior e exterior da bactéria o que confere a esta bactéria resistência à acidez gástrica. Os níveis de íons amônio produzidos pelo processo de hidrólise da uréia, podem ser tóxicos para as células epiteliais superficiais gástricas e causar lesão epitelial (CONWAY, 2005). Além de ser caracterizada por possuir uma alta atividade de urease, a bactéria produz uma variedade de enzimas como superóxido dismutase, catalase e arginase que conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro. A forma espiralada e alta motilidade da bactéria permitem que ela resista ao esvaziamento gástrico e permaneça na mucosa gástrica. Entretanto mesmo com múltiplos mecanismos de adaptação ácida, *H. pylori* permanece susceptível ao meio ácido podendo sobreviver somente por poucos minutos em presença de baixo pH luminal. Por esse motivo esta bactéria na fase precoce de colonização necessita atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico e permanecer próximo à superfície epitelial onde o pH é próximo da neutralidade, como estratégia para minimizar sua exposição ao meio ácido. Tal camada é formada por um gel viscoelástico que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias. No entanto, lipases e proteases sintetizadas pelo *H. pylori* degradam a camada de muco facilitando sua progressão e os seus flagelos lhes conferem a propriedade de motilidade, habilitando a sua penetração na mucosa gástrica (LADEIRA *et al.*, 2003). Além disso, a habilidade do *H. pylori* em se mover e controlar sua orientação espacial através de respostas quimiotáticas é essencial para a sua colonização. Já no interior da mucosa gástrica

aproximadamente 20% destas bactérias são encontradas aderidas às superfícies das células, sendo ainda encontradas também nos espaços intercelulares e algumas vezes dentro das células epiteliais (ALGOOD & COVER, 2006; AMIEVA & EL-OMAR, 2008).

### 3 Claritromicina

A claritromicina é um antibiótico macrolídeo semi-sintético derivado da eritromicina A que assim como ela possui um anel lactâmico de 14 membros ao qual se ligam os dois desoxi – açúcares, cladinose e desosamina, nas posições 3 e 5 respectivamente, através de ligações  $\beta$  – glicosídicas, que confere a claritromicina um caráter básico. A claritromicina difere estruturalmente da eritromicina A somente pela metilação de um grupo hidroxila na posição 6 do anel lactâmico (KANFER *et al.*;1998). A presença do grupo metil nessa posição resulta em maior estabilidade da claritromicina em meio ácido, redução de efeitos adversos gastrintestinais e aumento do espectro de atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos gram positivos e gram negativos, aeróbicos e anaeróbicos quando comparada com a eritromicina (MORGAN *et al.*; 1991; GAN *et al.*, 1992). Como a eritromicina não possui o grupo metila, ela sofre degradação ácida com mais facilidade e alguns dos produtos de degradação gerados, estão associados ao aumento da motilidade gastrintestinal e podem contribuir para efeitos adversos gastrintestinais (AHFS, 2000). Além disso, como a claritromicina não possui duplas conjugadas no anel lactâmico, não há absorvância significativa no ultravioleta sendo obtida apenas em baixos comprimentos de onda (**Figura 5**).



**Figura 5** - Fórmula estrutural da claritromicina.

A claritromicina possui fórmula molecular  $C_{38}H_{69}NO_{13}$  e massa molar de 748 (USP, 2006a). Ela é uma base fraca cujo pKa é igual a 9,2, existindo na forma ionizada no estômago mesmo em pH neutro (GRUBEL & CAVE, 1998). A estabilidade ótima da claritromicina foi observada em uma faixa de valores de pH entre 5 e 8 em solução aquosa tamponada e amostras de suco gástrico. Em valores de pH abaixo de 5 a taxa de degradação aumentou acentuadamente sendo que sua meia vida de degradação em valores de pH 2 foi aproximadamente de 1 hora (ERAH *et al.*, 1997). A claritromicina se apresenta como um pó cristalino, de cor branca, inodoro, com ponto de fusão entre 217<sup>0</sup>C a 225<sup>0</sup>C e é praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona, ligeiramente solúvel em acetonitrila, etanol e metanol; e altamente solúvel em tampão fosfato em valores de pH de 2 a 5 (Farmacopéia Brasileira, 2003; MOFFAT *et al.*, 2004). A solubilidade da claritromicina em tampão fosfato diminui com a elevação dos valores de pH tornando-se constante acima de pH 9, e sua solubilidade em água diminui com o aumento da temperatura (NAKAGAWA *et al.*, 1992). Quimicamente a claritromicina é o (2R, 3S, 4S, 5R, 6R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13R) – 3 – (2, 6 - Dideoxy - 3 - C, 3 - O - dimethyl -  $\alpha$  - L - ribohexopyranosyloxy) – 11, 12 – dihydroxy – 6 – methoxy – 2, 4, 6, 8, 10, 12 – hexamethyl – 9 – oxo – 5 – (3, 4, 6, - trideoxy – 3 – dimethylamino –  $\beta$  - D - xylohexopyranosyloxy) pentadecan – 13 – olide (MOFFAT *et al.*, 2004)

A claritromicina é bacteriostática, embora possa ser bactericida em altas concentrações ou contra microrganismos altamente suscetíveis. Quando administrada por via oral, ela sofre rápida absorção pelo trato gastrointestinal, porém sua biodisponibilidade é reduzida entre 52% e 55% devido ao rápido metabolismo de primeira passagem (CHU *et al.*, 1992a; RODVOLD, 1999; MOFFAT *et al.*, 2004) e sua concentração plasmática máxima é alcançada entre 1h30 a 3 horas após a administração do fármaco (CHU *et al.*, 1992b). A formulação padrão de claritromicina pode ser administrada com ou sem alimento (CHU *et al.*, 1992c). A claritromicina e seu metabólito ativo, a 14-hidroxiclaritromicina, distribuem-se amplamente por todo o tecido e atingem concentrações intracelulares elevadas, geralmente superiores as concentrações séricas. A ligação de claritromicina às proteínas plasmáticas e o seu tempo de meia vida de eliminação dependem da dose e varia de 3 a 4 horas e de 5 a 7 horas, quando ingeridas 2 vezes ao dia doses variando de 250 a 500 mg. O tempo de meia vida de eliminação do metabólito ativo 14-hidroxiclaritromicina é aproximadamente de 5 a 6 horas e de 7 horas, quando são ingeridas 2 vezes ao dia doses de 250 e 500 mg (MOFFAT *et al.*, 2004). A quantidade de claritromicina excretada de modo inalterado na urina varia de 20 a 30%, dependendo da dose administrada e da formulação.

#### **4 Tratamento da infecção por *H. pylori***

Nas reuniões dos consensos de Maastricht o grupo europeu para o estudo do *Helicobacter* revisou as diretrizes para o tratamento da infecção por *H. pylori*. A erradicação do *H. pylori* foi fortemente recomendada para pacientes com úlcera péptica gastroduodenal ativa ou cicatrizada, incluindo as lesões complicadas, linfoma tipo MALT de baixo grau, gastrite atrófica, pós-ressecção de câncer gástrico, em familiares de primeiro grau dos pacientes com câncer gástrico, na condição do anseio do paciente e em pacientes com dispepsia não investigada dependendo da prevalência de *H. pylori*. O tratamento também foi considerado em várias outras condições como anemia ferropriva de causa obscura e púrpura

trombocitopênica idiopática. Quanto aos pacientes dispépticos, os membros do consenso de Maastricht consideraram recomendável a estratégia de pesquisar e erradicar *H. pylori*, empregando um teste não invasivo para pacientes sem sinais de alarme e com idade abaixo dos 45 anos. Foi sugerido que o ponto de corte da idade podia variar entre os países dependendo da prevalência de câncer gástrico. Até recentemente, os resultados dos estudos verificando o impacto da erradicação de *H. pylori* na prevenção do câncer gástrico ainda não foram definidos e permanece para ser decidido se a indicação será amplamente aceita (CONWAY, 2005; CHEY *et al.*, 2007; MALFERTHEINER *et al.*, 2007; WOLLE & MALFERTHEINER, 2007).

Os esquemas de tratamento do *H. pylori* recomendados atualmente não são totalmente efetivos, possuindo uma taxa de erradicação de 80 a 95 %. A primeira linha de terapia para erradicar *H. pylori* idealmente seria um tratamento rápido, de fácil administração, bem tolerável e de custo relativamente baixo, entretanto, o objetivo principal de qualquer tratamento para combatê-lo é a erradicação da infecção em um maior número possível de pacientes (SCARPIGNATO, 2004). Embora *H. pylori* seja sensível a muitos antibióticos *in vitro*, estudos *in vivo* revelaram que poucos antibióticos promoveram eficácia clínica. As razões para isso são o inadequado acúmulo do antibiótico no tecido gástrico, a inadequada eficácia do antibiótico no nicho ecológico do *H. pylori* e o rápido desenvolvimento de resistência pelo patógeno (LABENZ, 2001). A bactéria pode residir abaixo da mucosa gástrica aderente, no epitélio gástrico, limitando o acesso da droga a esse sítio. Além disso, o meio hostil do estômago reduz a biodisponibilidade do antibiótico no sítio de ação contribuindo para falha no tratamento (CONWAY, 2005). O antibiótico com o maior potencial de erradicação em monoterapia *in vivo* é o macrolídeo claritromicina, entretanto, a monoterapia para combater *H. pylori* é contra-indicada devido à baixa taxa de erradicação, atingindo aproximadamente 30% em diversos estudos (LABENZ, 2001). A combinação de drogas é essencial para maximizar a chance de erradicação da infecção e minimizar o risco de resistência bacteriana. Tem sido recomendado o uso de dois antibióticos em combinação com um inibidor de bomba de prótons (PPI). A terapia tripla utilizando

um PPI em dose padrão, claritromicina de 500 mg e amoxicilina de 1 g ou metronidazol de 400 ou 500 mg, duas vezes ao dia, permanece a terapia de primeira linha em populações com prevalência de resistência à claritromicina menor que 15 a 20%. Em populações com prevalência de resistência ao metronidazol menor que 40%, a associação de PPI, claritromicina e metronidazol é preferível. Em cepas susceptíveis, essa combinação resulta em uma melhor taxa de erradicação que a combinação de PPI, claritromicina e amoxicilina (WOLLE & MALFERTHEINER, 2007).

A duração da terapia é controversa. Na Europa a duração do tratamento é de sete dias enquanto que nos Estados Unidos são recomendados 10 dias ou mais. As alternativas para terapia tripla incluem terapia quádrupla, terapia seqüencial e terapia tripla utilizando antimicrobianos como levofloxacina, rifabutina e furazolidona (VAKIL & MEGRAUD, 2007). A terapia quádrupla, composta por PPI, tetraciclina, metronidazol e um sal de bismuto é uma alternativa às terapias de primeira linha em áreas de alta prevalência de resistência a antibióticos (MALFERTHEINER *et al.*, 2007). Esse tratamento permanece a principal opção de terapia de segunda linha se ele não foi usado como medicação de primeira linha, entretanto, sal de bismuto não é disponível em alguns países devido à sua suposta toxicidade (WOLLE & MALFERTHEINER, 2007). Os principais problemas relacionados com esse regime de tratamento estão ligados ao grande número de comprimidos ou cápsulas que precisam ser ingeridos e a duração da terapia. Por outro lado, as principais vantagens dessa terapia são o baixo custo e o regime de tratamento permanecer efetivo nas áreas onde a resistência à claritromicina é alta. Nos Estados Unidos, utilizando a terapia quádrupla, subsalicilato de bismuto (150 mg de bismuto por comprimido), tetraciclina 500 mg e metronidazol 250 mg são administrados em uma dose de 2, 1 e 1 comprimidos, respectivamente, 4 vezes ao dia. A terapia seqüencial é a mais recente inovação no tratamento de *H. pylori*. Ela é um tratamento de 10 dias que consiste em administrar um PPI e 1 g de amoxicilina, duas vezes ao dia por um período de 5 dias, seguido por terapia tripla composta por PPI, claritromicina 500 mg e tinidazol 500 mg, duas vezes diariamente por um período de 5 dias. Uma série de estudos realizados na Itália



tem mostrado excelentes resultados utilizando esse regime de tratamento. O mecanismo preciso para o sucesso da terapia seqüencial não é conhecido. Sabe-se que a bactéria pode desenvolver canais de efluxo para claritromicina, o qual rapidamente transfere a droga para fora da célula bacteriana, impedindo a sua ligação ao ribossomo. A amoxicilina atua na parede celular bacteriana enfraquecendo-a, portanto, a fase inicial do tratamento pode prevenir o desenvolvimento de canais de efluxo por enfraquecer a parede celular bacteriana. De particular interesse foi o sucesso da terapia seqüencial em pacientes com cepas resistentes à claritromicina, apresentando taxa de erradicação de 91% enquanto a terapia tripla padrão foi de 29% (VAKIL & MEGRAUD, 2007). Além desses, outros três regimes de tratamento contendo rifabutina, levofloxacina ou furazolidona têm apresentado sucesso em terapias de erradicação de segunda ou terceira linha de tratamento em experimentos na Europa e na Ásia (VAKIL & MEGRAUD, 2007). Devido às variedades ligadas a clínica e da disponibilidade dos antibióticos nos diferentes países nenhuma recomendação específica foi dada para o tratamento de terceira escolha, exceto realizar o teste de susceptibilidade. Antibióticos como fluoroquinolona, levofloxacina e rifabutina têm sido avaliados mais como tratamentos de primeira escolha com PPI e amoxicilina que retratamento, com um bom índice de sucesso (MALFERTHEINER *et al.*, 2007)

No segundo consenso brasileiro sobre *Helicobacter pylori*, além do esquema de tratamento mundialmente indicado, outros dois regimes de tratamento contendo furazolidona foram também recomendados devido ao custo bastante acessível e por ser particularmente útil para os pacientes com impedimento para o uso de amoxicilina, evidenciando excelente índice de erradicação do microrganismo, embora ocorra um maior número de efeitos adversos. O esquema terapêutico corresponde à combinação de claritromicina de 500 mg e furazolidona de 200 mg administradas duas vezes ao dia e um PPI padrão administrado uma vez ao dia, durante sete dias. Também a combinação de furazolidona de 200 mg administrada duas vezes ao dia, cloridrato de tetraciclina de 500 mg administrado quatro vezes ao dia e um PPI administrado uma vez ao dia, durante sete dias foi incluída como forma de oferecer opção terapêutica envolvendo antimicrobianos que hoje se

encontram disponíveis para a população na rede do sistema único de saúde, entretanto, um estudo nacional indicou menor erradicação do *H. pylori* desse tratamento quando comparado ao regime utilizando claritromicina. Caso ocorra falência de um dos tratamentos iniciais propostos pelo consenso, recomendou-se ainda mais duas tentativas de tratamento, com duração de 10 a 14 dias, não se estendendo ou repetindo o esquema inicial (COELHO & ZATERKA, 2005).

A eficácia de um antibiótico contra *H. pylori in vivo* é basicamente influenciado pela sua concentração na mucosa gástrica, sua estabilidade e sua atividade antibacteriana. Esses três aspectos são influenciados pela acidez gástrica e também por drogas anti-secretoras (LABENZ, 2001). Na terapia de erradicação do *H. pylori* os inibidores da bomba de prótons aumentam o pH intragástrico favorecendo várias ações farmacológicas importantes, como o aumento da estabilidade e eficácia dos antibióticos. Além disso, promovem a redução do esvaziamento gástrico levando ao aumento do tempo de residência do antibiótico no estômago e promovem a diminuição da viscosidade do muco ocasionando aumento da penetração dos antibióticos na camada mucosa (SCARPIGNATO, 2004). Como o crescimento do *H. pylori* é mais pronunciado em uma faixa estreita de pH, entre 5 e 7, esta terapêutica adjuvante, além de promover melhor atividade dos antimicrobianos pH-dependentes, irá facilitar a replicação bacteriana, fase esta em que os microrganismos se tornam mais vulneráveis à ação de alguns antibióticos, como por exemplo com a claritromicina que interfere na síntese protéica. A redução do volume da secreção gástrica pelos anti-secretoras também contribui para uma ação mais eficaz dos antimicrobianos ao aumentar sua concentração na mucosa gástrica (COELHO *et al.*, 2004).

## **5 Formas farmacêuticas de retenção gástrica**

Vencer as barreiras fisiológicas do trato gastrointestinal humano é o principal desafio para o sucesso do desenvolvimento de sistemas retentivos gástricos. Além da espessa camada protetora de muco, os padrões de motilidade gastrointestinal também são obstáculos para a liberação de drogas no estômago (CONWAY,

2005). Portanto, torna-se necessário compreender a relação entre esvaziamento gástrico da forma farmacêutica e a motilidade gástrica (HEJAZI & AMIJI, 2003). Como o tempo de residência gástrico é geralmente curto em condições de jejum e variável no estado alimentado, mesmo altas doses de antibióticos podem não atingir concentrações desejáveis no sítio de ação. Portanto o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais com tempo de residência gástrico prolongado é desejável. O tempo de residência gástrico da formulação farmacêutica dependerá da fase do complexo motor migrante interdigestivo (CMMI) que estará ativa quando ela for administrada. O sistema de retenção gástrica deverá ser capaz de resistir às forças do CMMI por um período prolongado. É geralmente aceito que para formulações de sistema de dosagem unitário o diâmetro da partícula deverá ser maior que 15 mm para prolongar o tempo de retenção, especialmente durante o estado de jejum (BARDONNET *et al.*, 2007). Apesar de ter sido mostrado que a administração de omeprazol prolonga o tempo de residência gástrico, o efeito da alimentação no esvaziamento gástrico é muito mais significativo (CONWAY, 2005). Embora muitos sistemas retentivos gástrico tenham sido desenvolvidos, poucos obtiveram êxito em melhorar o tempo de residência gástrico (HEJAZI & AMIJI, 2003).

Nas duas últimas décadas, numerosas formulações têm sido designadas para prolongar o tempo de retenção gástrico. Elas podem ser classificadas em intumescíveis, alta densidade, flutuantes e mucoadesivas. Os sistemas intumescíveis utilizam polímeros que intumescem quando entram em contato com o fluido gástrico aumentando de tamanho de modo que não consigam passar através do piloro, assim, o sistema fica retido no estômago por um longo período de tempo. O equilíbrio entre o intumescimento e a velocidade de degradação do polímero é essencial para obter boa resposta farmacológica e evitar efeitos secundários (BARROCAS *et al.*, 2007). A densidade da forma farmacêutica determina a localização do sistema no estômago. Sistemas que possuem menor densidade que o conteúdo gástrico podem flutuar na superfície, enquanto sistemas de alta densidade são encontrados no fundo do estômago. Ambas as posições podem isolar o sistema farmacêutico do piloro. Os sistemas de alta

densidade têm como objetivo fixar-se no fundo do estômago e resistir aos movimentos peristálticos. Densidade de aproximadamente  $2,5 \text{ g/cm}^3$  parece ser fundamental para obtenção de um tempo de residência gástrico significativamente prolongado. Embora resultados animadores tenham sido relatados em ruminantes, a eficácia em seres humanos não foi observada. Os sistemas flutuantes possuem densidade menor que o conteúdo gástrico e permanecem flutuando no estômago por um período de tempo prolongado com o potencial para liberar a droga continuamente. Estes sistemas dependem da presença de alimento para retardar o esvaziamento e de uma quantidade de líquido suficiente no estômago para permanecer flutuando (BARDONNET *et al.*, 2006). Os sistemas mucoadesivos utilizam polímeros naturais ou sintéticos com o objetivo de prolongar o tempo de retenção gástrico (TRG) e controlar a liberação do fármaco. A adesão dos polímeros à membrana mucosa pode ser mediada por processos de hidratação, ligação química ou mecânica, ou ainda, mediada por receptores (BARROCAS *et al.*, 2007). Em relação aos sistemas flutuantes, os sistemas mucoadesivos têm a vantagem de não depender da presença de conteúdo gástrico para permanecer no estômago (JACKSON *et al.*, 2000).

Mucoadesão pode ser definida como o fenômeno de ligação de polímeros naturais ou sintéticos à superfície mucosa (SERRA *et al.*, 2008; VARUM *et al.*, 2008). As vantagens desse sistema são: adesão localizada da droga facilitando a absorção no local desejado, facilidade para revestimento de tecidos danificados e a lubrificação de certas regiões (cavidades oral, ocular e vaginal). Como principal desvantagem deve-se considerar que, como as ligações mucoadesivas têm natureza muito heterogênea, é extremamente difícil identificar o tipo de ligação e os grupos envolvidos na mucoadesão (SMART, 2005). Sistemas de liberação de drogas mucoadesivas para o trato gastrointestinal requerem um potencial adesivo mais potente que sistemas de aplicação tópica, cavidade nasal, mucosa oral (bucal, sublingual ou gengival), reto ou pele, porque o sistema necessita aderir sob condições dinâmicas. Além disso, uma forma farmacêutica pesada e volumosa, como por exemplo, um comprimido, pode se destacar da mucosa e ser esvaziada para o trato gastrointestinal (AKIYAMA *et al.*, 1995).

