UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Microencapsulação do sulfóxido de albendazol: uma estratégia
para otimização da terapia das parasitoses**

Marina Claro de Souza

Ribeirão Preto

- 2009 -

foram obtidos os resultados esperados, tendo sido possível sustentar a liberação do fármaco por várias horas.

Esposito et al. (2002) prepararam micropartículas de Eudragit® e vitamina C para administração por via oral, utilizando diversos polímeros acrílicos, incluindo um polímero pH-dependente, utilizado em formulações gastrorresistentes, em diferentes razões polímero:fármaco. As partículas obtidas foram capazes de sustentar a liberação da vitamina C por pelo menos 3 horas, comprovando que estes polímeros podem ser utilizados de maneira eficaz na preparação de sistemas microparticulados para veiculação do referido fármaco por via oral.

Kristmundsdóttir, Gudmundsson e Ingvarsdóttir (1996) desenvolveram e avaliaram comparativamente microesferas (sistema matricial) e microcápsulas (sistema reservatório) de cloridrato de diltiazem produzidas pela técnica de spray-drying utilizando polímeros Eudragit®. Em todos os casos foram obtidas partículas com estreita faixa de distribuição de tamanho, com diâmetro médio inferior a 10µm. O estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas constatou que foi possível sustentar a liberação do cloridrato de diltiazem em todas as partículas produzidas. Verificou-se, ainda, que a velocidade e a extensão da liberação são influenciadas pela natureza do polímero utilizado, assim como pela estrutura da micropartícula obtida (matriz ou reservatório).

Atualmente, já se encontram disponíveis no mercado alguns medicamentos produzidos utilizando-se a técnica de microencapsulação por spray-drying, como, por exemplo, o peptídeo acetato de buserelina (Suprecur MP®), comercializado no Japão pela empresa Mochida Pharmaceutical Co. (licenciada da Aventis) para o tratamento de endometriose e mioma uterino (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

1.2.2. Microencapsulação pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente

A técnica de obtenção de micro e nanopartículas por emulsificação / evaporação de solvente é uma técnica clássica e amplamente utilizada, sendo composta por duas etapas. Em linhas gerais, inicialmente, uma solução polimérica é emulsionada com uma fase aquosa. Em um segundo passo, o solvente é evaporado, promovendo a precipitação do polímero, levando à formação de micro ou nanoesferas (REIS et al., 2006).

Neste tipo de processo, uma solução orgânica contendo o polímero é gotejada sobre uma solução aquosa contendo um tensoativo, sob alta rotação, ocorrendo a formação de uma emulsão (TICE; GILLEY, 1985). A subsequente evaporação do solvente, realizada através de rotaevaporação, pressão reduzida ou por agitação contínua, promove a precipitação do polímero na forma de uma fina matriz, capaz de aprisionar partículas de fármaco em sua estrutura, dando origem a micro ou nanoesferas (SOPPIMATH et al., 2001).

De acordo com Cleland et al. (1997), muitos parâmetros podem influenciar o processo de microencapsulação por emulsificação / evaporação de solvente em suas diversas etapas, tais como:

- x Etapas de emulsificação: composição e concentração do polímero, composição e volume da fase orgânica, volume da fase aquosa, velocidade e tempo de agitação, tipo de agitador (sonicador ou homogeneizador).
- x Etapas de evaporação do solvente: taxa de remoção, tipo de agitação, temperatura.
- x Etapas de secagem: método e tempo de secagem, quantidade de umidade residual.

Quando o fármaco utilizado é lipossolúvel, este é dissolvido na solução orgânica, juntamente com o polímero. Quando se trata de um fármaco hidrossolúvel, o mesmo pode ser incorporado à solução aquosa.

Vários estudos foram realizados utilizando diversos copolímeros de acrilato-metacrilato (Eudragit®) na preparação de micropartículas obtidas pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente.

Raffin et al. (2008) prepararam micropartículas de pantoprazol sódico e Eudragit® pelas técnicas de emulsificação / evaporação de solvente e spray-drying, com o objetivo de melhorar a fotoestabilidade do referido fármaco. Na forma sólida, a concentração de pantoprazol pura foi reduzida a 27% da quantidade inicial após 10 dias de exposição à luz. Nos sistemas microencapsulados, a quantidade de fármaco que permaneceu estável após o mesmo período de exposição foi de 56% e 44% para as partículas obtidas pelas técnicas de emulsificação / evaporação de solvente e spray-drying, respectivamente.