As mucinas, presentes no trato gastrointestinal, contêm numerosos grupos capazes de formar ligações de hidrogênio, tais como, grupos hidroxilas das cadeias oligossacarídicas ramificadas, grupos amidas da cadeia protéica e alguns grupos carboxílicos ou sulfatos nos segmentos terminais das cadeias ramificadas. Entretanto, o meio aquoso exerce um importante efeito nas interações entre as cadeias poliméricas porque somente doadores e aceptores de ligações de hidrogênio fortes, comparado com moléculas de água, podem formar interações efetivas mucina-polímero. Nesse sentido, os grupos hidroxilas das cadeias de açúcares ramificadas podem não ser importantes sítios para formação de ligações de hidrogênio em solução aquosa porque sua habilidade em formar estas ligações não é consideravelmente mais forte que a água. Também os grupos localizados nas cadeias polipeptídicas ramificadas podem não ser importantes para a interação mucina-polímero devido à sua estrutura bottle-brush, onde os segmentos protéicos são praticamente cobertos pelas cadeias laterais hidrofílicas, fazendo que esses grupos não estejam disponíveis para as interações intercadeias. Portanto, ácidos carboxílicos e grupos sulfatos localizados nas terminações das cadeias laterais é que poderão exercer uma importante função em formar ligações de hidrogênio com os polímeros. Como as ligações de hidrogênio iônicas são mais fortes que as ligações de hidrogênio neutras, e como o ácido siálico e os açúcares sulfatados estão negativamente carregados em pH superior a 3, sua habilidade é mais forte que a água para formar ligações de hidrogênio (PEPPAS & HUANG, 2004).

Os polímeros mucoadesivos são classificados quanto à forma de adesão em polímeros de primeira e de segunda geração. Os polímeros de primeira geração aderem às mucosas não especificamente através de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Já os de segunda geração são capazes de formar ligações covalentes com o muco e células adjacentes exibindo melhores interações químicas. Polímeros mucoadesivos tiolados, que formam apenas ligações covalentes com o muco, e as lecitinas que possuem a propriedade de se ligar a certos açúcares da membrana celular são exemplos de polímeros de segunda geração (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005). Entre os

polímeros contendo grupos tiolados podemos citar o polímero carbofil conjugado com cisteína que exerce forte mucoadesão devido às ligações dissulfeto covalentes formadas entre o polímero modificado e as mucinas que também possuem domínios ricos em cisteína. As lecitinas possuem a propriedade de se ligar em carboidratos com considerável especificidade, podem reconhecer e se ligar especificamente em receptores da membrana celular e têm forte afinidade pela mucina da camada mucosa (PEPPAS & HUANG, 2004). Os polímeros mucoadesivos de primeira geração são geralmente macromoléculas hidrofílicas que contêm numerosos grupos funcionais que podem ser hidroxila, carboxila, amina ou amida, capazes de estabelecer ligações de hidrogênio e possuem a propriedade de sofrer hidratação e intumescência quando são colocados em contato com uma solução aquosa. Esses materiais necessitam sofrer hidratação para adquirirem propriedades adesivas, mas quando essa é excessiva resulta na formação de uma mucilagem escorregadia e na perda das propriedades adesivas (MORTAZAVI, 1995). LEUNG & ROBSON (1990) sugeriram que uma quantidade suficiente de água é necessária para hidratar e expandir as cadeias mucoadesivas disponibilizando os sítios adesivos para a formação de ligações criando poros ou canais para difusão das cadeias do polímero e mobilizando as cadeias do polímero para interpenetração. Entretanto se uma quantidade de água excessiva estiver disponível, o polímero hidratado começa a formar gel e eventualmente uma mucilagem escorregadia resultando em perda das propriedades mucoadesivas, pois ele dissolve na água disponível. Em outro estudo, PEPPAS & BURI (1985) verificaram que as características do polímero necessárias para mucoadesão como ter grupos de ligações de hidrogênio fortes, cargas iônicas fortes, elevada massa molar e flexibilidade suficiente das cadeias e propriedades de energia de superfície favorecem o espalhamento dentro do muco.

Os polímeros mucoadesivos podem ser classificados quanto à sua origem, (natural ou sintética); à sua solubilidade em água (solúveis ou insolúveis), e ainda, quanto à carga iônica da sua superfície (catiônicos, aniônicos ou neutros) (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005). Alguns exemplos de polímeros utilizando esta classificação estão apresentados na **Tabela 1**. Além dessa classificação os

polímeros também podem ser classificados em biodegradáveis e não biodegradáveis; hidrofílicos, hidrogéis ou termoplásticos; e ainda; homopolímeros, heteropolímeros ou blends. Polímeros hidrofílicos são aqueles que intumescem indefinidamente em contato com água e eventualmente sofrem completa dissolução, enquanto os hidrogéis são polímeros que intumescem em água com limitada capacidade de intumescimento. Polímeros termoplásticos incluem os que não sofrem erosão e os polímeros bioerosíveis semicristalinos que geram ácidos carboxílicos quando são degradados (VASIR *et al.*, 2003).

**Tabela 1** - Exemplo de polímeros mucoadesivos (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005).

Critério	Categoria	Exemplos de polímeros mucoadesivos
Origem	Seminatural / Natural	quitosana, ácido hialurônico, pectina, alginato de sódio
	Sintética	derivados da celulose, derivados do ácido poliacrílico (carbopol, policarbofil, poliacrilatos), polivinilpirrolidona, polímeros tiolados
Solubilidade em água	solúvel	ácido poliacrílico, alginato de sódio
	insolúvel	carbopol, quitosana, policarbofil
Carga	Catiônica	quitosana
	Aniônica	carbopol, carboximetilcelulose, pectina, ácido poliacrílico, alginato de sódio, carboximetilcelulose de sódio
	Neutra	álcool polivinílico, polivinilpirrolidona

Cinco teorias têm sido propostas para o mecanismo de mucoadesão: adsorção, difusão, eletrônica, fratura e hidratação (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005; SMART, 2005; SERRA *et al.*, 2008).

**Adsorção:** o polímero adere à membrana mucosa devido a ação de forças secundárias fracas como interações de Van Der Waals, hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio. Apesar destas forças individualmente apresentarem um caráter

fraco, um determinado número de interações conjuntas poderá ao todo produzir uma intensa força adesiva.

**Difusão:** é a interpenetração e o conseqüente emaranhamento entre as cadeias do polímero e as cadeias poliméricas do muco após um contato inicial entre esses dois polímeros. A flexibilidade suficiente da cadeia polimérica, a adequada exposição da superfície de contato de ambos os polímeros, as estruturas químicas similares e o coeficiente de difusão do polímero estão entre os fatores que influenciam a interdifusão da cadeia macromolecular.

**Eletrônica:** ocorre formação de uma camada elétrica dupla na interface com a subseqüente adesão devido às forças atrativas resultantes das diferenças na estrutura eletrônica das faces.

**Fratura:** relata a força requerida para promover a separação entre as duas superfícies envolvidas por forças bioadesivas.

**Hidratação ou molhabilidade:** avalia a habilidade de um líquido em se espalhar espontaneamente sobre uma superfície biológica. Esta teoria é predominantemente aplicada a sistemas líquidos bioadesivos como um pré-requisito para o desenvolvimento da adesão.

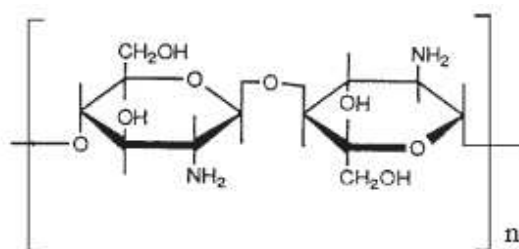
Em geral, concorda-se que o processo envolvido no fenômeno da mucoadesão possa ser descrito em etapas. Inicialmente, a umidade e o intumescimento do polímero permitiria um íntimo contato com o tecido; secundariamente, a interpenetração das cadeias do polímero e emaranhamento entre as cadeias do polímero e a mucina seria atingida; finalmente a formação de ligações químicas fracas seria possível (SERRA *et al.*, 2008). Portanto várias interações físico-químicas ocorrem para consolidar, fortalecer e conseqüentemente prolongar a mucoadesão. Os fatores contribuintes para aumento da força de adesão polímero/mucosa estão ligados à umidade, que favorece as interações de Van Der Waals e as ligações de hidrogênio, e à carga positiva dos polímeros, que interage com grupos negativamente carregados que se encontram presentes na camada mucosa. Os fatores que influenciam o mecanismo de mucoadesão estão ligados à massa molar e flexibilidade do polímero, ao intumescimento e pH do meio. A massa molar do polímero otimizado para o processo de mucoadesão está entre



$10^4$  e  $4 \times 10^6$  Da, sendo que as moléculas de massas molares maiores possuem hidratação lenta, o que dificulta a liberação dos grupos responsáveis pela interação com o substrato. A flexibilidade das cadeias do polímero proporciona aumento da interpenetração e fixação do polímero. O intumescimento de polímeros solúveis em água promove diminuição da mobilidade das correntes do polímero. Já sistemas poliméricos com alta densidade de grupos ionizáveis, como resinas de carbopol e quitosanas, a variação de pH deve ser controlada para evitar prejuízos à mucoadesão (SMART, 2005). As propriedades de alguns polímeros mucoadesivos estão descritas a seguir.

### 5.1 Quitosana

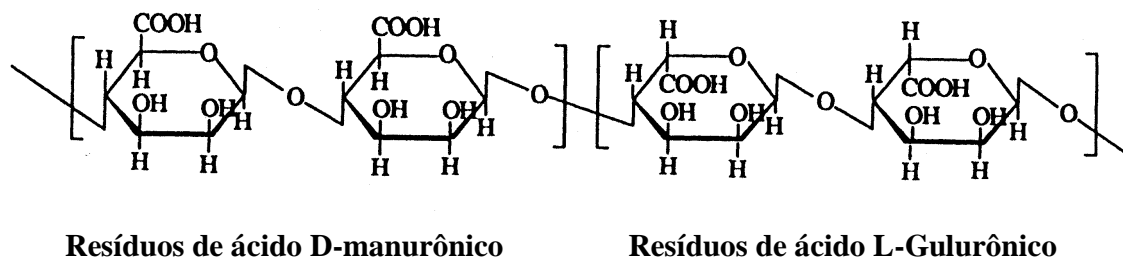
A quitosana é um polímero natural e biodegradável, biocompatível, não tóxico e bioadesivo. A molécula de quitosana é um copolímero composto por unidades de N-acetil-glicosamina e D-glicosamina, sendo esta última predominante (**Figura 6**). Ela é obtida a partir da desacetilação da quitina. A quitosana é uma base fraca com um valor de pKa do resíduo de D-glicosamina de aproximadamente 6,2 - 7,0 sendo portanto insolúvel em valores de pH neutro e alcalino. Em meio ácido os grupos amino do polímero são protonados resultando em um polissacarídeo solúvel, positivamente carregado que possui uma alta densidade de cargas positivas (HEJAZI & AMIJI, 2003). Na forma catiônica, os grupos amino iônicos dos resíduos de D-glicosamina interagem com ácido siálico na mucosa gástrica por interação eletrostática (HEJAZI & AMIJI, 2002).



**Figura 6** - Estrutura química da quitosana (SMART, 2005).

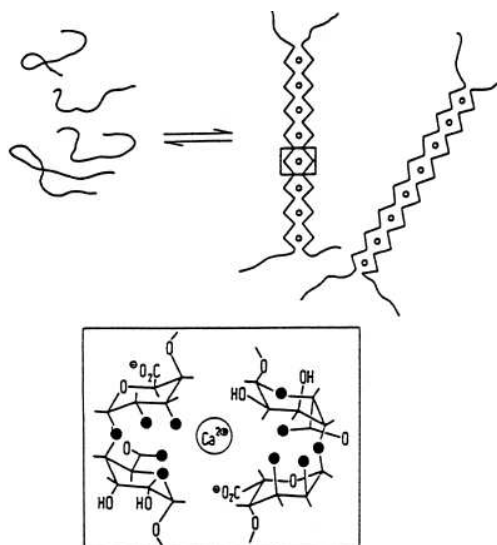
## 5.2 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polímero não tóxico, bioadesivo, biocompatível e biodegradável (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Possui capacidade de sofrer gelação em meio aquoso em temperatura ambiente (BAJPAI & TANKHIWALE, 2006). Alginatos são copolímeros lineares, não ramificados de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G). Os monômeros M e G são unidos por ligações glicosídicas formando blocos homopoliméricos M ou G e blocos heteropoliméricos MG (CHING *et al.*, 2008) (**Figura 7**).



**Figura 7** - Estrutura do alginato mostrando resíduos de ácido D-manurônico e de ácido L-gulurônico (GOMBOTZ & WEE, 1998).

A principal propriedade dos alginatos é a sua habilidade para formar gel por reações com íons divalentes. A gelação e reticulação dos polímeros de alginato de sódio são adquiridas principalmente pela mudança dos íons sódio dos ácidos gulurônicos por cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Al}^{3+}$ , e a abundância desses grupos gulurônicos para formar a estrutura característica de “casca de ovo” (**Figura 8**) (GEORGE & ABRAHAM, 2006).



**Figura 8** - Representação esquemática das seqüências de poliguluronato do alginato reticulado com íons cálcio (GOMBOTZ & WEE, 1998).

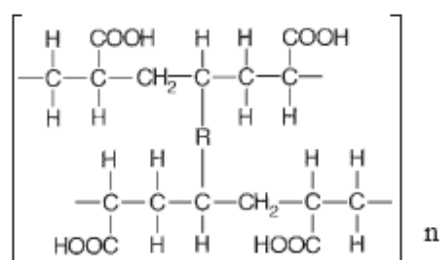
### 5.3 Colestiramina

A colestiramina é uma resina que possui propriedades mucoadesivas potenciais. Estudos prévios sugerem que ela apresenta tempo de residência gástrica prolongado e a habilidade de cobrir a mucosa gástrica uniformemente. As propriedades mucoadesivas da colestiramina ocorrem provavelmente devido às interações eletrostáticas com o muco que em valores de pH maior ou igual a 2 encontra-se carregado negativamente. Após a aderência da resina à camada mucosa, parece que somente a taxa de renovação do muco seria um fator limitante para adesão. A colestiramina não parece ser deslocada por contrações normais do estômago cheio ou por constantes lavagens do muco devido aos alimentos sólidos, às bebidas ou ao suco gástrico (JACKSON *et al.*, 2000).

### 5.4 Ácido poliacrílico

A alta solubilidade em água limita acentuadamente o uso de ácido poliacrílico como um carreador mucoadesivo de drogas porque ele pode ser dissolvido antes que a droga seja liberada através da membrana (**Figura 9**). Em pH maior que 4-5

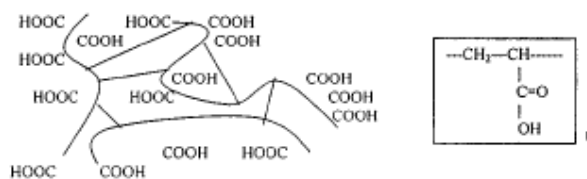
a força de interação entre ácido poliacrílico e muco torna-se menor. Esse fato indica que os grupos carboxílicos no ácido poliacrílico são efetivos como sítios de interação somente em sua forma ácida. A mucina torna-se carregada negativamente em pH maior que 2-3, portanto, em pH maior que 5, tanto o ácido poliacrílico quanto a mucina encontram-se carregadas negativamente ocasionando interações eletrostáticas repulsivas (PEPPAS & HUANG, 2004)



**Figura 9** - Estrutura química do ácido poliacrílico, R = alil sacarose ou alil pentaeritritol (carbopols); ou divinil glicol (polycarbofil) (SMART, 2005).

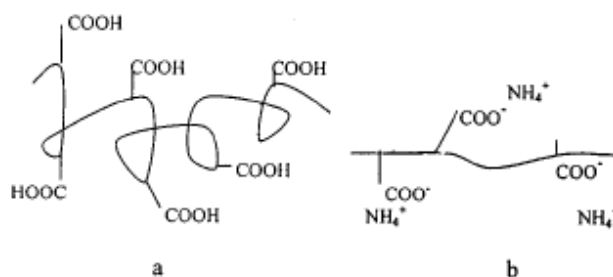
## 5.5 Carbopol

Carbopol é um polímero carboxivinílico de massa molar extremamente elevada (700.000 a 4 bilhões), disponível como pó leve e seco e que quimicamente é formado por poliácidos acrílicos reticulados com alil sacarose, alil éteres ou pentaeritritol. Eles diferem quanto à massa molar, tipos e densidade do agente reticulante e quanto ao solvente utilizado na reação de polimerização (NEAU *et al.*, 1996). As resinas de carbopol possuem temperatura de transição vítrea de 100 a 105 °C, pKa  $6,0 \pm 0,5$  e entre 56-58% de grupos carboxílicos (SINGLA *et al.*, 2000). Os polímeros de carbopol são substâncias hidrofílicas insolúveis em água que intumescem formando uma dispersão coloidal quando dispersos em água (LUBRIZOL CORPORATION, 2007). A estrutura química e molecular da forma ácida das resinas de carbopol está representada na **Figura 10**.



**Figura 10** - Estrutura química e molecular da forma ácida das resinas de carbopol (SINGLA *et al.*, 2000).

A alta percentagem de grupos carboxílicos permite a este polímero ser hidratado em água. Quando dispersas em água, as moléculas de carbopol hidratam parcialmente e se tornam um pouco viscosas. Após neutralização com uma base solúvel em água, as moléculas da resina hidratam completamente com um acentuado aumento da viscosidade. Os grupos carboxílicos do carbopol dissociam-se acentuadamente em meio alcalino. Repulsões eletrostáticas entre os grupos carboxílicos negativamente carregados causam desenrolamento e expansão da molécula, resultando em hidratação do polímero e formação de gel (**Figura 11**). Além da natureza hidrofílica do carbopol, sua estrutura reticulada e insolúvel em água, o torna um candidato potencial para uso em desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas (SINGLA *et al.*, 2000).



**Figura 11** - Hidratação da resina de carbopol: (a) uma molécula da resina parcialmente solvatada e não neutralizada (dispersão). (b) uma molécula da resina neutralizada e completamente solvatada (mucilagem) (SINGLA *et al.*, 2000).

As resinas de carbopol têm sido amplamente utilizadas em combinação com outros polímeros particularmente celulose (hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose,

hidroxipropilcelulose) os quais formam a matriz das microesferas. Como o carbopol é um poliânion, é bastante provável que ele possa formar complexos com excipientes não iônicos ou catiônicos ou com os ingredientes ativos da formulação, modificando o perfil de liberação e características bioadesivas da formulação (SINGLA *et al.*, 2000).

## 5.6 Carbopol 934P

O Carbopol 934P é um polímero sintético de elevada massa molar do ácido acrílico reticulado com éteres alílicos de sacarose. Ele contém de 56 a 68% de grupos carboxílicos que parcialmente dissociam-se em solução aquosa produzindo uma estrutura enrolada e flexível (USP, 2006b). A formação do gel de carbopol depende da repulsão eletrostática entre os grupos carboxílicos aniônicos e consiste de grupos de partículas hidratadas intimamente ligadas. A formação da camada espessa de gel inibe a penetração de água, resultando em lenta liberação da droga do gel de carbopol. Estas propriedades do carbopol são desvantajosas para sistemas de liberação oral. Carbopol designado com a letra P é o único aceito para ser utilizado por via oral ou em mucosas porque possui um baixo teor residual de benzeno (WADE & WELLER, 1994a). Por esse motivo, o Carbopol 934P tem sido investigado extensivamente pelas indústrias farmacêuticas, além de ter uma alta viscosidade em baixa concentração e baixa toxicidade (NAKANISHI *et al.*, 1998).

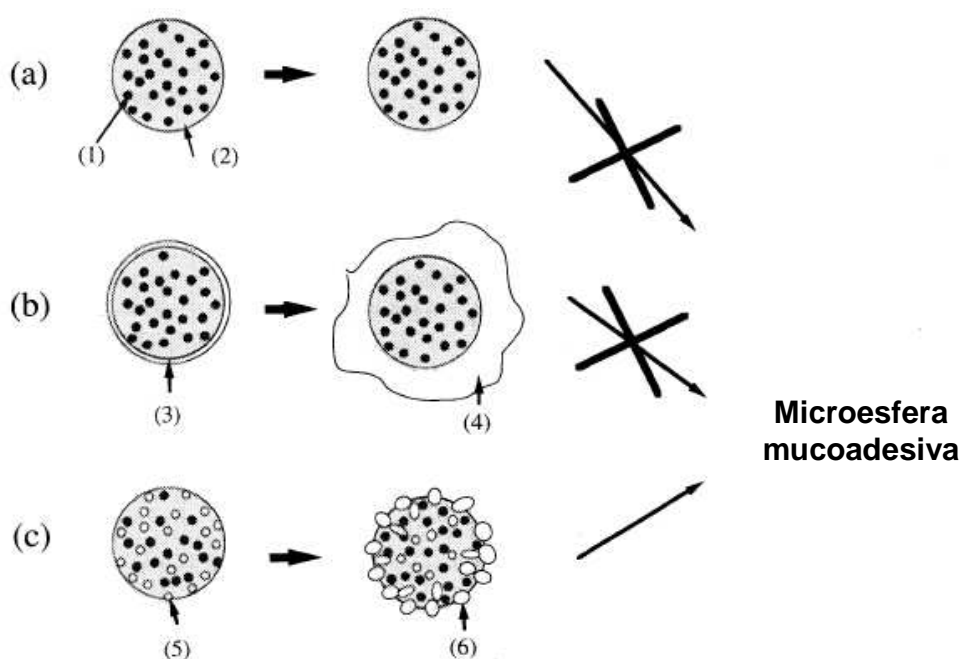
## 6 Microesferas

Microesferas são partículas poliméricas com diâmetro variando entre 1 e 1.000 µm capazes de conduzir e controlar a liberação do fármaco no local desejado. Quando essas microesferas são envolvidas com um ou mais polímeros bioadesivos capazes de ligar às mucosas, elas passam a ser denominadas de microesferas mucoadesivas. Neste caso, além de conduzir e controlar a liberação do fármaco, as microesferas mucoadesivas se ligam à camada de mucina da

mucosa aumentando o contato e o tempo de residência dessa forma farmacêutica no local de ação. Isto faz com que o número de administrações do medicamento possa diminuir (SMART, 2005).

NAGAHARA *et al.* (1998) demonstraram que 47% das microesferas compostas de carboxivinil e curdlan contendo amoxicilina permaneceram aderidas à mucosa do estômago após 2 horas e 20% após 4 horas. LIU *et al.* (2005), utilizando microesferas mucoadesivas compostas de etilcelulose e carbopol 934 P, demonstraram que a amoxicilina encapsulada nas microesferas ficou protegida da degradação em meio ácido, enquanto que a amoxicilina livre foi rapidamente degradada. E ainda, o teste de liberação *in vitro* revelou que aproximadamente 90% da droga foi liberada em pH 1 após 4 horas de incubação, enquanto no teste de liberação *in vivo* durante o mesmo tempo, 63,6% das microesferas ainda permaneceram no estômago. HEJAZI & AMIJI (2003) desenvolveram estudos utilizando quitosanas como polímero e tetraciclina como fármaco. Os resultados em animais demonstraram que não ocorreu um tempo prolongado de residência gastrintestinal sendo que o perfil de concentração de tetraciclina no estômago após administração das microesferas foi similar ao da solução aquosa de tetraciclina. Em um outro estudo, eles demonstraram que as propriedades de mucoadesão melhoraram e que as microesferas ficaram mais resistentes ao suco gástrico, sendo que 10% delas permaneceram no estômago dos animais em jejum por 10 horas depois da administração (HEJAZI & AMIJI, 2004). Outros grupos de pesquisadores têm produzido microesferas ligadas covalentemente a lecitinas com objetivo de obter uma mucoadesão específica a carboidratos. MONTICI *et al.* (2001) produziram micropartículas e nanopartículas conjugadas com lecitina. Os resultados apresentaram boa adesão *in vitro*, porém, outros pesquisadores sugerem que *in vivo* as lecitinas se ligam ao muco, mas, que elas são constantemente eliminadas devido ao fluxo peristáltico (BARDONNET *et al.*, 2006). AKIYAMA *et al.* (1995) produziram três tipos de microesferas em estudos de mucoadesão: microesferas de ácidos graxos de ésteres de poliglicerol (PGEF-ME), PGEF-ME contendo carbopol disperso (CPD-ME) e PGEF-ME contendo carbopol envolvendo a superfície externa (CPC-ME). Apenas CPD-ME apresentou

capacidade mucoadesiva. A partir do momento que as CPC-ME entraram em contato com a água, as partículas de carbopol formaram uma camada de gel ao redor das microesferas e rapidamente a camada gelatinosa se separou do núcleo das microesferas devido à perda de afinidade do gel hidrofílico pelo núcleo. Por outro lado as partículas de carbopol dispersas hidrataram de dentro das microesferas para a superfície quando CPD-ME entraram em contato com a água. A hidratação das partículas de carbopol foi fortemente associada com as microesferas. CPC-ME aderiram à mucosa levando parte das partículas de carbopol hidratadas (**Figura 12**).



**Figura 12** - Descrição esquemática do processo de mucoadesão com microesferas. (a), PGEF-ME; (b), CPC-ME; (c), CPD-ME; (1), droga; (2), PGEF; (3), camada externa de carbopol; (4), camada de carbopol hidratada; (5), carbopol disperso; carbopol hidratado (AKIYAMA *et al.*, 1995)



Geralmente, os estudos publicados utilizaram como agente antimicrobiano amoxicilina ou tetraciclina e como polímero mucoadesivo polivinilpirrolidona, ácido poliacrílico, quitosana ou outro polímero (NAGAHARA *et al.*, 1998; CUÑA *et al.*, 2001; HEJAZI & AMIFI, 2004; LIU *et al.*, 2005, CHUN *et al.*, 2005, MAJITHIYA & MURTHY, 2005). Ao nosso conhecimento, nenhum dos estudos utilizou como agente antimicrobiano a claritromicina e como polímeros associados o carbopol e etilcelulose. Assim, este trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema composto de microesferas mucoadesivas de carbopol contendo claritromicina visando um futuro emprego na erradicação do *Helicobacter pylori*.

## OBJETIVOS

### 1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema composto de microesferas mucoadesivas contendo claritromicina e avaliar *in vitro* sua estabilidade, perfil de liberação e capacidade de mucoadesão.

### 2 Objetivos específicos

- Avaliar o método de doseamento da claritromicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver formulações de microesferas mucoadesivas contendo claritromicina;
- Avaliar o teor de encapsulação da claritromicina nas microesferas;
- Caracterizar as microesferas com relação a sua morfologia e diâmetro;
- Avaliar *in vitro* a estabilidade e a velocidade de liberação da claritromicina presente nas microesferas;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de mucoadesão do sistema desenvolvido.

## EXPERIMENTAL

### 1 Reagentes e outros materiais

A claritromicina foi gentilmente cedida pelo Laboratório Medley (Brasil). O fosfato monobásico de potássio, acetona, álcool etílico absoluto e o éter de petróleo foram adquiridos da Labsynth (Brasil). Os demais reagentes utilizados foram: metanol (Tedia, Estados Unidos), 6,11-O-metileritromicina (Ind-Swifr Laboratories Limited, Índia); acetato de sódio anidro e ácido acético (Vetec Química Fina Ltda, Brasil), ácido clorídrico (F. Maia Indústria e Comércio Ltda, Brasil), monooleato de sorbitol (MB Biomedicals, Estados Unidos), óleo mineral light (Favap, Brasil), Ethocel 20cp (Colorcon, Estados Unidos), cloreto de sódio (Merck, Alemanha) e Carbopol 934P NF (Noveon/Lubrizol Corporation, Estados Unidos). Os solventes foram de grau analítico e as demais substâncias químicas de grau reagente. Todos eles foram utilizados sem purificação adicional. Os filtros com 0,45 µm de porosidade Minisart e Millex, o pré-filtro modelo SLHVBZ5NZ e o dispositivo de ultrafiltração Microcon y M-3 de 3.000 Daltons foram adquiridos da Millipore (Brasil).

Os seguintes equipamentos foram utilizados:

- cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba modelo 515, injetor automático modelo 717 plus; detector espectrofotométrico UV modelo 2487, conectado ao computador apresentando o programa Millenium versão 2.15.01 (Waters, Estados Unidos);
- centrífuga Baby I; modelo 206-BL (Fanem, Brasil);
- rotavapor AG CH-9233, modelo R-210 (Buchi Labortechnik, Suíça);
- espectrofotômetro, modelo UV-160A (Shimadzu, Japão);
- microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-840A (Jeol, Estados Unidos);
- liofilizador E-C (Modulyo, Inglaterra);
- centrífuga (Jowan, França);
- agitador Eurostar (Ika Labortechnik, Alemanha);
- microscópio ótico Olympus CBA (Micronal, Brasil)

## 2 Métodos

### 2.1 Doseamento da claritromicina

Na tentativa de validar o método de doseamento da claritromicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizamos a metodologia descrita na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003) e na USP (2006a). Usando uma coluna de fase reversa capeada C18 (Hyperclone, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm, Phenomenex, USA) ocorreram picos assimétricos que persistiram mesmo após várias tentativas de otimização da fase móvel. Em seguida, com o objetivo de melhorar a simetria do pico utilizamos uma outra coluna cromatográfica também de fase reversa e capeada C18 (Ace, 3  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm, ACT, Escócia). Essa coluna apresentou algumas desvantagens como um longo tempo para estabilizar a linha de base e uma elevação da pressão após algumas injeções, apesar de ter sido feita uma limpeza adequada. A pressão da coluna aumentou de aproximadamente 2.600 psi para 3.400 psi, inviabilizando seu uso. Tentativas foram realizadas com o objetivo de recuperar a coluna, mas, sem sucesso.

Finalmente, o doseamento da claritromicina foi feito baseado nas condições cromatográficas acima descritas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; USP, 2006a), mas, com algumas alterações, tais como, a escolha de uma nova coluna e modificação do pH da fase móvel. A fase móvel foi preparada misturando 65 partes de metanol e 35 partes de solução de fosfato de potássio monobásico 0,067 mol/L com pH ajustado para 4 com ácido fosfórico 85% (V/V), e adicionalmente, ela foi filtrada em membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e degaseificada em banho de ultra-som durante 15 minutos antes do uso. As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas.

- coluna: Luna, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 240 x 4,6 mm, Phenomenex, Estados Unidos;
- fase móvel: metanol/tampão fosfato 0,067 mol/L pH 4 (65/35 partes);
- fluxo: 1 mL/min;
- volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ;
- detecção: UV em 210 nm;
- temperatura: 50  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.1 Tempo de retenção e simetria do pico

Preparou-se uma solução estoque de 1 mg/mL de claritromicina pesando analiticamente 50 mg de padrão secundário de claritromicina e transferindo quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 50 mL. Acrescentou-se 30 mL de metanol e levou-se ao ultra-som por 30 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol. Foram transferidas alíquotas de 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mL da solução estoque para balões volumétricos de 25 mL. Completou-se o volume dos balões com fase móvel, obtendo-se, assim, soluções padrões com as seguintes concentrações: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL. Após a estabilização da coluna, nas condições do ensaio, todas as soluções padrões diluídas foram filtradas em membranas de celulose de 0,45 µm e 20 µL foram injetados no cromatógrafo em triplicata.

### 2.1.2 Linearidade

O estudo da linearidade foi avaliado através da plotagem de cada concentração de claritromicina no eixo das abscissas e das relações entre a média das áreas de cada uma delas. Aplicando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) ou coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Foram obtidas três curvas em 3 dias diferentes para serem reunidas em uma única curva padrão. Preparou-se uma solução estoque de 1 mg/mL de claritromicina pesando analiticamente 50 mg de padrão secundário de claritromicina e transferindo quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 50 mL. Acrescentou-se 30 mL de metanol e levou-se ao ultra-som por 30 minutos. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol. Foram transferidas alíquotas de 500 e 750 µL e 1; 1,25 e 1,5 mL da solução estoque de claritromicina 1 mg/mL para balões volumétricos de 25 mL. Completou-se o volume dos balões com fase móvel, obtendo-se, assim, soluções padrões com as seguintes concentrações: 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL e 60 µg/mL. Nos experimentos realizados no primeiro e segundo dia,

Também foram obtidas soluções padrões com as concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL. Para preparar essas soluções foram transferidas alíquotas de 125 e 250 µL e 2; 2,5; 5 e 7,5 mL da solução estoque para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume do balão com fase móvel. Todas as soluções padrões diluídas foram filtradas antes das análises em membranas de celulose de 0,45 µm e 20 µL foram injetados no cromatógrafo em triplicata. No experimento do terceiro dia cada diluição foi realizada em triplicata para avaliar precisão intra-dia e cada solução foi injetada uma única vez.

Para verificar se as três curvas poderiam ser reunidas em uma única curva padrão, realizou-se o teste de b (inclinação da reta) formulando-se a hipótese nula de que as inclinações das retas obtidas não diferiam estatisticamente.

### **2.1.3 Precisão**

A precisão de um método analítico está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o mesmo procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste (USP, 2006). A precisão é expressa matematicamente como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação). A precisão do método foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-dia) e a precisão intermediária (precisão inter-dia).

#### **2.1.3.1 Repetibilidade**

A repetibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em um mesmo laboratório, por um curto período de tempo, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento (BRASIL, 2003). Por considerar a mesma condição é também chamada de precisão intra-corrída. O teste foi executado avaliando o desvio

padrão e desvio padrão relativo das áreas dos picos correspondentes às soluções de claritromicina nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL.

#### **2.1.3.2 Precisão intermediária**

A precisão intermediária expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003). O teste foi realizado avaliando-se o desvio padrão e o desvio padrão relativo das áreas obtidas a partir das injeções das soluções padrões de claritromicina utilizadas para a construção de três curvas, em dias diferentes de calibração.

#### **2.1.4 Seletividade**

O teste de seletividade ou especificidade de um determinado procedimento é a sua capacidade de diferenciar e de quantificar a substância de interesse na presença de outros componentes da amostra (GUIDANCE, 2001). A seletividade foi realizada pelo método CLAE comparando cromatogramas obtidos das amostras de etilcelulose, carbopol e microesferas brancas (sem claritromicina) com uma solução padrão de claritromicina a 200 µg/mL em fase móvel. Antes de injetar 20 µL de cada amostra no cromatógrafo, cada uma delas foi filtrada em membrana de celulose de 0,45 µm. O seguinte procedimento foi feito para cada uma das amostras.

**Etilcelulose:** pesou-se 0,0258 grama de etilcelulose, que foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 8 mL de metanol, levou-se ao ultra-som por 30 minutos e em seguida o volume do balão foi completado com metanol. A solução foi filtrada a vácuo utilizando membrana de celulose de 0,45 µm. Em seguida uma alíquota de 2,5 mL dessa solução foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com fase móvel.

**Carbopol:** pesou-se 0,0042 grama de carbopol, que foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 8 mL de metanol, levou-se ao ultra-som por 30 minutos e posteriormente completou-se o volume do balão com metanol. A solução foi filtrada a vácuo utilizando membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida uma alíquota de 1,4 mL foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com fase móvel.

**Microesferas brancas:** pesou-se analiticamente 0,04 grama de microesferas sem claritromicina (microesferas brancas) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 8 mL de metanol, levou-se ao ultra-som por trinta minutos para dissolver as microesferas brancas e completou-se o volume do balão para 10 mL. Em seguida, a dispersão foi filtrada utilizando membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . Foi retirada do filtrado, uma alíquota de 2,5 mL sendo transferidos posteriormente para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com fase móvel.

**Solução estoque de claritromicina a 1 mg/mL:** pesou-se analiticamente 25 mg de padrão secundário de claritromicina e este foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 15 mL de metanol no balão que foi posteriormente levado ao ultra-som por 10 minutos. Em seguida o volume do balão foi completado com metanol. Essa solução foi filtrada em membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo. Uma alíquota de 2,0 mL da solução estoque de claritromicina foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume do balão foi completado com fase móvel. Foi obtida uma solução de claritromicina padrão na concentração teórica de 200  $\mu\text{g/mL}$ .



### 2.1.5 Tempo de retenção relativo da claritromicina e da 6,11-O-metileritromicina

Durante a síntese de drogas farmacêuticas muitas impurezas podem ser produzidas. Algumas fontes dessas impurezas são solventes, reagentes, subprodutos de reações, intermediários de reações e produtos de degradação. As três últimas fontes geralmente produzem compostos que são estruturalmente relacionados à droga farmacêutica e são comumente referidos como substâncias relacionadas. A substância relacionada 6,11-O-metileritromicina, provavelmente a principal impureza derivada da síntese de claritromicina, possui propriedades de absorção em comprimento de onda semelhante a claritromicina e pode ser sintetizada com alto grau de pureza (MORGAN *et al.*, 1990).

Foram injetadas no cromatógrafo soluções de claritromicina 200 µg/mL, solução de 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL e solução de claritromicina 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL, com o objetivo de avaliar a resolução e comparar com o resultado descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003). A Farmacopéia Brasileira informa que a resolução entre os picos de claritromicina e 6,11-O-metileritromicina não deve ser menor que 2 e os tempos de retenção relativos são de aproximadamente 0,75 para a claritromicina e 1 para 6,11-O-metileritromicina. Isso quer dizer que o tempo de retenção da claritromicina corresponde a 75% do tempo de retenção da 6,11-O-metileritromicina.

**Solução estoque de claritromicina utilizada nos experimentos:** após pesar analiticamente 50 mg de padrão secundário de claritromicina, este foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 50 mL e em seguida foi adicionado 30 mL de metanol. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos e posteriormente o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução de concentração igual a 1 mg/mL.

**Solução de trabalho de claritromicina:** alíquotas de 5 mL da solução estoque 1 mg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com fase móvel. A concentração da solução obtida foi 200 µg/mL.

**Solução padrão de 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL:** pesou-se exatamente o equivalente a 5 mg de 6,11-O-metileritromicina que foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 5 mL. O volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução com concentração igual a 1 mg/mL.

**Solução de trabalho de 6,11-O-metileritromicina :** alíquotas de 2 mL da solução estoque acima foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel. A concentração da solução obtida foi 200 µg/mL.

**Solução padrão de claritromicina 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL:** foram retirados 2 mL da solução de 6,11-O-metileritromicina de concentração igual a 1 mg/mL e transferidos para um outro balão de 10 mL. Logo em seguida foi adicionado 2 mL de solução de claritromicina de concentração igual a 1 mg/mL. O volume do balão foi completado com fase móvel. A concentração de claritromicina e dimetileritromicina da solução final obtida foi 200 µg/mL para ambas.

### **2.1.6 Comparação entre padrão primário e secundário de claritromicina.**

Com o objetivo de avaliar a qualidade da claritromicina (Laboratório Medley, Brasil) utilizada nos nossos experimentos, foram preparadas soluções de claritromicina a 200 µg/mL utilizando como padrão primário a claritromicina cedida pelo Laboratório de Controle de Qualidade (CEDAFAR-UFMG, Brasil) e como padrão secundário a claritromicina utilizada nos experimentos. A solução estoque e a solução de trabalho do padrão primário de claritromicina foram preparadas de modo idêntico às soluções de padrão secundário.

**Solução estoque do padrão secundário de claritromicina 1 mg/mL:** após pesar analiticamente 50 mg de padrão secundário de claritromicina, este foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 50 mL e em seguida foi adicionado 30 mL de metanol. Levou-se ao ultra-som por 30 minutos e posteriormente o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução de concentração igual a 1 mg/mL.

**Solução de trabalho do padrão secundário de claritromicina 1 mg/mL:** uma alíquota de 5 mL da solução estoque 1 mg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com fase móvel. A concentração da solução obtida foi 200 µg/mL.

## **2.2 Microesferas de claritromicina**

### **2.2.1 Preparação das microesferas**

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente (LIU *et al.*, 2005). Este método pode ser esquematicamente dividido em 4 etapas.

#### **1ª Etapa - Preparo da dispersão de carbopol em solução de etilcelulose e de claritromicina**

Após pesar analiticamente 0,2106 g de padrão secundário de claritromicina, ele foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico âmbar de 10 mL. Em seguida completou-se o volume do balão com acetona. Pesou-se 0,55 g de etilcelulose que foi transferida lentamente para um frasco contendo 21 mL de álcool etílico absoluto e 1 mL de acetona, sob agitação magnética constante. Após dissolver a etilcelulose, adicionou-se a solução de claritromicina (0,2106 g) em acetona preparada previamente. O aspecto foi de uma solução límpida. Em

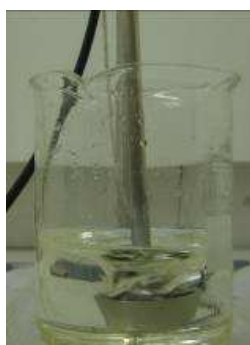
seguida, após pesar 0,0914 g de carbopol ele foi disperso em uma solução de etilcelulose contendo claritromicina. O aspecto foi de uma dispersão turva e de cor branca (**Figura 13**). O sistema permaneceu sob agitação magnética por 24 horas.



**Figura 13** - Dispersão de etilcelulose, carbopol e claritromicina.

### **2ª Etapa - Emulsificação**

Cinco vírgula vinte e cinco gramas de span 80 foi adicionado lentamente a 168 mL de parafina light 70. A mistura foi homogeneizada por 5 minutos com auxílio de uma espátula e apresentou um aspecto transparente e amarelado (**Figura 14**).