Babak et al. (2007) avaliaram a estabilidade e a capacidade emulsionante de diversos polímeros hidrofóbicos biocompatíveis, entre eles, dois tipos de Eudragit®, na preparação de micropartículas pela técnica de emulsificação / evaporação de

solvente. O estudo revelou que os polímeros acrílicos apresentam melhores propriedades emulsionantes do que os outros polímeros testados (ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) e policaprolactona), sugerindo que o processo de microencapsulação pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente utilizando tais polímeros poderia ser realizada sem o emprego de agentes emulsionantes.

Meissner, Pellequer e Lamprecht (2006) prepararam nanopartículas de tacrolimus e dos polímeros PLGA e Eudragit® pH-dependente a serem utilizadas em formulações orais para o tratamento de doença retal inflamatória, com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais causados pela administração deste fármaco, especialmente a nefrotoxicidade. Em estudos in vivo realizados em camundongos, as partículas obtidas foram capazes de reduzir o processo inflamatório a níveis inferiores aos obtidos por soluções orais. Verificou-se, ainda, que não houve diferenças estatísticas significativas entre os níveis séricos de creatinina e uréia dos animais tratados com as nanopartículas e dos animais do grupo controle.

Lamprecht et al. (2003) desenvolveram micropartículas para liberação colônica de 5-fluoruracil e Eudragit® pH-dependente para o tratamento de câncer de cólon pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente. Estudos in vitro do perfil de liberação confirmaram a liberação pH-dependente do fármaco, sugerindo que tal sistema poderia ser utilizado no tratamento da referida doença pela via oral, após realização de estudos in vivo.

Watts et al. (1991) prepararam micropartículas de sulfasalazina e Eudragit® adicionadas de um marcador radioativo, com o objetivo de estudar o comportamento de sistemas de liberação sustentada na região do cólon por gamacintilografia. Os estudos demonstraram que o marcador radioativo pode ser incorporado às micropartículas com sucesso, sem promover nenhum tipo de alteração nas propriedades físicas das mesmas.

Como exemplos de medicamentos produzidos através da utilização da técnica de emulsificação / evaporação de solvente disponíveis para comercialização pode-se citar: naltrexona (Vivitrol®), comercializada pela Cephalon, para o tratamento de dependência de álcool; risperidona (Risperdal®), comercializada pela Janssen-Cilag, utilizada para o tratamento da esquizofrenia (WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

1.3. O problema das parasitoses

As infecções causadas por helmintos constituem-se em um grave problema sanitário, tanto para os seres humanos quanto para os animais, gerando também grandes prejuízos econômicos (LARA, 2003). Na medicina veterinária, estes agentes constituem-se nos maiores entraves para a produtividade e o bem-estar animal. Como exemplos dos prejuízos causados, podemos citar: nematódeos como *Haemonchus* (no caso de ruminantes) e ancilostomídeos (em várias espécies), que provocam espoliação sanguínea, pelo hematofagismo, gerando um quadro de anemia, podendo, inclusive, levar os animais à morte. Além dos custos relacionados diretamente às parasitoses, há outros, indiretos, que compreendem os dispêndios com o controle destes organismos, o aumento do consumo de produtos químicos e os custos com mão-de-obra (ANDRADE, 2002).

Muitos parasitos têm visível importância para a saúde pública, devido a seu elevado potencial zoonótico, tais como os nematódeos *Toxocara canis* e *Ancylostoma braziliensis*, causadores de larva migrans, e os protozoários *Cryptosporidium*, *Leishmania* e *Toxoplasma* (ANDRADE, 2002).

Merecem destaque ainda os parasitos do gênero *Taenia*, especialmente a *T. solium*, causadora da cisticercose, doença que acomete largamente tanto seres humanos quanto animais. *Cysticercus cellulosae*, o estágio larval do cestódeo *T. solium*, é o responsável por causar a neurocisticercose, doença em que ocorre o encistamento da referida larva no sistema nervoso central (ZHENG et al., 2007), causando notáveis danos à saúde, podendo, inclusive, levar o indivíduo à morte. A cisticercose é um sério problema de saúde pública que afeta muitos seres humanos em diversos países em desenvolvimento, tendo sido reportados também alguns casos em países desenvolvidos (SCIUTTO et al., 2000).

1.4. Sulfóxido de albendazol

Os quimioterápicos classificados como medicamentos antihelmínticos são usados no controle dos endoparasitos nematódeos, cestódeos e trematódeos, localizados nos órgãos e tecidos de eleição dos animais (LARA, 2003). A administração nos animais pode ser realizada vias oral, parenteral (intramuscular ou subcutânea) e tópica (pour-on) (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2002).