**Figura 14** - Aspecto da mistura de parafina light e Span.

A dispersão de carbopol em solução de etilcelulose e claritromicina foi vertida lentamente à mistura de parafina light e span sob agitação de 600 rpm utilizando um agitador eurostar. A mistura permaneceu sob agitação a 600 rpm por 60 minutos. O aspecto foi de uma dispersão turva amarelada (**Figuras 15, 16 e 17**).



**Figura 15** - Início da adição da dispersão à mistura de parafina light e span.



**Figura 16** - A mistura foi ficando mais turva à medida que se adicionava a dispersão.



**Figura 17** - Aspecto da dispersão após o término da emulsificação.

### 3ª Etapa - Evaporação do solvente

A dispersão contendo as microesferas foi levada ao rotavapor para eliminar a acetona e o etanol. O rotavapor foi programado para evaporar a acetona (**Figura 18**) e em seguida programado para evaporar o etanol (**Figura 19**). As condições em que se processou a evaporação da acetona foi uma pressão de vapor igual a 123 mbar, temperatura ambiente e duração de 30 minutos. As condições em que se processou a evaporação do etanol foi uma pressão de vapor igual a 23 mbar, temperatura ambiente e duração de 1 hora e 30 minutos. Após a evaporação, a mistura permaneceu no balão até o dia seguinte, quando foi lavada com éter de petróleo visando eliminar o óleo e o span.



**Figura 18** - Aspecto da dispersão após a evaporação da acetona.



**Figura 19** - Aspecto da dispersão após a evaporação do etanol.

### 4ª Etapa - Lavagem das microesferas para eliminar o óleo e o span

Para realizar o processo de lavagem das microesferas, adicionou-se 40 mL de éter de petróleo à mistura acima contida no balão. Em seguida, ela foi distribuída em volumes de 10 mL em tubos falcon e centrifugada a 16.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 10 mL de éter de petróleo. Após misturar este sedimento com o éter, a mistura resultante foi centrifugada a 16.000 rpm por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes com o objetivo de eliminar o span e a parafina light. Finalmente, o sedimento foi levado ao rotavapor para eliminar o éter de petróleo. As condições em que se processou a evaporação do éter de petróleo foi uma pressão de vapor igual a 306 mbar, temperatura ambiente e duração de 4 horas. O aspecto final foi de um sólido úmido, discretamente amarelado e não esferoidal (**Figura 20**). As microesferas sem claritromicina foram preparadas de modo semelhante ao preparo de microesferas contendo claritromicina.



**Figura 20** - Fotografia das microesferas após lavagem com éter de petróleo

## 2.2.2 Caracterização morfológica

### 2.2.2.1 Microscopia óptica de luz

Para confirmar a formação de microesferas utilizando o método acima descrito, 0,04 g de microesferas foi dispersa em 3 mL de água. Uma gota da dispersão foi então colocada em uma lâmina para microscopia e coberta por uma lamínula. Em seguida adicionou-se uma gota de óleo de imersão e examinou-se ao microscópio óptico de luz (aumento da imagem em 1.000 vezes).

### **2.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A avaliação da morfologia e tamanho das microesferas contendo claritromicina foi realizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando o equipamento Jeol modelo JSM – 840A (Estados Unidos). Uma pequena quantidade de microesferas foi fixada em uma placa, metalizada com ouro por aproximadamente 5 minutos, e, em seguida, analisada por microscopia eletrônica de varredura.

### **2.2.3 Taxa de encapsulação da claritromicina nas microesferas**

#### **2.2.3.1 Teor total de claritromicina nas microesferas**

O teor total (encapsulada e adsorvida) de claritromicina presente nas microesferas foi determinado. A claritromicina e a etilcelulose são solúveis em metanol e o carbopol é insolúvel. A etilcelulose é a responsável pela formação da matriz das microesferas e o carbopol confere a elas suas propriedades mucoadesivas. Portanto, é possível destruir as microesferas com o uso de metanol.

Foram preparados 3 lotes de microesferas contendo claritromicina cujos pesos foram de 1,0478 g; 1,1402 g e 1,0943 g para o primeiro, segundo e terceiro lote, respectivamente. Pesou-se analiticamente 0,04 g de microesferas de cada lote produzido contendo valores teóricos de 8,01 mg; 7,36 mg e 7,67 mg de claritromicina, as quais foram transferidas para três balões volumétricos de 10 mL. Em cada balão, adicionou-se 8 mL de metanol e levou-se ao ultra-som por trinta minutos para dissolver as microesferas. Após resfriar, completou-se o volume dos balões para 10 mL com metanol obtendo-se dispersões de concentrações teóricas de 0,80; 0,73 e 0,76 mg de claritromicina/mL. Em seguida, cada dispersão foi filtrada utilizando membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ . Uma alíquota de 1,4 mL do filtrado de cada dispersão foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel. Obteve-se então três dispersões com concentrações teóricas de 112; 103 e 107  $\mu\text{g}$  de claritromicina/mL para o primeiro, segundo e



terceiro lote, respectivamente. Estas dispersões foram filtradas em membranas de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo.

### **2.2.3.2 Claritromicina adsorvida na superfície das microesferas**

Para determinar o teor de claritromicina possivelmente adsorvida na superfície das microesferas, foram utilizados os dois primeiros lotes de microesferas preparados conforme acima descritos, ou seja, os lotes que possuíam 1,0478; 1,1402 g de microesferas.

Sabendo-se que a claritromicina é solúvel em solução de fosfato de potássio monobásico 0,067 mol/L pH 4, em 8 mL dessa solução adicionou-se sob agitação magnética 0,04 g de microesferas, os quais continham teoricamente massas de 8,01 e 7,36 mg de claritromicina para o primeiro e o segundo lote, respectivamente. As dispersões permaneceram sob agitação por 15 minutos e em seguida foram transferidas quantitativamente para dois balões volumétricos de 10 mL. O volume de cada balão foi completado obtendo-se duas dispersões de concentrações teóricas de 0,80 e 0,73 mg de claritromicina/mL. Em seguida, as dispersões foram filtradas através de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  com o objetivo de recolher a claritromicina não encapsulada no material que foi permeado, ou seja, a claritromicina adsorvida na superfície externa das microesferas. Foi retirada uma alíquota de 2,5 mL de cada um dos lotes, as quais foram transferidas para dois balões volumétricos isoladamente e o volume de cada um deles foi completado para 10 mL com fase móvel. Após isso, obteve-se teoricamente concentrações de claritromicina de 200 e 184  $\mu\text{g/mL}$  para o primeiro e segundo lote, respectivamente. As soluções foram filtradas em membranas de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo.

### **2.2.3.3 Teor de claritromicina no líquido da primeira lavagem**

Este processo de extração foi realizado com o objetivo de determinar a ocorrência de perda de massa de claritromicina durante o processo de lavagem das microesferas com éter de petróleo.

O sobrenadante obtido da primeira centrifugação durante o processo de lavagem das microesferas com éter de petróleo foi reservado e o volume foi de 200 mL. Um volume de 100 mL desse líquido foi transferido para um funil de separação. Adicionou-se ao funil de separação 100 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,067 M pH 4 com o objetivo de extrair a claritromicina da mistura oleosa. Após agitação ocorreu a formação de duas fases: uma fase formada por uma emulsão e uma outra pela fase oleosa. No dia seguinte adicionou-se NaCl a mistura com o objetivo de desestabilizar a emulsão considerando que o NaCl compete com o éter de petróleo pela solvatação da água. O sistema passou a ser constituído por três fases: fase aquosa, fase constituída provavelmente por éter de petróleo e óleo e fase oleosa. A fase aquosa foi retirada do funil de separação e armazenada na geladeira. Para o doseamento por CLAE foi retirada uma alíquota de 4 mL da fase aquosa que foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume do balão foi completado com fase móvel. Essa solução foi então filtrada em membrana de celulose de 0,45 µm e 20 µL foram injetados no cromatógrafo.

## **2.2.4 Liberação in vitro da claritromicina presente nas microesferas**

### **2.2.4.1 Doseamento da claritromicina por espectrofotometria no ultravioleta (UV)**

A determinação analítica de claritromicina por CLAE foi utilizada para investigar o teor de claritromicina presente nas microesferas. Entretanto, para determinar a taxa de liberação da claritromicina das microesferas foi necessário desenvolver um método espectrofotométrico no ultravioleta com o objetivo de obter uma curva

linear em concentrações mais baixas que a obtida por CLAE. Na literatura verifica-se um número limitado de informações sobre doseamento de claritromicina utilizando um método espectrofotométrico. O método utilizado nesse estudo foi baseado em algumas informações fornecidas por MAJITHIYA & MURTHY (2005).

Para obtenção da curva padrão pesou-se exatamente o equivalente a 50 mg de padrão secundário de claritromicina que foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com metanol. Obteve-se então uma solução de claritromicina contendo 1.000 µg/mL. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 10 mL que foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume do balão foi completado também com metanol, obtendo-se uma solução estoque de claritromicina contendo 200 µg/mL. Fazendo cada diluição em triplicata, foram transferidas alíquotas de 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL da solução de claritromicina a 200 µg/mL para frascos âmbar e em seguida foram acrescentados a cada frasco respectivamente 500, 475, 450, 400, 300, 200, 100 e zero µL de metanol. Finalmente, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico concentrado em cada frasco, obtendo-se por frasco um volume final igual a 2 mL. Após estas diluições foram obtidas soluções padrões de claritromicina com as seguintes concentrações teóricas: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 µg/mL. A absorbância destas soluções foi medida também em triplicata utilizando-se cubeta de quartzo em comprimento de onda de 485 nm (Shimadzu UV-160 A, Japão). Como branco usou-se uma solução de metanol e ácido clorídrico. A média das absorvâncias foi plotada no gráfico em função das seguintes concentrações: 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL.

O fator de resposta (FR) foi determinado dividindo-se o valor encontrado nas absorvâncias pela concentração da solução preparada. O coeficiente de variação (CV%), que expressa a precisão do método, também foi determinado.

#### **2.2.4.2 Preparação do líquido gástrico simulado**

O líquido gástrico simulado utilizado nesse experimento foi produzido baseado no método descrito por JANTATRID *et al.* (2008) que propõem a utilização de leite

na composição do líquido gástrico simulado com o objetivo de reproduzir um padrão alimentar. De acordo com esses autores a presença de leite permite observar uma possível interação de medicamentos administrados por via oral com os alimentos, no nosso caso microesferas de claritromicina. Os testes foram feitos na presença e na ausência de claritromicina.

**Solução de ácido acético 100 µg/mL:** 1 mL de ácido acético glacial foi transferido para um balão de 10 mL que teve seu volume completado com água destilada.

**Solução tampão de ácido acético/acetato:** 1,386 g de NaCl e 0,244 g de acetato de sódio anidro foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida adicionou-se 1 mL de solução de ácido acético 100 µg/mL e completou-se o volume do balão com água destilada para 100 mL.

**Líquido simulado gástrico:** 40 mL da solução tampão de ácido acético/acetato acima preparada foi adicionada a 50 mL de leite pasteurizado integral contendo 3,5% de gordura. A mistura foi mantida sob agitação magnética constante e o valor do pH encontrado foi 6,19. Para ajustar o valor do pH para 5 adicionou-se 23 mL de solução de HCl 0,1 N. O volume final do líquido gástrico foi igual a 113 mL e o sistema permaneceu sob agitação magnética constante por cinco minutos.

#### **2.2.4.3 Seletividade do método espectrofotométrico**

Para avaliar se os constituintes do líquido gástrico simulado interferem no doseamento da claritromicina utilizando o método espectrofotométrico, inicialmente filtrou-se uma alíquota de líquido gástrico simulado sem claritromicina utilizando um filtro Millex com poros de 0,45 µm com o objetivo de retirar as gotículas de gordura do leite. Em seguida, filtrou-se novamente o líquido obtido da primeira filtração a uma rotação de 14.000 g até obter um volume de 300 µL utilizando um filtro Microcon constituído por membrana regenerada de 3.0000

Daltons com o objetivo de reter as proteínas solúveis do leite. O filtrado obtido foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado por 24 horas. Após adicionar ao liofilizado 100  $\mu\text{L}$  de HCL, a dispersão formada foi centrifugada a 5.000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido da centrifugação e adicionou-se a ele 25  $\mu\text{L}$  de metanol. Por fim, foram feitas leituras no espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo (Hellma, Alemanha).

#### **2.2.4.4 Interferência do líquido gástrico simulado no doseamento da claritromicina por CLAE**

Um dos objetivos desse experimento foi avaliar a interferência do líquido gástrico simulado contendo leite no doseamento da claritromicina por CLAE. Outro objetivo importante foi avaliar a eficiência dos dois filtros Millex e Microcon em minimizar estas interferências. Pesou-se 10 mg de padrão secundário de claritromicina que foi transferido para um recipiente contendo 113 mL de líquido gástrico simulado. O sistema permaneceu sob agitação magnética por 15 minutos. Posteriormente, filtrou-se uma alíquota em filtro Millex com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ , e, em seguida, filtrou-se novamente o líquido obtido da primeira filtração a uma rotação de 14.000 g por 40 minutos utilizando um filtro Microcon com poros de 3.000 Daltons. O filtrado foi injetado no cromatógrafo.

#### **2.2.4.5 Estabilidade da claritromicina na presença do líquido gástrico simulado**

Um miligrama de padrão secundário de claritromicina que foi transferido para um recipiente contendo 100 mL de líquido gástrico simulado contendo leite. O sistema permaneceu sob agitação magnética por 1 hora. Em seguida, filtrou-se uma alíquota deste líquido gástrico contendo a claritromicina utilizando um filtro Millex com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e o líquido obtido dessa primeira filtração foi ainda submetido a uma rotação de 14.000 g até obter um volume de 500  $\mu\text{L}$  utilizando um filtro Microcon com poros de 3.000 Daltons. O filtrado obtido foi congelado com

nitrogênio líquido e liofilizado por 24 horas. Após adicionar ao liofilizado 100  $\mu\text{L}$  de HCL, a dispersão formada foi centrifugada a 5.000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido da centrifugação e adicionou-se a ele 25  $\mu\text{L}$  de metanol. Por fim, foram feitas leituras no espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo (Hellma, Alemanha).

#### **2.2.4.6 Liberação in vitro da claritromicina das microesferas**

Pesou-se 1,19 mg de microesferas contendo teoricamente 0,1 mg de claritromicina que foi transferido para um recipiente contendo 10 mL de líquido gástrico simulado contendo leite. O sistema permaneceu sob agitação magnética por 2 ou 4 horas. Em seguida transferiu-se todo o conteúdo do recipiente para um tubo falcon e este foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado do sedimento com auxílio de uma pipeta automática. Filtrou-se uma alíquota do sobrenadante utilizando um filtro Millex com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e filtrou-se novamente o líquido obtido da primeira filtração a uma rotação de 14.000 g até obter um volume de 1.400  $\mu\text{L}$  e 950  $\mu\text{L}$  para o teste de liberação de 2 e 4 horas respectivamente, utilizando um filtro Microcon com poros de 3.000 Daltons. O filtrado obtido foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado por 24 horas. Após adicionar ao liofilizado 125  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  de HCL para o teste de liberação de 2 e 4 horas respectivamente, a dispersão formada foi centrifugada a 5.000 rpm durante 1 minuto. Retirou-se 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido da centrifugação e adicionou-se a ele 25  $\mu\text{L}$  de metanol. Por fim, foram feitas leituras no espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo (Hellma, Alemanha).

O sedimento que permaneceu no tubo falcon contendo as microesferas foi lavado com água e centrifugado a 20.000 rpm por 15 minutos. Essa etapa foi realizada por 3 vezes. Em seguida foi congelado com nitrogênio líquido e levado ao liofilizador por 24 horas. Ao sólido obtido adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de metanol e este foi levado ao ultra-som por 20 minutos para dissolver as microesferas. Em seguida completou-se novamente o volume da dispersão para 200  $\mu\text{L}$  e esta foi filtrada em membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para análise da claritromicina que

permaneceu nas microesferas após 2 horas retirou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  para o do filtrado e adicionou-se a ela 15  $\mu\text{L}$  de metanol e 75  $\mu\text{L}$  de HCl para realizar a leitura no espectrofotômetro. Para análise da claritromicina que permaneceu nas microesferas 4 horas retirou-se uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  do filtrado e adicionou-se a ela 75  $\mu\text{L}$  de HCl para realizar a leitura no espectrofotômetro

### **2.2.5 Mucoadesão *in vitro***

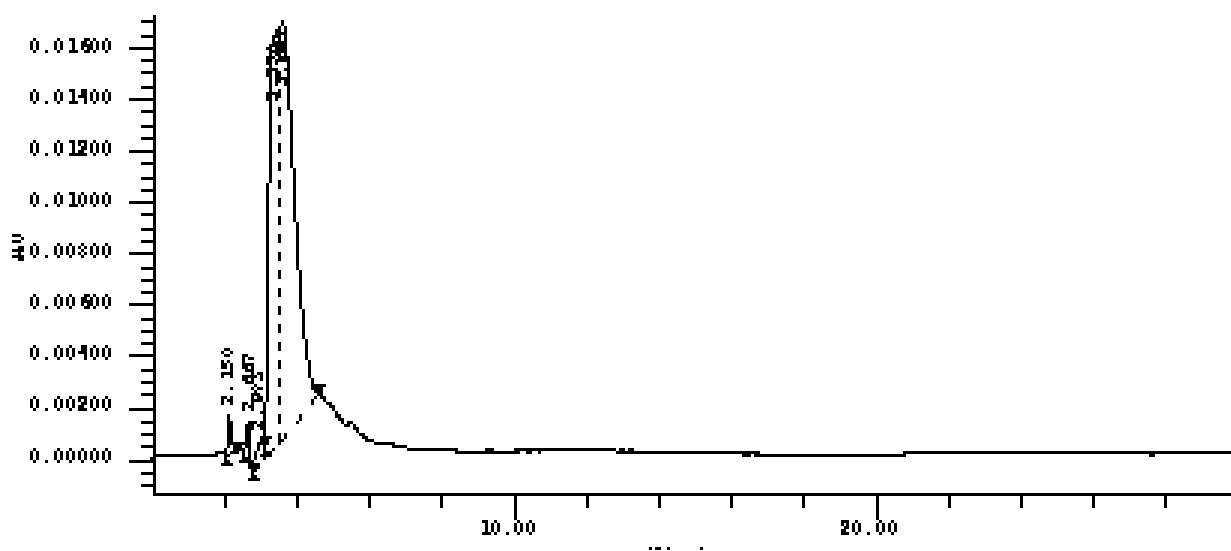
A bioadesão *in vitro* das microesferas foi avaliada de acordo com o método preconizado por RANGA RAO & BURI (1989). Sintetizando, três ratos foram deixados em jejum durante a noite e no dia seguinte seus estômagos foram removidos e lavados com solução salina. Em seguida os estômagos foram cortados em 3 pedaços de 2 cm de comprimento por 1 cm de largura. Em 2 pedaços foram adicionadas microesferas de claritromicina. Em um terceiro pedaço nada foi adicionado. As amostras foram estocadas em placas de Petri à temperatura ambiente e ambiente úmido. Após 20 minutos de repouso as amostras foram lavadas com solução salina pH 1,2 ou pH 5,0 por 5 minutos a uma taxa de 22 mL/minuto/amostra. O mesmo procedimento de lavagem foi feito para as amostras que não continham microesferas. Após lavagem as amostras de mucosa foram fotografadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1 Doseamento da claritromicina por CLAE

#### 1.1 Tempo de retenção e simetria do pico

Após a injeção de fase móvel sem claritromicina foram obtidos 5 picos cromatográficos representados na **Figura 21**. Na **Tabela 2** estão registrados os resultados dos tempos de retenção, área e altura dos picos cromatográficos obtidos. Observa-se que o último pico cromatográfico teve tempo de retenção de 3,617 minutos.