O sulfóxido de albendazol, ou ricobendazol, quimicamente chamado de metil-5-(propilsulfinil)-2-benzimidazolcarbamato (Figura 3), é um fármaco antiparasitário de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis. Os benzimidazóis são largamente utilizados nas medicinas veterinária e humana para a prevenção e o tratamento de doenças parasitárias.

Figura 3. Estrutura química do sulfóxido de albendazol

Além de seu amplo espectro de ação, possuem como vantagem o fato de apresentarem baixa toxicidade aos hospedeiros quando comparados a outros fármacos antiparasitários (WU et al., 2005; GOUDAH, 2003; MOTTIER; ALVAREZ; LANUSSE, 2003). Agem sobre os parasitos impedindo a síntese de microtúbulos, pela inibição da α -tubulina, interrompendo, assim, processos vitais para a função celular, como a divisão mitótica, o transporte de nutrientes e alterações na forma celular. Além disso, interferem no metabolismo energético do parasito, através da inibição da enzima fumarato redutase nas reações mitocondriais, bloqueando, assim, a via metabólica respiratória do parasito, que utiliza carboidratos, principalmente glicose, para a produção de adenosina trifosfato (ATP) (ANDRADE, 2002; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2002).

Os compostos benzimidazólicos são altamente eficazes contra vermes pulmonares, sendo também capazes de inibir os estágios larvais da maioria dos nematódeos gastrintestinais (LANUSSE; PRICHARD, 1993).

O sulfóxido de albendazol é um fármaco praticamente insolúvel em água, também pouco solúvel em solventes hidromiscíveis, como etanol e propilenoglicol. Usualmente, é administrado na concentração de 7,5mg/kg, apresentando biodisponibilidade entre 36,8 – 40,5% (WU et al., 2005). Os benzimidazóis são bases fracas, apresentando pK_a que varia entre 6,8 e 7,8 (FORMENTINI; MESTORINO; ERRECALDE, 2001).

O sulfóxido de albendazol é utilizado para o controle de verminoses causadas pelos nematódeos, cestódeos e trematódeos que infestam os ruminantes. Apresenta atividade contra parasitos de infecções pulmonares e gastrintestinais, podendo atuar sobre formas adultas, larvais (inclusive hipobióticas) e ovos, tendo, assim, ação sobre as três fases do ciclo de vida dos parasitos. Nos ruminantes, é indicado no tratamento das parasitoses causadas por: *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Trichonstrongylus* spp., *Dictyoocaulus* spp., *Bunostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Trichuris* spp., *Geygeria* sp., *Strongyloides* spp., *Moniezia* spp., *Capillaria* spp. *Fasciola* sp. e *Taenia* sp. (COMPÊNDIO VETERINÁRIO, 2006).

Goudah (2003) verificou que a eficácia do sulfóxido de albendazol é diretamente ligada a seu tempo de permanência na corrente sanguínea. Uma maior permanência do fármaco no sangue aumenta as chances de que tecidos de difícil acesso sejam atingidos, de modo a eliminar os parasitos que aí residem. Tal fato mostra a importância do desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada para este fármaco.

2. Objetivos

O presente trabalho teve com objetivos:

- x Desenvolver um sistema microparticulado, com aplicação na medicina veterinária, para liberação sustentada de sulfóxido de albendazol.
- x Desenvolver e validar uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do fármaco estudado.
- x Caracterizar morfologicamente o sistema obtido, utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica de varredura e análise por espalhamento de luz.
- x Realizar estudos in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas obtidas.

3. Material e métodos

A matéria-prima de sulfóxido de albendazol grau farmacêutico (lote: FSA.06.03.003.023) foi fornecida pela empresa Formil, divisão Farmoquímicos.

O polímero Eudragit RS 30 D[®] (Degussa Rohm Pharma Polymers, lote: G070618098) foi fornecido pela empresa Almapal S.A.

O polímero Eudragit RS PO[®] (Degussa Rohm Pharma Polymers, lote: G050738096) foi fornecido pela empresa Laboratórios Pfizer Ltda.