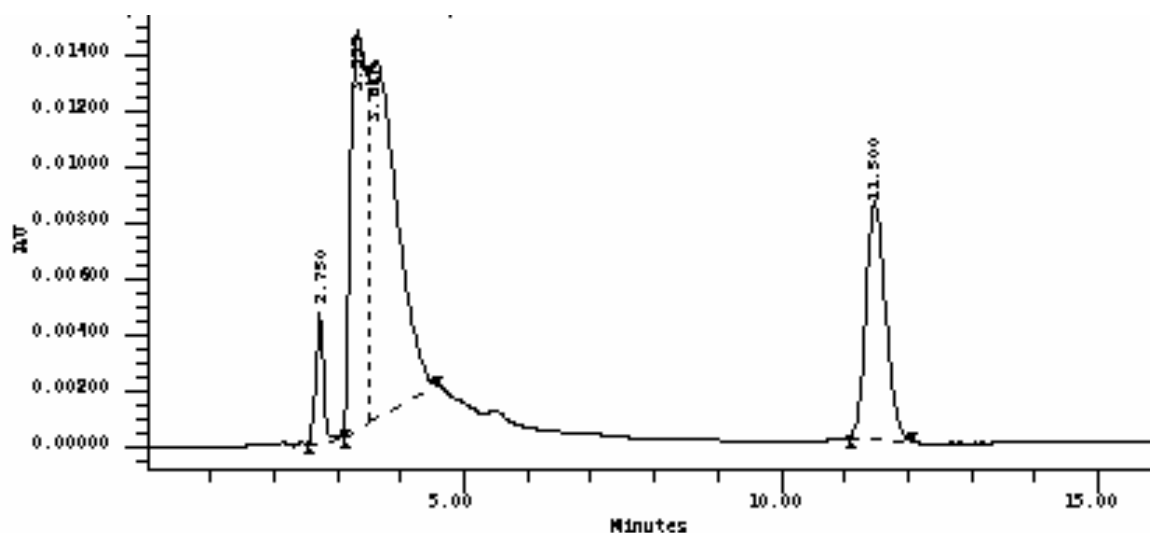
**Figura 21** – Eluição cromatográfica da fase móvel sem claritromicina durante 30 minutos por CLAE (n=3)



**Tabela 2** – Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica da fase móvel sem claritromicina durante 30 minutos por CLAE (n=3)

Tempo de retenção (min)	Área	Altura
2,150	9052	1398
2,667	9859	1559
2,983	9050	718
3,350	233027	15831
3,617	515257	16001

A **Figura 22** representa o cromatograma obtido após eluição cromatográfica da fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina. O cromatograma apresenta 4 picos cromatográficos, sendo que os três primeiros picos são relacionados aos constituintes da fase móvel e o último pico é da claritromicina padrão a 200 µg/mL. Observe que o pico da claritromicina é simétrico e bem definido. Na **Tabela 3** estão representados os resultados dos tempos de retenção, área e altura dos picos obtidos.

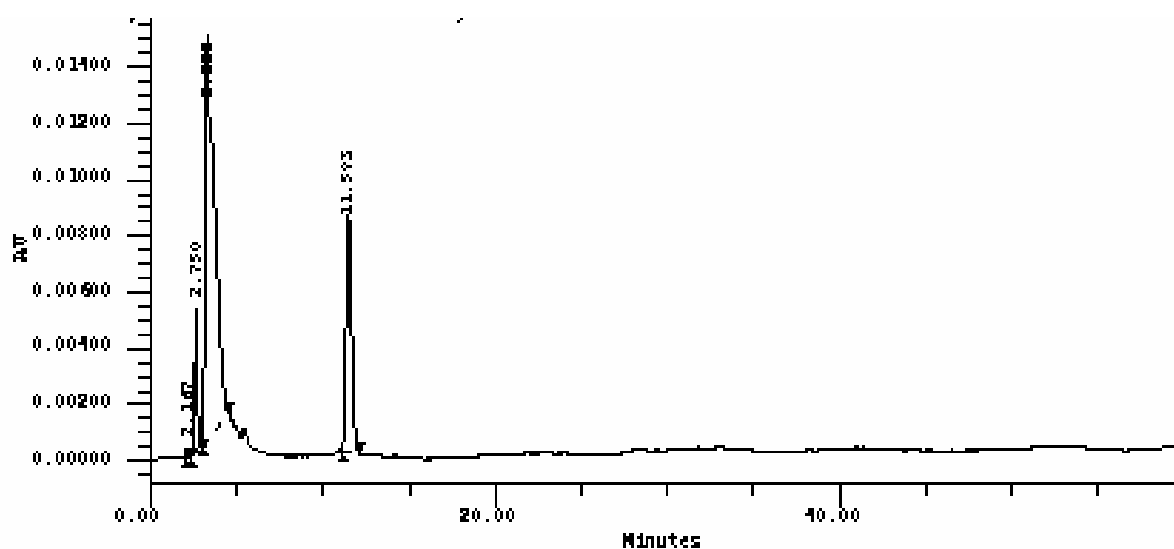


**Figura 22** - Eluição cromatográfica de uma solução de claritromicina a 200 µg/mL em fase móvel por CLAE (n=3)

**Tabela 3** - Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica de uma solução de claritromicina a 200 µg/mL em fase móvel por CLAE (n=2)

Tempo de retenção (min)	Área	Altura
2,750	36956	4555
3,333	235026	14196
3,617	394613	12709
11,500	183601	8453

Foi realizada uma corrida exploratória após injeção de solução de claritromicina padrão 200 µg/mL em fase móvel. A injeção foi de 20 µL. Como observado no cromatograma representado pela **Figura 23**, durante a corrida exploratória de 60 minutos, nenhum pico apareceu após o tempo de retenção da claritromicina indicando que o método é seletivo para análise de solução de claritromicina padrão em fase móvel. Na **Tabela 4** estão representados os resultados dos tempos de retenção, área e altura dos picos obtidos.



**Figura 23** – Eluição cromatográfica exploratória de fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina durante 60 minutos por CLAE (n = 3)

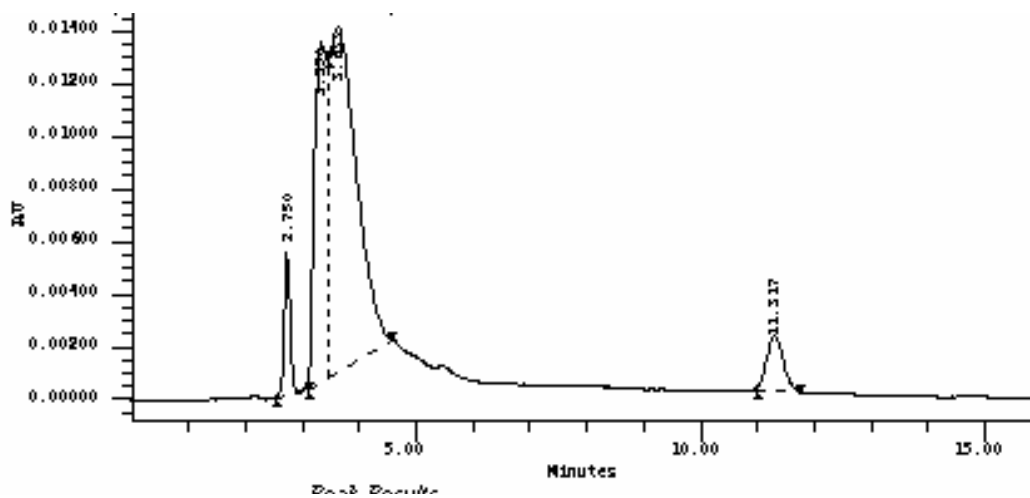
**Tabela 4** - Tempo de retenção, área e altura da eluição cromatográfica exploratória da fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina durante 60 minutos por CLAE (n=3)

Tempo de retenção (min)	Área	Altura
2,167	2636	292
2,750	49829	5046
3,333	556026	14398
11,583	183115	8369

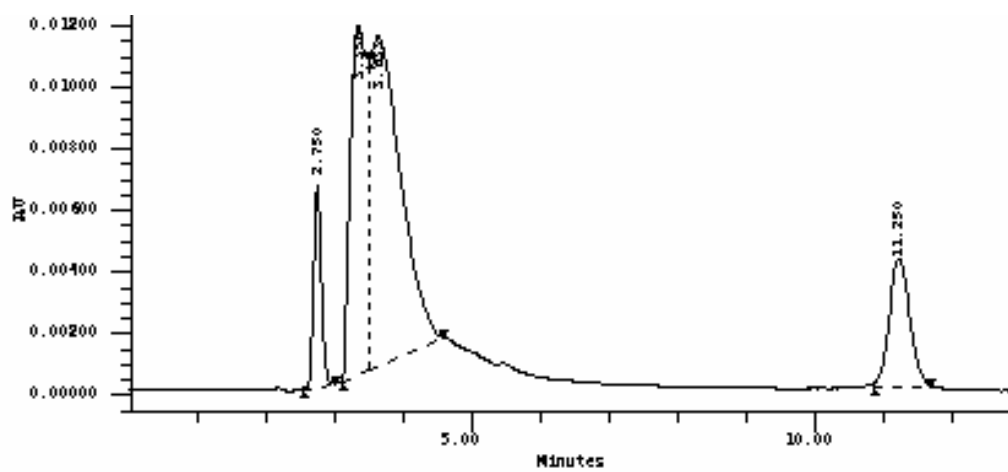
Os cromatogramas obtidos da injeção de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, e 300 µg/mL estão representados nas **Figuras 24, 25, 26 e 27** respectivamente. De acordo com os resultados indicados na **Tabela 5**, observa-se que a área aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de claritromicina para os picos com tempo de retenção entre 11,317 e 11,500. Os tempos de retenção dos picos anteriores são relacionados à fase móvel que é o solvente da solução de claritromicina injetada. Esses resultados confirmam o tempo de retenção da claritromicina.

**Tabela 5** - Tempo de retenção e área da eluição cromatográfica por CLAE da fase móvel contendo diferentes concentrações de claritromicina (n=3)

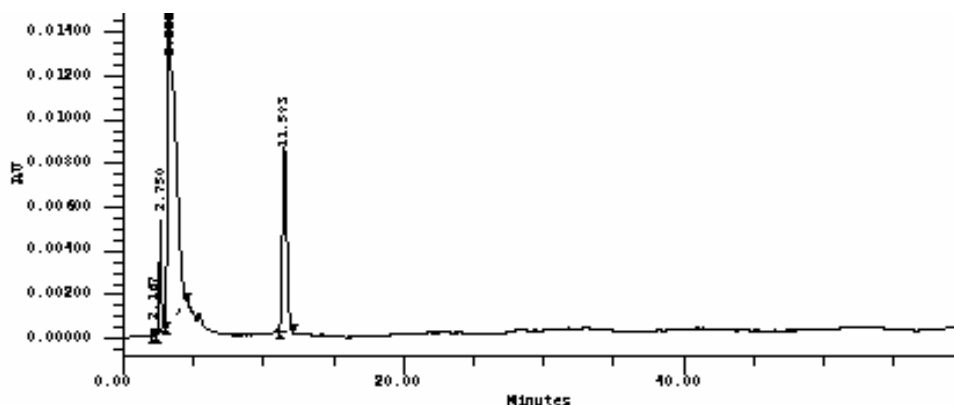
Concentração (µg/mL)	Tempo de retenção (min)	Área
50	11,317	41351
	11,317	40104
	11,300	41834
100	11,250	84564
	11,250	85899
	11250	85287
200	11,583	183115
	11,500	183601
	11,500	183400
300	11,183	276001
	11,200	275340
	11,183	276200



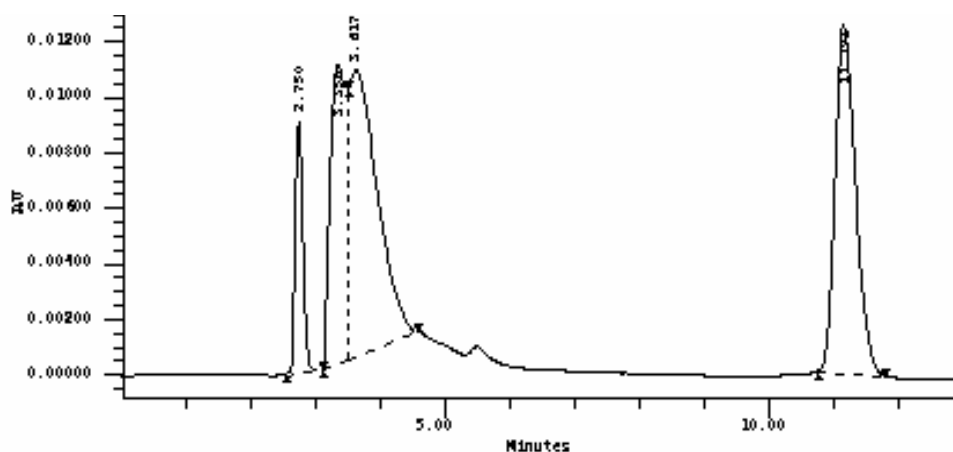
**Figura 24** - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 50 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3)



**Figura 25** - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 100 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3)



**Figura 26** - Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 200 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3)

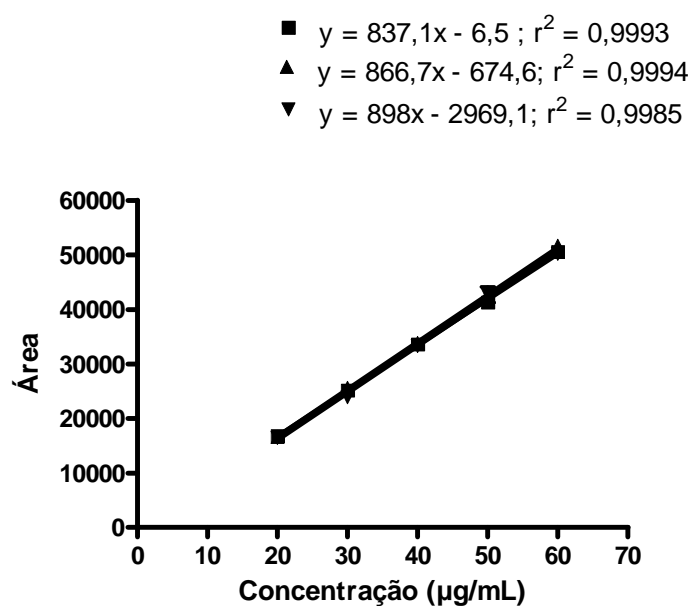


**Figura 27** – Eluição cromatográfica da fase móvel contendo 300 µg/mL de claritromicina por CLAE (n = 3)

Conclui-se com estes resultados que os componentes da fase móvel não interferem no tempo de retenção da claritromicina e que o pico apresentou boa simetria. Além disso, observa-se na **Tabela 5** que a área do pico aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração, confirmando o tempo de retenção da claritromicina.

## 1.2 Linearidade

A **Figura 28** apresenta três curvas padrões da claritromicina obtidas em dias diferentes com as respectivas equações da reta e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ). A análise de regressão da curva revelou linearidade adequada dentro da faixa de concentração trabalhada (20 a 60  $\mu\text{g/mL}$ ). Na **Tabela 6** estão registrados os resultados das áreas obtidas assim como a média dos valores das áreas absolutas mais o erro padrão das médias (média  $\pm$  EP) e os fatores de retenção obtidos a partir das injeções de diferentes concentrações de claritromicina. Estes dados foram utilizados para construção da curva padrão e para os cálculos do fator de resposta e o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) do fator de resposta e da curva padrão.



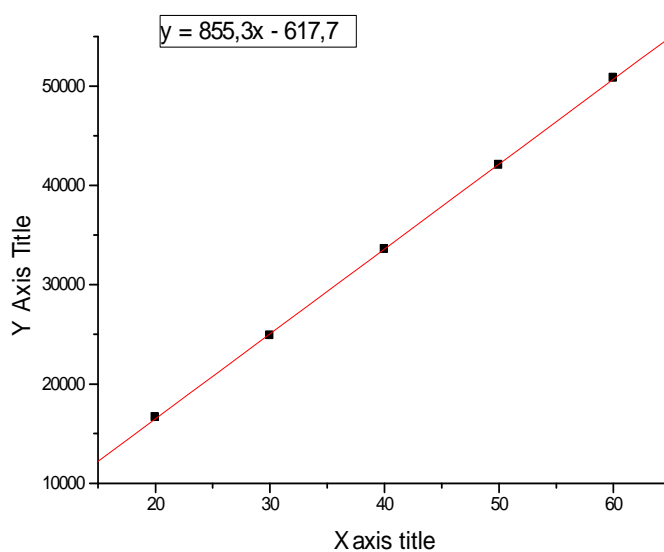
**Figura 28** - Representação gráfica de três curvas padrões de claritromicina, obtidas por CLAE em dias diferentes.

**Tabela 6** - Resultados estatísticos obtidos para as soluções padrões de claritromicina em fase móvel para as diferentes concentrações utilizadas na construção da curva de calibração por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Média das áreas ± sd	Fator de resposta	DPR (%)
20	16.647 ± 226	832	1,35
30	24.885 ± 873	830	3,50
40	33.580 ± 435	839	1,29
50	42.051 ± 981	841	2,33
60	50.833 ± 697	847	1,37

sd = desvio padrão, DPR = desvio padrão relativo

A **Figura 29** mostra a representação gráfica da curva padrão final, obtida a partir da média dos pontos das três curvas.



**Figura 29** - Representação gráfica da curva padrão de claritromicina, obtidas a partir das três curvas padrões por CLAE nas concentrações de 20 a 60 µg/mL (n=9).  $Y = 855,37 X - 617$ ; coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9999 e desvio padrão relativo (%DPR) igual a 0,47%.

### 1.3 Precisão

#### 1.3.1 Repetibilidade

No experimento do terceiro dia cada diluição foi realizada em triplicata para avaliar precisão intra-dia e cada solução foi injetada uma única vez. A **Tabela 7** mostra as médias das áreas dos picos obtidas em triplicata e em um mesmo dia, para as cinco concentrações de claritromicina, utilizadas para a construção da curva padrão, com os respectivos desvios absolutos e relativos.

**Tabela 7** - Resultados do teste de repetibilidade para a validação do doseamento cromatográfico de claritromicina por CLAE (n=3)

Concentração (µg/mL)	Média das áreas ± sd	Fator de resposta	DPR (%)
20	16.480 ± 53	824	0,32
30	23.940 ± 704	798	2,94
40	33.268 ± 501	832	1,50
50	42.674 ± 1.467	853	3,43
60	50.225 ± 303	837	0,60

sd = desvio padrão, DPR = desvio padrão relativo

O método apresentou o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) na faixa de 0,32 a 3,43% para todas as concentrações analisadas, valores bem inferiores ao valor máximo de 15%, o que demonstra boa precisão do método, quanto a repetibilidade.

#### 1.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo dos valores das áreas dos picos, obtidos em triplicata, em três dias diferentes para as cinco concentrações de claritromicina utilizadas na construção da curva padrão. Os resultados estão apresentados na **Tabela 8**.



**Tabela 8** - Resultados do teste de precisão intermediária, em três dias, para validação do doseamento cromatográfico de claritromicina por CLAE (n=9).

Concentração (µg/mL)	Média das áreas ± sd	Fator de resposta	DPR (%)
20	16.647 ± 226	832	1,35
30	24.885 ± 873	830	3,50
40	33.570 ± 435	839	1,29
50	42.051 ± 981	841	2,33
60	50.833 ± 697	847	1,37

sd = desvio padrão, DPR = desvio padrão relativo

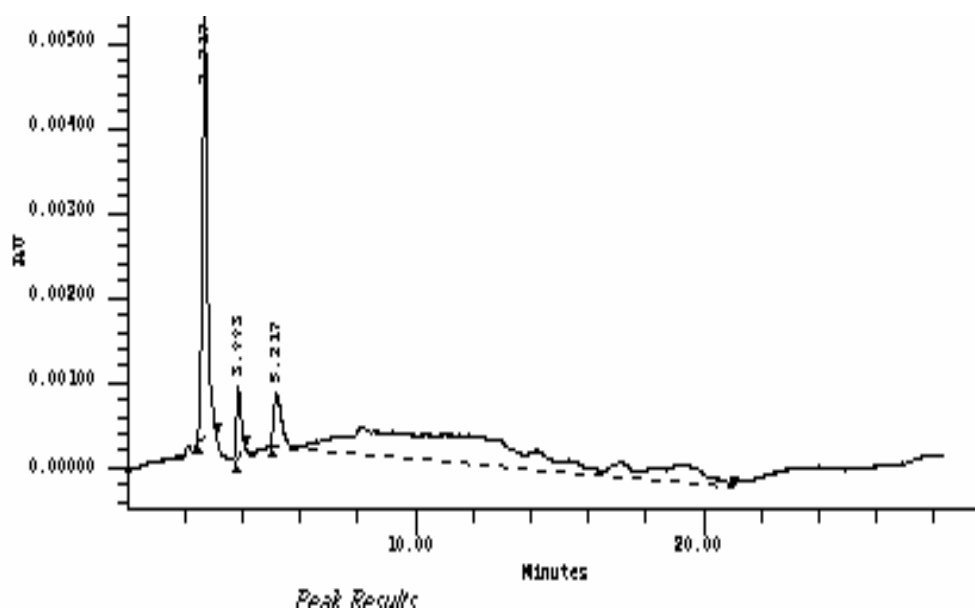
### 1.3.3 Seletividade

A seletividade do método foi determinada a fim de assegurar que as respostas obtidas nas condições padronizadas provêm somente da substância analisada. Os resultados do teste de seletividade utilizando a etilcelulose dissolvida em metanol, carbopol disperso em metanol, microesferas sem claritromicina dissolvida em metanol encontram-se na **Tabela 9**.

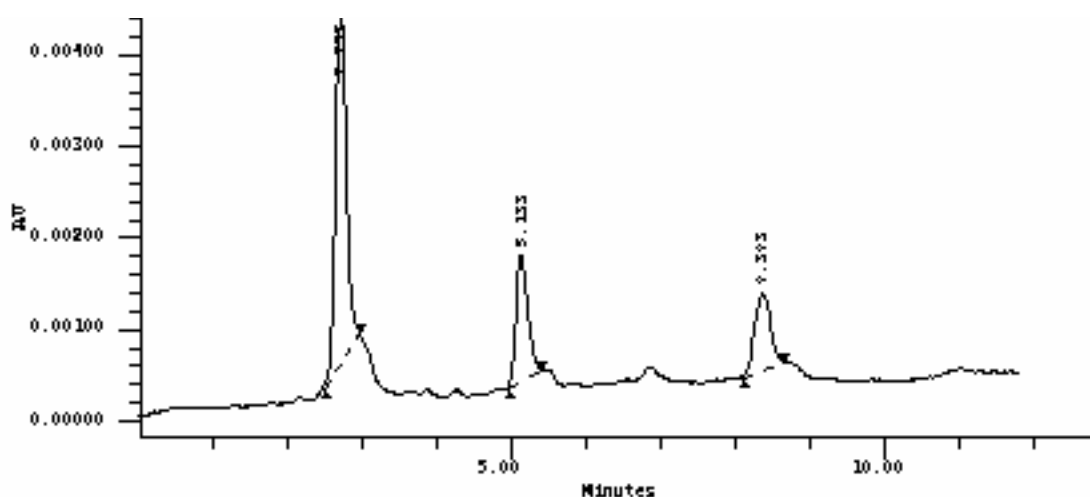
**Tabela 9** - Resultados do teste de seletividade utilizando etilcelulose, carbopol, microesferas sem claritromicina e solução padrão de claritromicina a 200 µg/mL dispersos em metanol (n=3)

Amostra	Média das áreas dos picos	Tempo de retenção entre 9,000 e 9,800	Concentração obtida (µg/mL)
Etilcelulose dispersa em metanol	-	-	-
Carbopol disperso em metanol	-	-	-
Microesferas sem claritromicina dispersas em metanol	-	-	-
Solução padrão de claritromicina a 200µg/mL	164.716	9,383	193,3

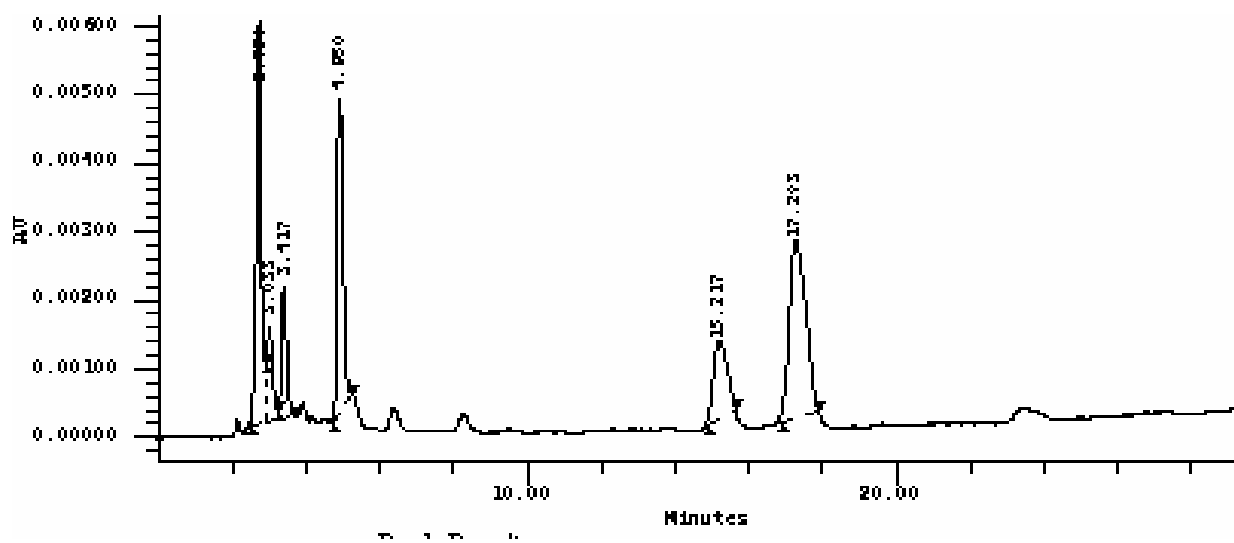
As **Figuras 30, 31, 32 e 33** e representam os cromatogramas obtidos a partir da injeção de etilcelulose dissolvida em metanol, carbopol disperso em metanol, microesferas sem claritromicina dissolvida em metanol e solução padrão de claritromicina a 200 µg/mL. De acordo com os resultados acima, conclui-se que o método de doseamento de claritromicina é seletivo.



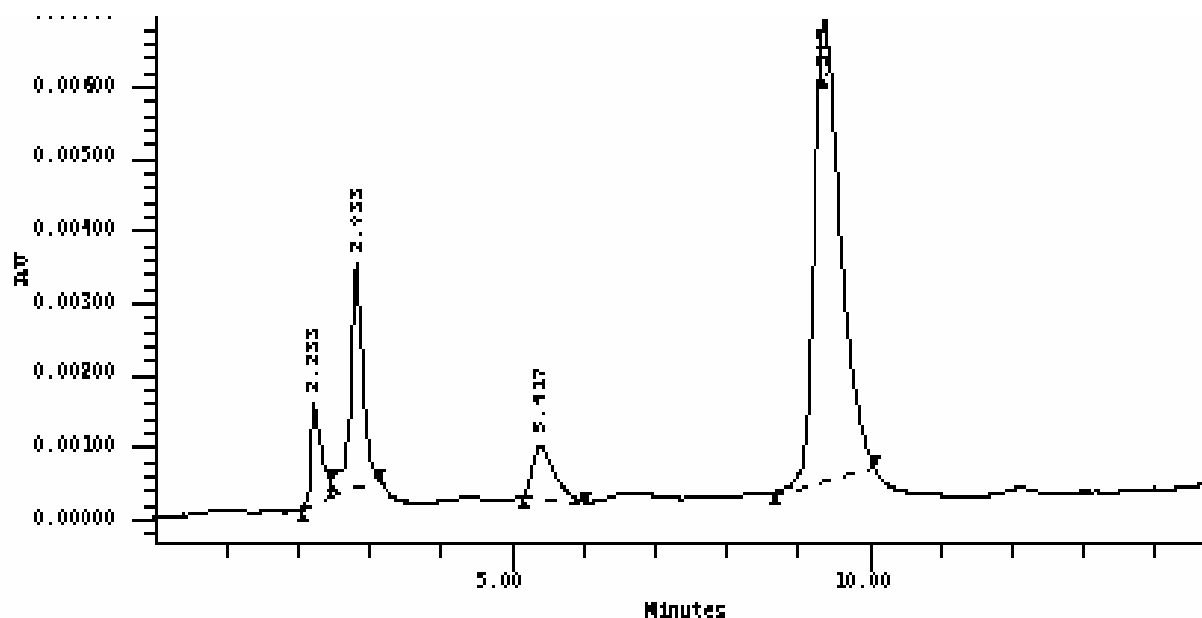
**Figura 30** - Eluição cromatográfica de etilcelulose dispersa em metanol por CLAE (n = 3).



**Figura 31** - Eluição cromatográfica de carbopol disperso em metanol por CLAE (n = 3).



**Figura 32** – Eluição cromatográfica dos constituintes das microesferas brancas dispersas em metanol por CLAE (n = 3).



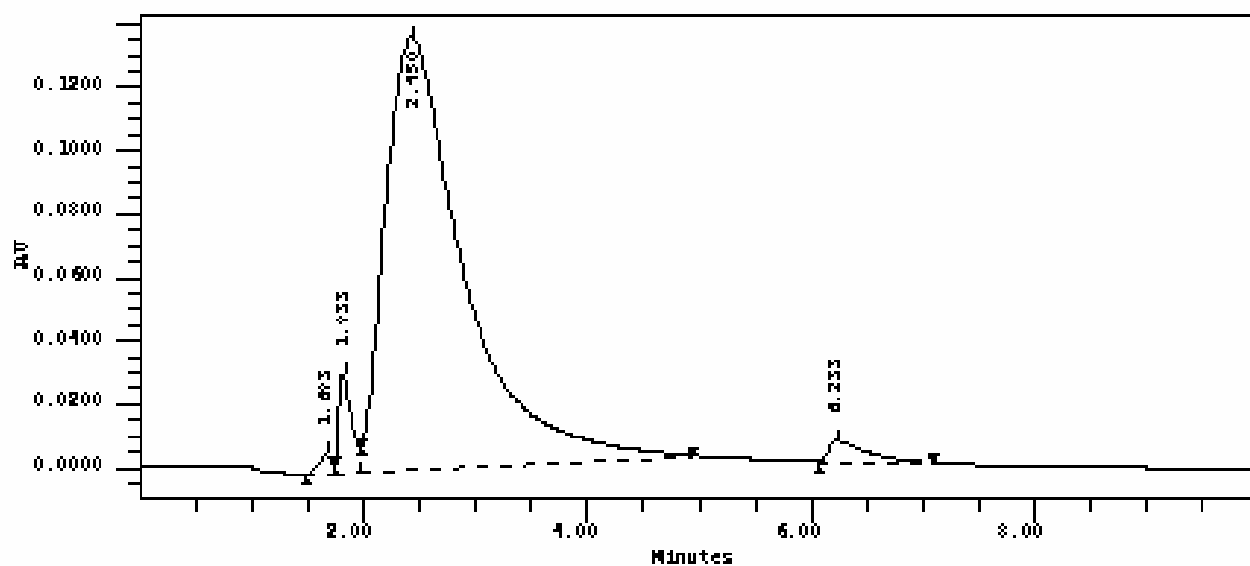
**Figura 33** - Eluição de claritromicina padrão na concentração teórica de 200 µg/mL por CLAE (n = 3).

### 1.3.4 Tempo de retenção relativo entre claritromicina e 6,11-O-metileritromicina

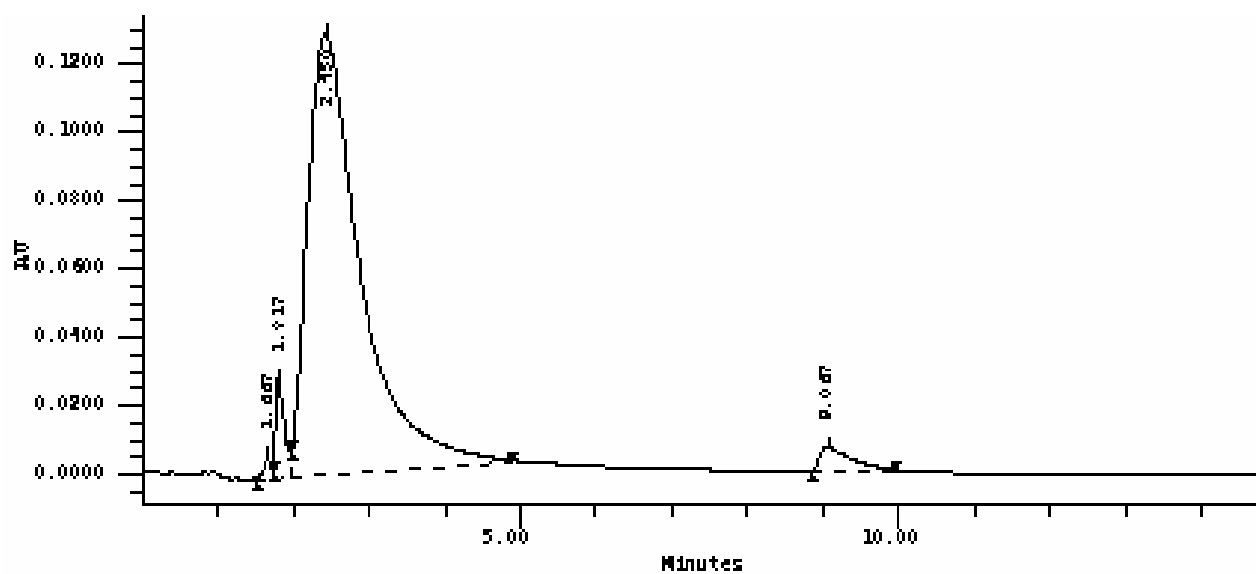
As Figuras 34, 35 e 36 representam respectivamente os cromatogramas por CLAE da solução de claritromicina a 200 µg/mL, da solução de 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL e das soluções de claritromicina a 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL. Na Tabela 10 estão representados o tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos. O tempo de retenção relativo da claritromicina foi 0,69 e do 6,11-O-metileritromicina foi 1,0. O tempo de retenção relativo descrito pela farmacopéia utilizando fase móvel com pH 4 foi de 0,75 para a claritromicina e 1,0 para 6,11-O-metileritromicina. O tempo de retenção relativo obtido nesse experimento, 0,69 foi apenas 10% menor que 0,75.

**Tabela 10** - Tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos por CLAE de claritromicina 200 µg/mL, 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL e claritromicina 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL (n=3)

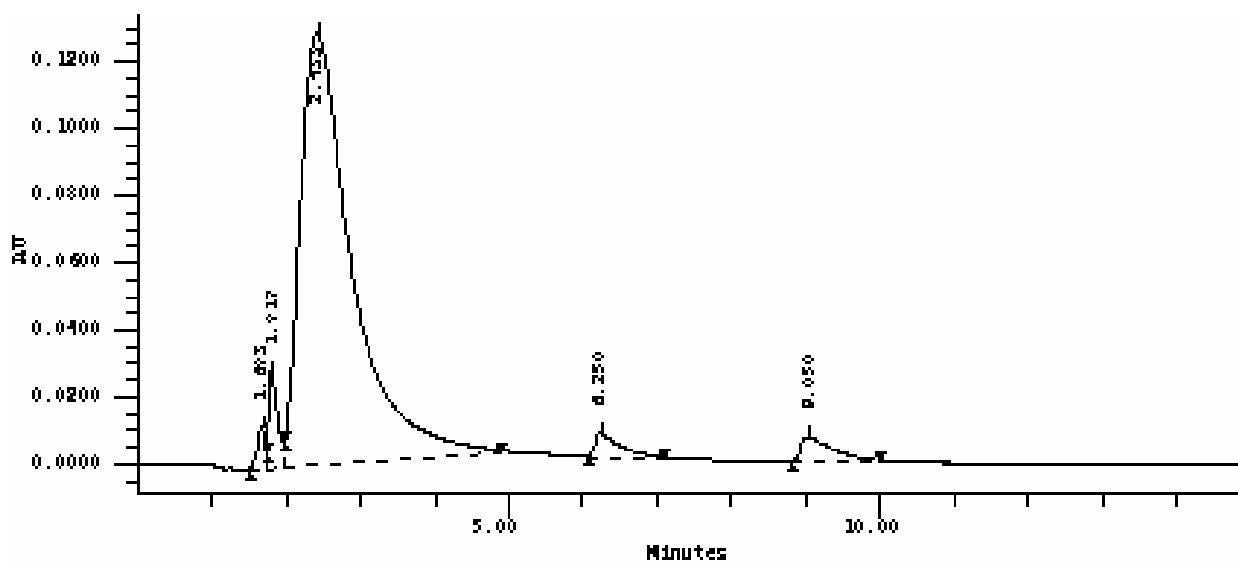
Concentração (µg/mL)	Tempo de retenção (min)	Área
Claritromicina 200 µg/mL	6,233	151.992
6,11-O-Metileritromicina 200 µg/mL	9,067	192.812
Claritromicina 200 µg/mL + 6,11-O-metileritromicina 200 µg/mL	6,250 9,050	153.738 206.748



**Figura 34** – Eluição cromatográfica por CLAE de claritromicina a 200 µg/mL (n=3).



**Figura 35** - Eluição cromatográfica por CLAE de 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL (n=3).



**Figura 36** - Eluição cromatográfica por CLAE de claritromicina a 200 µg/mL mais 6,11-O-metileritromicina a 200 µg/mL (n=3).

Posteriormente, um teste foi feito utilizando soluções de 6,11-O-metileritromicina e de claritromicina preparadas 1 dia antes da análise cromatográfica. O cromatograma não acusou a presença da 6,11-O-metileritromicina, indicando que esta substância sofre degradação em solução (dados não mostrados). Este resultado sugere que a solução de 6,11-O-metileritromicina deve ser preparada no dia do experimento.

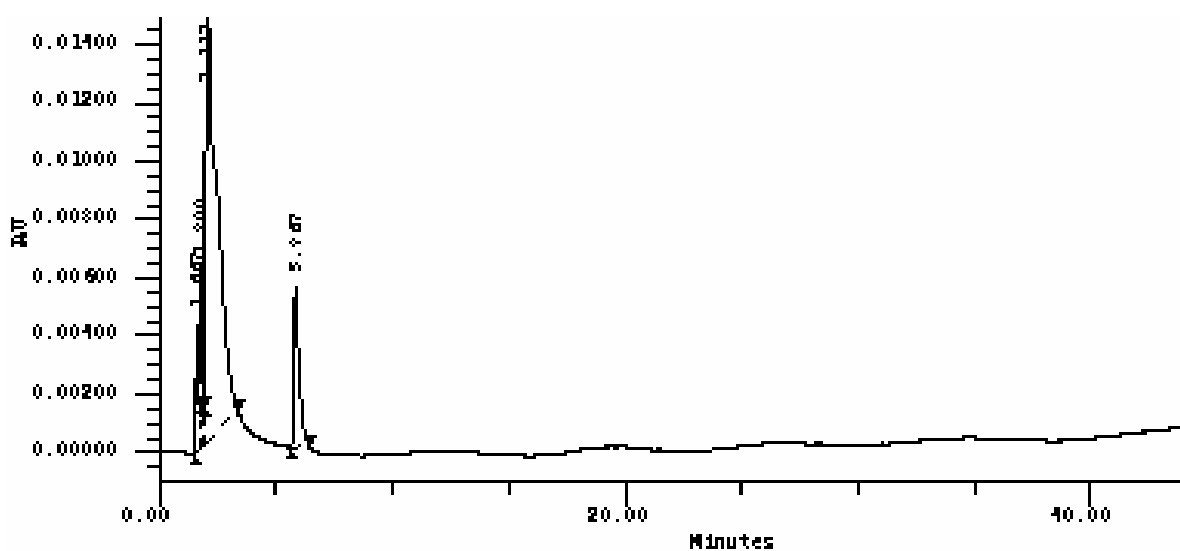
#### 1.4 Doseamento do padrão secundário de claritromicina

Na **Tabela 11** estão registrados o tempo de retenção e a área dos picos cromatográficos por CLAE dos padrões primário e secundário de claritromicina, ambos na concentração de 200 µg/mL. Observa-se que os tempos de retenção e as áreas são aproximadamente iguais indicando que o padrão secundário de claritromicina utilizado nos experimentos apresenta qualidade satisfatória.

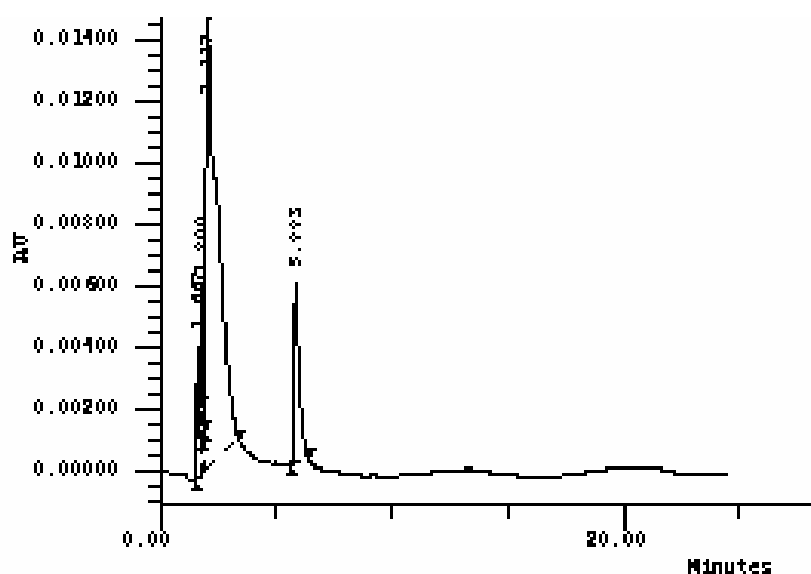
**Tabela 11** - Tempo de retenção e área dos picos cromatográficos por CLAE do padrão primário e secundário de claritromicina, ambos a 200 µg/mL (n=3)

Padrão de claritromicina (200 µg/mL)	Tempo de retenção (min)	Área
Primário	5,883	88706
Secundário	5,867	83701

Os dois cromatogramas apresentaram quatro picos. Observa-se nas **Figuras 37 e 38** que não houve presença de nenhum pico cromatográfico após o pico da claritromicina.



**Figura 37** – Eluição cromatográfica por CLAE do padrão secundário de claritromicina na concentração de 200 µg/mL (n=3).



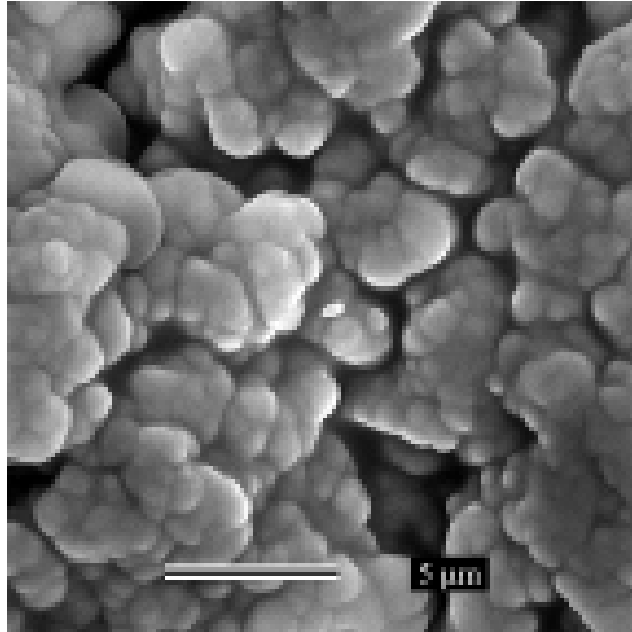
**Figura 38** – Eluição cromatográfica por CLAE do padrão primário de claritromicina na concentração de 200 µg/mL (n=3).

## 2 Microesferas

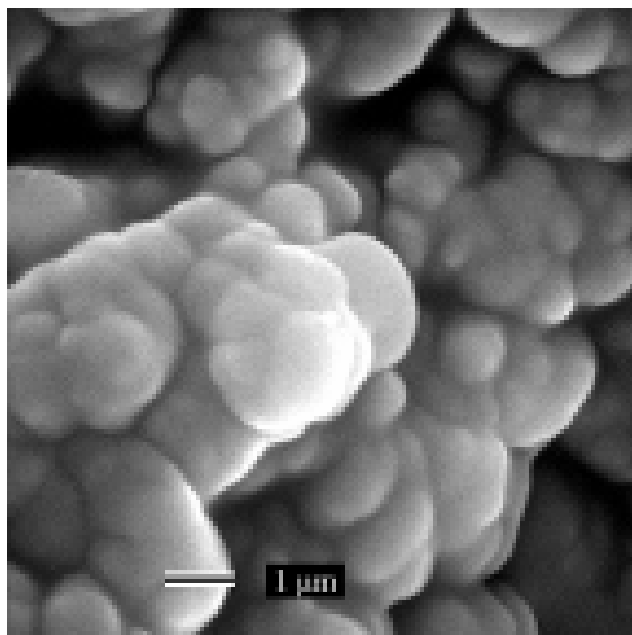
### 2.1 Tamanho e morfologia

A caracterização das microesferas foi feita por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Através da microscopia óptica foi possível confirmar a obtenção das microesferas e determinar o seu tamanho, distribuição e forma. A maioria das microesferas apresentou tamanho de 1 a 2 µm e forma arredondada. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura confirmaram estes resultados (**Figuras 39 e 40**). Entretanto, não ocorreu formação de microesferas quando a claritromicina não foi adicionada durante o preparo das microesferas (**Figura 41**).

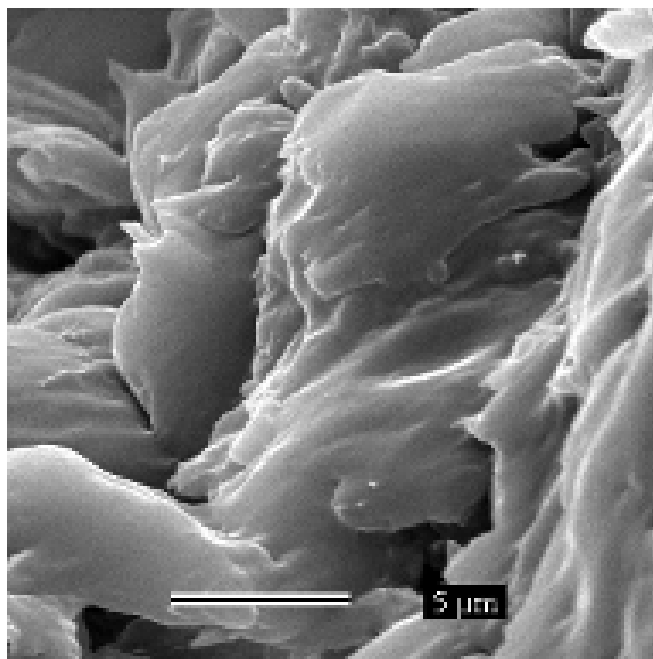




**Figura 39** - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de claritromicina. Ampliação de 5.000 vezes (escala indicada)



**Figura 40** - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de claritromicina. Ampliação de 10.000 vezes (escala indicada)



**Figura 41** – Microscopia eletrônica de varredura das “microesferas” sem claritromicina. Ampliação de 5.000 vezes (escala indicada)

As microesferas contendo claritromicina foram preparadas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente de acordo o preconizado por LIU *et al.* (2005). Esse método é freqüentemente utilizado para encapsular drogas insolúveis ou pouco solúveis em água (LI *et al.*, 2008). O polímero mucoadesivo utilizado foi o carbopol. Como ele é um poliânion, é bastante provável que ele possa formar complexos com excipientes não iônicos ou catiônicos ou com os ingredientes ativos da formulação, modificando o perfil de liberação e características bioadesivas da formulação (SINGLA *et al.*, 2000). Resinas de carbopol têm sido amplamente utilizadas em combinação com outros polímeros, particularmente celulose (hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose). Nós escolhemos como matriz das microesferas a etilcelulose, um polímero biocompatível, de baixo custo e estável em uma ampla faixa de pH, ou seja, ele pode ser capaz de proteger o fármaco dos fluídos do trato gastrointestinal.

As microesferas apresentaram tamanho variando entre 1 e 2 µm e forma arredondada. Já as produzidas por LIU *et al.* (2005) utilizando o mesmo método e

polímeros, porém, numa dispersão mais concentrada tiveram um tamanho variando entre 400 e 1000  $\mu\text{m}$ . Sabe-se que quando a concentração dos polímeros aumenta, a viscosidade da fase interna também aumenta, resultando em aumento do tamanho das microesferas devido à menor capacidade de formação de glóbulos menores durante a fase de emulsificação (O'DONNELL & MCGINITY, 1997). Em estudos mais recentes, LI *et al.* (2008) confirmaram que o tamanho das microesferas aumenta exponencialmente com o aumento da viscosidade.

## 2.2 Taxa de encapsulação da claritromicina nas microesferas

O teor total de claritromicina presente nas microesferas, encapsulada e adsorvida, foi quantificado. Obteve-se um total de 40,00%  $\pm$  0,38% de claritromicina (**Tabela 12**).

**Tabela 12** – Teor total de claritromicina presente nas microesferas (n=3)

Amostra	Concentração de claritromicina ( $\mu\text{g/mL}$ )		% Encapsulação
	Teórica	Real	
1	112	44,71	39,72
2	103	41,82	40,44
3	107	42,83	39,73
Média $\pm$ sd	-	-	40,00 $\pm$ 0,38

sd = desvio padrão

O teor de claritromicina adsorvida na superfície das microesferas foi igual a 4,24%  $\pm$  0,44 p/p (**Tabela 13**).

**Tabela 13** – Claritromicina adsorvida na superfície das microesferas (n=2)

Amostra	Concentração de claritromicina ( $\mu\text{g/mL}$ )		% Encapsulação
	Teórica	Real	
1	200	9,30	4,55
2	184	7,44	3,93
Média $\pm$ sd	-	-	4,24 $\pm$ 0,44

sd = desvio padrão

Considerando que a quantidade total de claritromicina, encapsulada e adsorvida, presente nas microesferas foi de  $40\% \pm 0,38\%$ , que desse total  $4,24\% \pm 0,44$  estava adsorvida na superfície externa, pode-se concluir que  $35,76\%$  da claritromicina estava encapsulada nas microesferas.

Provavelmente os  $60\%$  restantes foram eliminados durante as etapas de lavagens empregadas no processo de preparação das microesferas. No líquido da primeira lavagem foi encontrado  $7,08\%$  do valor total teórico (dados não mostrados). Este baixo teor nos faz supor que nem toda massa de claritromicina presente na fase oleosa migrou para a fase aquosa durante o processo de extração da claritromicina.

## 2.3 Liberação in vitro da claritromicina das microesferas

### 2.3.1 Doseamento da claritromicina por espectrofotometria no ultravioleta (UV)

As absorvâncias das soluções de claritromicina nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50  $\mu\text{g/mL}$  foram preparadas e lidas em triplicata no UV (comprimento de onda de 485 nm) em espectrofotômetro Shimadzu (UV-160 A, Japão) com o objetivo de se fazer uma curva de calibração. Como a absorvância foi inferior a 0,1 para as concentrações de 2,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , optou-se em continuar os experimentos com concentrações de claritromicina igual ou superior a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Como branco usou-se uma solução de metanol e ácido clorídrico. A média das absorvâncias foi plotada no gráfico em função das seguintes concentrações:

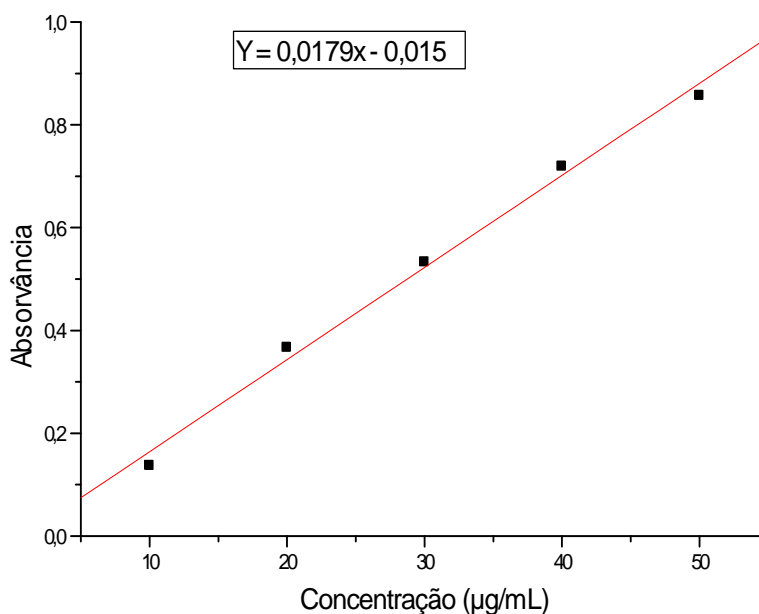
10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Na **Tabela 14** estão registrados os resultados para a construção da curva de calibração. Pode-se verificar que o fator de resposta somente foi constante a partir de uma concentração de 20 µg de claritromicina por mL. Após todos os resultados apresentados podemos concluir que a análise da claritromicina por CLAE e por UV somente nos fornecerá dados confiáveis quando a concentração da claritromicina for ao mínimo 20 µg/mL.

**Tabela 14** - Construção de curva de calibração para determinação da claritromicina por UV (n = 3)

Concentração (µg/mL)	Fator de resposta X 1.000	Média do fator de resposta ± sd
10	13,76	16,98 ± 1,85 CV% = 10,92
20	18,33	
30	17,73	
40	17,97	
50	17,14	

sd = desvio padrão

A **Figura 42** mostra a representação gráfica da curva padrão final, obtida a partir da média dos pontos das três curvas.



**Figura 42** - Representação gráfica da curva padrão de claritromicina obtida a partir das três curvas padrões pelo método espectrofotométrico nas concentrações de 10 a 50 µg/mL (n = 3).  $Y = 0,0179x - 0,015$ ; coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9929 e desvio padrão relativo (%DPR) igual a 5,27%.

### 2.3.2 Seletividade do método de dosagem da claritromicina no UV

No comprimento de onda de 485 nm não ocorreu absorvância de nenhum constituinte do meio líquido gástrico simulado indicando que o método é seletivo para o doseamento da claritromicina por UV.

### 2.3.3 Estabilidade do padrão de claritromicina no líquido gástrico simulado

Após dispersar no líquido gástrico simulado 10 mg de claritromicina, foi quantificada uma massa de 6,2 mg por CLAE, correspondendo a 62% p/v da massa total acrescentada ao meio. Portanto, aproximadamente 3,8 g de claritromicina provavelmente podem ter se ligado aos componentes do leite ou não

se dissolveram no meio artificial. Resultado similar foi obtido por análise espectrofotométrica quando se incubou 1 mg de padrão de claritromicina no mesmo meio. Nesse caso, foi encontrada 58,6% da claritromicina adicionada ao meio. Pode-se concluir que aproximadamente 40% da claritromicina se liga às proteínas do leite, presentes no líquido gástrico artificial, ou não são capazes de solubilizar nesse meio. A claritromicina após permanecer no líquido gástrico por 15 minutos ou uma hora, apresentou resultados similares.

### 2.3.4 Estudos de liberação in vitro

Utilizando a equação da reta entre 10 a 50 µg/mL verifica-se que a claritromicina liberada das microesferas após 2 e 4 horas de incubação foram respectivamente iguais a  $30,84 \pm 4,65\%$  e  $39,21 \pm 2,00\%$  (**Tabela 15**). Entretanto, se os cálculos fossem feitos utilizando a equação da reta de 20 a 50 µg/mL, os resultados seriam praticamente os mesmos, respectivamente  $29,43 \pm 4,00\%$  e  $37,83 \pm 2,18\%$ , apesar do fator de resposta desta reta não ser constante.

**Tabela 15** – Teor de claritromicina presente nas microesferas após 2 e 4 horas de incubação em 10 mL de meio gástrico artificial contendo leite (n=3). Os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta de 10 a 50 µg/mL.

Amostra	% de claritromicina liberada das microesferas	
	Após 2 horas de incubação	Após 4 horas de incubação
1	29,18	37,66
2	27,25	38,52
3	36,10	41,47
Média ± sd	$30,84 \pm 4,65$	$39,21 \pm 2,0$

sd = desvio padrão

O teor de claritromicina que permaneceu nas microesferas após 2 e 4 horas de incubação no meio gástrico artificial foram respectivamente iguais a  $51,82 \pm 4,78\%$  e  $28,94 \pm 0,266\%$  (**Tabela 16**).

**Tabela 16** – Teor de claritromicina presente nas microesferas após 2 e 4 horas de incubação em 10 mL de meio gástrico artificial contendo leite (n=3). Os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta de 10 a 50 µg/mL.

Amostra	% de claritromicina presente nas microesferas	
	Após 2 horas de incubação	Após 4 horas de incubação
1	54,12	28,88
2	55,02	28,72
3	46,32	29,24
Média ± sd	$51,82 \pm 4,78$	$28,94 \pm 0,266$

sd = desvio padrão

Estudos de liberação de claritromicina foram realizados em fluido gástrico simulado pH 1 por diversos autores (MAJITHIYA & MURTHY, 2005; RAMTEKES *et al.*; 2006; RAMTEKES & JAIN, 2008). Outros estudos utilizaram solução tampão fosfato salina pH 7,4 em meio PBS (RAMTEKES *et al.*; 2006; RAMTEKES & JAIN, 2008). CHUN *et al.* (2005) realizaram testes de liberação em meios com valores de pH iguais a 2; 4 e 6,8 mas não especificaram a composição do meio. Entretanto uma simples solução aquosa tamponada não representa todos os aspectos das condições fisiológicas do trato gastrointestinal (JANTRATID *et al.*; 2008). Várias tentativas têm sido feitas para simular o fluido gastrointestinal no estômago em jejum, como fluido gástrico simulado com pH igual a 1,2 contendo pepsina (USP, 2006) e fluido gástrico simulado com pH igual a 1,6 contendo pepsina e baixas quantidades de sais biliares e lecitina (VERTZONI *et al.*; 2005). Este segundo meio parece ser mais apropriado que o proposto pela USP (2006) porque uma tensão superficial reduzida no meio é criada pela concentração fisiológica de pepsina em vez de surfactante sintético.(JANTRATID *et al.*; 2008). Neste estudo foi utilizado o meio de liberação proposto por JANTRATID *et al.*



(2008) porque consideramos que este meio reproduz melhor a composição do fluido gástrico que os meios propostos anteriormente. Portanto os resultados *in vitro* obtidos neste experimento provavelmente prevêm melhor como seriam os resultados *in vivo* quando comparados com outros estudos que anteriormente utilizaram claritromicina.

Os fatores que afetam a liberação da droga estão diretamente relacionados com a estrutura da matriz onde a droga está contida, com as propriedades químicas associadas com a droga e o polímero e são atribuídos a massa molar do polímero, ao tamanho das microesferas, a morfologia, a distribuição e a constituição do sistema de liberação. O perfil de liberação ideal seria a obtenção de uma taxa de liberação constante com o tempo. Entretanto em muitos casos os perfis de liberação das drogas são mais complicados e freqüentemente contém dois dos principais processos de expulsão que são o burst inicial de liberação do fármaco da superfície e a taxa de liberação dependente da difusão e degradação, sendo esta geralmente um estágio mais constante. A degradação das microesferas poliméricas está relacionada com a massa molar do polímero. Estudos mostraram que em esferas contendo polímero com cadeias de baixa massa molar, a quantidade de produtos de degradação aumentou com o tempo causando diminuição da massa molar dos polímeros das microesferas, entretanto, para microesferas feitas com polímeros de elevada massa molar, a quantidade de produto de degradação e a massa molar do polímero permaneceram constantes por um longo período de tempo. Evidências sugeriram que a variação do perfil de degradação ocorreu devido às diferenças na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e cristalinidade associada com polímeros de diferentes massas molares. Um estudo relatou que o perfil da taxa de liberação da droga em partículas contendo polímeros de baixa massa molar foi relativamente constante enquanto que em partículas contendo polímeros de elevada massa molar a liberação foi inicialmente mais elevada e seguida por uma diminuição que então novamente aumentou sugerindo a presença de dois mecanismos de liberação quando são utilizados polímeros de elevada massa molar. O processo de degradação é o principal mecanismo de liberação quando são utilizados polímeros de baixa massa molar

depois do estágio de burst inicial. O processo de difusão em que o fármaco é liberado lentamente seguido pelo processo de degradação ocasionando rápida liberação da droga são os principais mecanismos de liberação quando são utilizados polímeros de elevada massa molar. Considerando a cristalinidade das microesferas, estudos anteriores sugeriram que a degradação ocorre primeiro em regiões amorfas das microesferas, seguida por uma degradação mais lenta nas regiões cristalinas. Além disso, o perfil de liberação também depende do tamanho das microesferas, sendo que a taxa de liberação da droga diminuiu com aumento das microesferas. Também é de se supor que a porosidade tem um importante efeito nas características de liberação da droga, porque um grande número de poros pode influenciar acentuadamente a taxa de expulsão da droga (FREIBERG & ZHU, 2004).

Verificamos no estudo anterior que um elevado percentual de claritromicina se liga às proteínas do leite, presentes no líquido gástrico artificial ou não são capazes de solubilizar nesse meio, apesar de não termos trabalhado em condição sink. Apesar disso, nosso estudo demonstrou que aproximadamente 30% da claritromicina encapsulada nas microesferas poderá ser liberada após 4 horas de incubação *in vitro*.

#### **2.4 Mucoadesão in vitro**

O teste de mucoadesão *in vitro* foi realizado lavando a mucosa de ratos com solução salina/HCl pH 1,2 ou 5,0 com objetivo de comparar as propriedades mucoadesivas das microesferas nesses dois meios. O meio ácido gástrico com pH em torno de 5,0 representa o estado alimentado enquanto meio ácido gástrico com pH em torno de 1,2 representa o estado de jejum. A **Figura 43** representa uma mucosa de rato após ter sido lavada com solução salina. Já as próximas figuras foram obtidas após adição das microesferas, incubação e lavagem com solução salina pH 1,2 (**Figura 44**) ou 5,0 (**Figura 45**). Aproximadamente 60% das microesferas permaneceram nas mucosas após serem lavadas com solução salina, independente do pH da solução salina empregada, pH 1,2 ou 5,0.



**Figura 43** - Mucosa de rato após incubação sem microesferas e lavagem com solução salina



**Figura 44** - Mucosa de rato após adição de microesferas, incubação e lavagem com solução salina pH 1,2



**Figura 45** - Mucosa de rato após adição de microesferas, incubação e lavagem com solução salina pH 5,0

LIU *et al.* (2005) utilizaram microesferas de carbopol contendo amoxicilina para estudar a mucoadesão quantitativamente *in vitro* e *in vivo*. Eles verificaram que  $93,5 \pm 2,4\%$  das microesferas permaneceram no estômago após serem lavadas com solução salina/HCl pH 1,3, fluxo 22 mL/min por 5 minutos, indicando que as microesferas contendo carbopol aderem fortemente à mucosa gástrica. Apesar de termos afirmado anteriormente que aproximadamente 60% das nossas microesferas permaneceram no estômago após lavagem com solução salina pH 1,2 ou 5,0, o nosso estudo de mucoadesão foi preliminar, ele não foi quantitativo.

No presente trabalho, desenvolveu-se e avaliou-se um novo produto tecnológico, microesferas mucoadesivas de claritromicina, com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica do tratamento do *Helicobacter pylori* através da redução da dose empregada no tratamento, o que leva a uma maior adesão do paciente, e um maior tempo de contato e de residência do antimicrobiano na mucosa gástrica, com conseqüente erradicação das doenças gastroduodenais causadas por esse microrganismo.

Também nesse sentido, diversos outros estudos foram feitos. NAGAHARA *et al* (1998) desenvolveram microesferas mucoadesivas contendo amoxicilina utilizando carboxivinil e curdlan (um polissacarídeo) como polímeros. 47% das microesferas permaneceram aderidas à mucosa do estômago após 2 horas e 20% após 4 horas. HEJAZI & AMIJI (2003; 2004) desenvolveram vários estudos utilizando quitosanas como polímero mucoadesivo associado à crosslinking e tetraciclina como fármaco. Os resultados em animais demonstraram que não ocorreu um tempo prolongado de residência gastrintestinal sendo que o perfil de concentração de tetraciclina no estômago após administração das microesferas foi similar à solução aquosa de tetraciclina. Em um outro estudo, eles utilizaram glioxal como crosslinking e quitosanas. As propriedades de mucoadesão melhoraram e as microesferas ficaram mais resistentes ao suco gástrico sendo que 10% delas permaneceram no estômago dos animais em jejum por 10 horas depois da administração. O perfil de concentração de tetraciclina foi maior no estômago contendo microesferas produzidas com glioxal que em solução aquosa e em microesferas sem crosslinking. Alguns grupos de pesquisadores têm produzido

microesferas ligadas covalentemente a lecitinas com objetivo de obter uma mucoadesão específica. As lecitinas são capazes de se ligar a carboidratos com considerável especificidade (BARDONNET *et al.*, 2006). EZPELETA *et al.* (1999) produziram nanopartículas de gliadina conjugada com lecitina e MONTICI *et al.* (2001) produziram micropartículas e nanopartículas conjugadas com lecitina. Os resultados apresentaram boa adesão *in vitro*, porém, sabe-se que *in vivo* as lecitinas se ligam ao muco o qual é constantemente eliminado devido ao fluxo peristáltico (BARDONNET *et al.*, 2006). Também MAJITHIYA & MURTHY (2005) desenvolveram microesferas de quitosanas contendo claritromicina pelo método de emulsificação e utilizando glutaraldeído como agente formador de ligações cruzadas. O tamanho das partículas foi dependente da formulação utilizada e variou de 42 a 71,5  $\mu\text{m}$ . A razão droga/polímero utilizada também alterou as taxas de mucoadesão e de droga encapsulada. Além disso, o volume do agente reticulante e o tempo de agitação interferiram na força de adesão, provavelmente devido à diminuição da disponibilidade de grupos amino e hidroxilas livres da molécula de quitosanas para interagir com a membrana celular. Os testes de liberação foram realizados utilizando apenas duas formulações e observou-se que com o aumento da taxa de crosslinking a taxa de liberação da droga foi menor sendo esse fato devido ao aumento da densidade da matriz das microesferas resultando numa diminuição da permeabilidade do soluto. Todas as formulações liberaram 50% da droga encapsulada em 2 horas depois da qual a liberação foi lenta. CHUN *et al.* (2005) desenvolveram microesferas mucoadesivas contendo claritromicina ou amoxicilina preparadas através de complexação entre polímero de ácido poliacrílico (PAA) e polivinilpirrolidona (PVP) pelo método de difusão do solvente. A eficiência de encapsulação da amoxicilina foi de 57,5% e da claritromicina foi de 93,5% devido a maior interação de claritromicina com PAA. As microesferas apresentaram forma esférica, superfície lisa e tamanho de 62,7  $\mu\text{m}$  para amoxicilina e de 65,4  $\mu\text{m}$  para claritromicina. Em pH 2 a quantidade total de claritromicina liberada inicialmente aumentou com o tempo e depois diminuiu. A diminuição no perfil de liberação foi devido à degradação que ocorreu em baixo pH. A taxa de liberação inicial dominou a taxa de degradação, mas, depois

ocorreu o inverso. O perfil de liberação de claritromicina começou a diminuir uma hora após o estudo de liberação. Quando o pH do meio aumentou, a liberação de claritromicina também aumentou devido à dissolução da matriz de PAA/PVP.

Estudos prévios sobre polímeros mucoadesivos de ácidos poliacrílicos têm sugerido a importância de grupos carboxílicos não ionizados no processo de mucoadesão. O pka do carbopol 934P é igual a 5,79 (MORTAZAVI, 1995) e acima desse ponto, os grupos carboxílicos são ionizados em uma maior extensão, reduzindo as ligações de hidrogênio (LUBRIZOL CORPORATION, 2002). Carbopol 934P pode formar ligações de hidrogênio no estado não ionizado com grupos aceptores de prótons como os grupos hidroxila, portanto, é possível que ele possa formar ligações de hidrogênio com os constituintes do gel mucoso carregado negativamente. Em meio gástrico com  $\text{pH} \leq 5$ , uma quantidade menor que 10% dos grupos carboxílicos do carbopol estarão ionizados. Nessas condições, as ligações de hidrogênio com os polissacarídeos ou as proteínas da mucina é provavelmente o principal mecanismo de bioadesão. LIU *et al.* (2005) desenvolveram microesferas mucoadesivas contendo etilcelulose como matriz e carbopol 934 P como polímero mucoadesivo utilizando o método de evaporação e emulsificação. Eles demonstraram que a amoxicilina livre foi rapidamente degradada em meio ácido, entretanto amoxicilina encapsulada nas microesferas ficaram protegidas da degradação. O teste de liberação *in vitro* revelou que aproximadamente 90% da droga foi liberada em pH 1 dentro de 4 horas enquanto que no teste de liberação *in vivo* durante o mesmo tempo, 63,6% das microesferas ainda permaneceram no estômago. Após administração de dosagem única, as microesferas mucoadesivas contendo amoxicilina produziram melhor eficácia que quando foi utilizado amoxicilina em forma de pó.

Para a realização desse nosso trabalho, primeiramente, nós validamos a metodologia de dosagem da claritromicina por CLAE. Em seguida, microesferas de claritromicina foram desenvolvidas e caracterizadas. Depois, estudos de liberação em um meio gástrico simulado contendo leite (MGSL), recentemente proposto (JANTATRID *et al.*, 2008), foram realizados após 2 e 4 horas de incubação no MGSL. Por fim, um estudo preliminar de mucoadesão *in vitro* foi

realizado. Sem dúvida alguma a maior dificuldade no desenvolvimento ocorreu na primeira fase do trabalho, validação da metodologia de dosagem da claritromicina por CLAE. Estudos posteriores *in vitro* e *in vivo* serão realizados com o objetivo de melhor compreender o fenômeno de mucoadesão, assim como, o real potencial desse sistema em erradicar o *H. pylori*.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O método cromatográfico desenvolvido atendeu satisfatoriamente a necessidade do estudo realizado, apesar de ter apresentado limitações para o doseamento da claritromicina durante os testes de liberação *in vitro* devido à linearidade da curva analítica ser somente para concentrações mais elevadas. O método espectrofotométrico adotado para realização destes testes de liberação *in vitro* indicou resultados que possibilitaram o doseamento da claritromicina liberada, mas, sugere-se a necessidade do desenvolvimento futuro de métodos aplicáveis a este aspecto visando a determinação de índices mais seguros de pequenas concentrações de claritromicina liberada.

O encapsulamento de claritromicina em microesferas mucoadesiva é uma alternativa interessante para o tratamento de *H. pylori*. Utilizando etilcelulose, um polímero biocompatível e de baixo custo, associado ao carbopol, um polímero mucoadesivo, foi possível obter microesferas mucoadesivas para utilização em meio ácido. Para uma continuidade do desenvolvimento dos trabalhos há espaço para se estudar a influência de variáveis no processo de preparação dessas microesferas, com o objetivo de otimizar o processo, e talvez, a encapsulação simultânea de dois fármacos diferentes.

As microesferas mostraram-se capazes de liberar o fármaco por um período de tempo prolongado em um meio líquido simulado gástrico que reproduz adequadamente a composição do fluido gástrico. Desenvolvimentos futuros poderão avaliar com maior profundidade as características do perfil de liberação de claritromicina nesse meio utilizando essas microesferas, e, a partir dos resultados obtidos otimizar o processo de produção das microesferas.

As microesferas aderiram à mucosa gástrica durante o teste de mucoadesão *in vitro*. Como perspectiva para que o sistema mucoadesivo comprove seu potencial de mucoadesão gástrica, estudos *in vivo* detalhados devem ser realizados para a continuidade dos estudos para a erradicação do *H. pylori*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHFS Drug Information - Beths American Society of Health - System Pharmacicts, p.293, 2000.

AKIYAMA, Y.; NAGAHARA, N.; KASHIHARA, T.; HIRAI, S.; TOGUCHI, H. In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres prepared for the gastrointestinal tract using polyglycerol esters of fatty acids and a poly(acrylic acid) derivative. *Pharmaceutical Research*, v.12, n.3, p. 397-405, 1995.

ALGOOD, H.M.S.; COVER, T.L. Helicobacter pylori persistence: an overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 4, p. 597-613, 2006.

AMIEVA, M.R.; EL-OMAR, E.M. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology*, v. 134, p.306-323, 2008.

BAJPAI, S.K.; TANKHIWALE, R.; Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Parte II. *Reactive & Functional Polymers*, v. 66, p. 1565-1574, 2006.

BANSIL, R.; TURNER, B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 11, p. 164-170, 2006.

BARDONNET, P.L.; FAIVRE, V.; PUGH, W.J.; PIFFARETTI, J.C.; FALSON F. Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of Helicobacter pylori. *Journal of Controlled Release*, v. 111, p. 1-18, 2006.

BARROCAS, P.M.C.; SANTOS, D.F.G.; FERREIRA, D.C.; COELHO, P.M.B.S.; OLIVEIRA, R.C.S.; VEIGA, F.J.B. Sistemas farmacêuticos gastrorretentivos flutuantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, n.3, p. 325-334, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 junho; 2003.

CHEY, W.D.; WONG, B.C.Y.; and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of Helicobacter pylori Infection. *American Journal of Gastroenterology*, v. 102, p. 1808-1825, 2007.

CHING, A.L.; LIEW, C.V.; CHAN, L.W.; Impact of cross-linker on alginate matrix integrity and drug release. *International Journal of pharmaceutics*, v. 355, p. 259-268, 2008.

CHU, S.-Y.; DEATON, R.; CAVANAUGH J. Absolute bioavailability of clarithromycin after oral administration in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 5, p. 1147-1150, 1992a.

CHU, S.-Y.; SENNELLO, L.T.; BUNNELL, S.T.; VARGA, L.L.; WILSON, D.S.; SONNERS, R.C. Pharmacokinetics of clarithromycin, a New macrolide, after single ascending oral doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n.11, p. 2447-2453, 1992b.

CHU, S.-Y.; PARK, Y.; LOCKE, C.; WILSON, D.S.; CAVANAUGH, J.C. Drug – food Interaction Potential of clarithromycin, a new macrolide antimicrobial. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 32, p. 32-36, 1992c.

CHUN, M.; SAH, H.; CHOI, H. Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H. pylori*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 297, p. 172-179, 2005.

COELHO, L.G.V.; ZATERKA, S. Second Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 42, n. 2, p. 1-11, 2005.

COELHO, L.G.V.; MATTOS, A.A.; FRANCISCONI, C.F.M.; CASTRO, L.P.; ANDRE, S.B. Eficácia do regime terapêutico empregando a associação de pantoprazol, claritromicina e amoxicilina durante uma semana na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera péptica. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.41, n.1, p. 71-76, 2004.

CONWAY, B.R. Drug delivery strategies for the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, 775 -790, 2005.

CUÑA, M.; ALONSO, M.J.; TORRES, D.; Preparation and in vivo evaluation of mucoadhesive microparticles containing amoxicillin-resin complexes for drug delivery to the gastric mucosa. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 51, p. 199-205, 2001.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

ERAH, P.O.; GODDARD, A.F.; BARRET D.A.; SHAW P.N.; SPILLER R.C. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 39, n.1, p. 5-12, 1997.

EZPELETA, I.; ARANGO, M.A.; IRACHE, J.M.; STAINMESSE, S.; CHABENAT, C.; POPINEAU, Y.; ORECCHIONI, A.-M. Preparation of *ulex europaeus* lectin-

gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 191, n.1, p. 25-32, 1999.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4a edição, p. 225, 2003.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 1-18, 2004.

FOX J.G.; WANG, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 1, p. 60 – 69, 2007.

GAN, V.N.; CHU S.-y.; KUSMIESZ H.T.; CRAFT, J.C. Pharmacokinetics of a clarithromycin suspension in infants and children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 11, p. 2478-2480, 1992.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, F.S.; Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 267-285, 1998.

GRUBEL, P.; CAVE, D.R. Factors affecting solubility and penetration of clarithromycin through gastric mucus. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 12, p. 569-576, 1998.

GUIDANCE FOR INDUSTRY: Bioanalytical method validation. Disponível em: [www.fda.gov/cder/guidance/inex.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/inex.htm). Revisado em maio/2001.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Stomach-specific anti-H.pylori therapy. I: Preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 235, p. 87-94, 2002.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 151-165, 2003.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Stomach-specific anti-H.pylori therapy part III : Effect of chitosan microspheres crosslinking on the gastric residence and local tetracycline concentrations in fasted gerbils. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 272, p. 99-108, 2004.

HONG, Z.; CHASAN, B.; BANSIL, R.; TURNER, B.S.; BHASKAR, K. R.; AFDHAL, N. H. Atomic Force Microscopy Reveals Aggregation of Gastric Mucin at Low pH. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 3458-3466, 2005.

HOU, S.Y.E.; COWLES, V. E.; BERNER, B. Gastric retentive dosage forms: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 20, n. 6, p. 461-497, 2003.

JACKSON S.J.; BUSH, D.; WASHINGTON, N.; PERKINS, A.C. Effect of resin surface charge on gastric mucoadhesion and residence of cholestyramine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 205, p. 173-181, 2000.

JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 7, p. 1663-1676, 2008.

KANFER, I.; SKINNER, M. F.; WALKER, R. B. W. Analysis of macrolide antibiotics; *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 255-286, 1998.

KLEINMAN, R.E. Protection of the gastrointestinal tract epithelium against damage from low pH beverages. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 7, p. 99 - 105, 2008.

KODAIRA, M.S.; ESCOBAR, A.M.U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 3, p. 356-369, 2002.

KONG, F.; SINGH, R.P. Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 5, p. 67- 80, 2008.

LABENS, J.; Current role of acid suppressants in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, n. 3, v. 15, p. 413-431, 2001.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADOR, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Gastroenterology*, v. 135, p. 41-60, 2008.

LEUNG, S.H.S. LEUNG, ROBSON, J.R. Polymer structure features contributing to mucoadhesion II. *Journal of Controlled Release*, v. 12, p. 187-194, 1990.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, p. 26-39, 2008.

LIU, Z.; LU, W.; QIAN, L.; ZHANG, X.; ZENG, P.; PAN, J. In vitro and in vivo studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 135-144, 2005.

LUBRIZOL Advanced Materials. Toxicity of Carbopol Polymers As A Class. Lubrizol Advanced Materials, Technical data sheet, 2007.

LUBRIZOL Advanced Materials. Noveon, bulletin 16: Bioadhesion, Technical data sheet, 2002.

MAJITHIYA, R.J.; MURTHY, R.S.R. Chitosan-Based Mucoadhesive Microspheres of clarithromycin as a delivery system for antibiotic to stomach. *Current Drug Delivery*, v. 2, p. 235-242, 2005.

MALATY, H.M. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 21, n. 2, p. 205-214, 2007.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. Clarke's, Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, 3<sup>o</sup> ed., p. 814-815, 2004.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; BAZZOLI, F.; EL-OMAR, E.; GRAHAM, D.; HUNT, R.; ROKKAS, T.; VAKIL, N.; KUIPERS, E.J.; The European Helicobacter study Group (EHSg). Current concepts in management of Helicobacter pylori infection: The Maastricht III Consensus Report. *Gut*, v. 56, p. 772-781, 2007.

MONTISCI, M.; GIOVANNUCI, G.; DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G.; Covalent coupling of asparagus pea and tomato lectins to poly(lactide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 215, p. 153-161, 2001.

MORTAZAVI, S.A. An in vitro assessment of mucus/mucoadhesive interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 124, p. 173-182, 1995.

MORGAN, D.; CUGIER, P.; MARELLO, B.; SAROCKA, C.; STROZ, D.; Plaszczyca A. Impurity profiling of clarithromycin using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, v. 502, p. 351-358, 1990.

MORGAN, D.K.; BROWN, D.M.; ROTSCH, T.D.; PLASZ, A.C. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination and identification of clarithromycin as the drug substance and in various dosage forms. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v. 9, n. 3, p. 261-269, 1991.

NAGAHARA, N.; AKIYAMA, Y.; NAKAO, M.; TADA, M.; KITANO, M.; OGAWA, Y. Mucoadhesive microspheres containing amoxicillin for clearance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n.10, p. 2492-2494, 1998.

NAKAGAWA, Y.; ITAI, S.; YOSHIDA, T.; NAGAI T. Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 3, p. 725-728, 1992.

NAKANISHI, T.; KAIHO, F.; HAYASHI, M. Improvement of drug release rate from carbopol 934P formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 46, n. 1, p. 171-173, 1998.

NEAU, S.H.; CHOW, M.Y.; DURRANI, M.J. Fabrication and Characterization of extruded and spheronized beads containing carbopol 974P, NF resin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 131, p. 47-55, 1996.

O' DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.28, p. 25-42, 1997.

PEPPAS, N.A.; HUANG, Y. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1675-1687, 2004.

PEPPAS, N.A.; BURI, P.A.; Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *Journal of Controlled Release*, v. 2, p. 257-275, 1985.

POHL, D.; FOX, M.; FRIED, M.; GOKE, B.; PRINZ, C.; MONNIKES, H.; ROGLER, G.; DAUER, M.; KELLER, J.; LIPPL, F.; SCHIEFKE, I.; SEIDLER, U.; ALLESCHER, H. D. Do we need gastric acid? *Digestion*, v. 77, p. 184-197, 2008.

RAMTEKES, S.; JAIN, NK. Clarithromycin - and omeprazole - containing gliadin nanoparticles for the treatment of Helicobacter pylori. *Journal Drug Targeting*, v 16, n. 1, p. 65-72, 2008.

RAMTEKES, S.; MAHESHWARI, R.B.U.; JAIN, NK.; Clarithromycin based oral sustained release nanoparticulate drug delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68, n. 4, p. 479 - 484, 2006.

RANGA RAO, V.K.; BURI, P. A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.52, p. 265-270, 1989.

RODVOLD, K. A. Clinical pharmacokinetics of clarithromycin. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 37, n. 5, p. 385 a 398, 1999.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1666-1691, 2005.

SCARPIGNATO, C. Towards the ideal regimen for Helicobacter pylori eradication: The search continues. *Digestive and Liver Disease*, v. 36, p. 243-247, 2004.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, doi: 10.1016/j.ejpd.2008.09.022, 2008.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M.; SINGH, A. Potential Applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: A review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n. 9, p. 913-924, 2000.

SMART, J.D. The basis and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

STADE, E.K. Discovery by Jaworki of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 54, n. 3, p. 23-41, 2003.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA; The national formulary – Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 29<sup>o</sup> edição, p. 527, 2006a.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA; The national formulary – Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 29<sup>o</sup> edição, p. 3293, 2006b.

VAKIL, N.; MEGRAUD, F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, v. 133, p. 985-1001, 2007.

VARUM, F.J.O.; MCCONNELL, E.L.; SOUZA, J.J.S.; VEIGA, F.; BASIT, A.W.; Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 25, n. 3, p. 207-258, 2008.

VASIR, J.K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *International journal of Pharmaceutics*, v. 255, p. 13-32, 2003.

VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.; BUTLER, J., HEMPENSTALL, J.; REPPAS, C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 413-417, 2005.

WADE, A.; WELLER, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. The American Pharmaceutical Association, p. 71, 2 ed., 1994a.

WADE, A.; WELLER, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. The American Pharmaceutical Association, p. 186, 2 ed., 1994b.

WOLLE, K.; MALFERTHEINER, P. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Practice & Research*, v. 21, n. 2, p.315-324, 2007.