3.1. Reagentes

- x Fosfato de Sódio Dibásico Dihidratado PA (lote: 013705 - Vetec)
- x Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado PA (lote: 91107 - Synth)
- x Cloreto de Sódio PA (lote: 59191 - Synth)
- x Polissorbato 80 (Tween 80) USP (lote: 83971- Synth)
- x Acetonitrila grau cromatográfico (lote: C03C51 - J.T.Baker)
- x Etanol Absoluto grau cromatográfico (lote: B42C51 - J.T.Baker)
- x Dietilamina Pura (lote: 61005 - Synth)
- x Ácido Perclórico 70% PA (lote: K2913792 - Merck)
- x Ácido Fosfórico 85% PA (lote: K2747273 - Merck)
- x Metanol grau cromatográfico (lote: C5093 - Burdick & Jackson)
- x Óleo de Mamona Polietoxilado (Cremophor EL[®]) (lote: C06539 - Basf)
- x Propilenoglicol PA (lote: 96968 - Synth)
- x Diclorometano PA (lote: 23945, Quimex)
- x Álcool Polivinílico PS (lote: 07609KE, Sigma-Aldrich)
- x Álcool Benzílico PA (lote: 050773, Vetec)

3.2. Equipamentos

- x Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba peristáltica modelo LC-10AD, detector de UV-Vis modelo SPD-10A e integrador modelo C-R6A
- x Potenciômetro digital Digimed, modelo DM-20
- x Bomba de vácuo Fisatom, modelo 820
- x Banho ultrassônico Thornton, modelo T14

- x Sistema de purificação de Água Milli-Q Plus – Millipore Corporation
- x Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer, sensibilidade: 0,0001g
- x Balança de precisão Marte, modelo AS2000C, sensibilidade: 0,5g
- x Agitador magnético Marte, modelo MAG15
- x Dissolutor Hanson, modelo SR8 Plus
- x Espectrofotômetro UV-Vis Femto, modelo 800XI
- x Spray-dryer Lemarq, modelo MSD 0.5
- x Agitador de alta velocidade Ultra-Turrax Ika, modelo T25 Basic
- x Centrífuga Hettich, modelo Rotofix 32
- x Liofilizador Liobrás, modelo L101
- x Moinho de bola MLW, modelo KM1
- x Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810 F
- x Analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ
- x Microscópio óptico Zeiss, modelo Axioplan 2 Imaging
- x Rotaevaporador Ika Werke, modelo RV 05-ST
- x Analisador de partículas por difração a laser Beckman Coulter, modelo LS 13 320

3.3. Colunas cromatográficas

- x Lichrospher 100[®] RP18 4,0 x 150mm, 5µm (Merck)
- x Purospher Star[®] RP18 4,0 x 250mm, 5µm (Merck)
- x Coluna de guarda RP18 4,0 x 4,0mm, 5µm (Merck)

3.4. Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método analítico baseou-se inicialmente no método descrito por Sarin, Dash e Dua (2004), no qual o sulfóxido de albendazol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa.

Foram pesados exatamente 10,0mg do fármaco e solubilizados em 100mL de metanol. Uma alíquota de 4,0mL foi retirada e diluída para 10,0mL com metanol, resultando em uma concentração final de 0,04mg/mL. O volume de injeção utilizado foi de 20µL.

O comprimento de onda sugerido no método foi confirmado como sendo o ideal através de uma varredura espectroscópica entre 190nm e 450nm.

A princípio, foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ de dimensões 4,0 x 150mm. A Tabela 1 resume as condições analíticas testadas:

Tabela 1 - Condições cromatográficas testadas utilizando-se a coluna Lichrospher 100[®] RP18 4,0 x 150mm (Merck)

Componentes da fase móvel (mL)				Vazão (mL/min)
Acetonitrila (AcN)	Água (H ₂ O)	Dietilamina (DEA)	Ácido Perclórico (HClO ₄)	
20,0	80,0	-----	0,04	0,8
20,0	80,0	-----	0,04	1,0
20,00	80,00	0,1	0,04	0,8
15,00	85,00	0,1	0,04	1,2
15,00	85,00	0,2	0,08	1,2
15,00	85,00	0,2	0,08	1,0

Foi utilizada também a coluna cromatográfica Purospher Star[®] RP18 4,0 x 250mm (Merck), tendo com fase móvel a mistura: AcN:H₂O:HClO₄:DEA (15:85:0,08:0,2). O valor de pH da fase móvel foi 2,3.

As condições analíticas estabelecidas foram:

- x Fase móvel: AcN:H₂O:HClO₄:DEA (15:85:0,08:0,2) (pH #2,3)
- x Vazão: 1,0mL/min
- x Volume de injeção: 20µL
- x Comprimento de onda: 290nm

3.5. Determinação da solubilidade do sulfóxido de albendazol no meio de dissolução a ser utilizado

O meio de dissolução selecionado foi tampão fosfato salino isotônico (PBS) pH 7,4, considerando a administração das micropartículas por via parenteral (formação de depósito subcutâneo).

De acordo com Wu et al. (2005), o sulfóxido de albendazol apresenta solubilidade mínima em pH 7,5 (41,4µg/mL). Sendo assim, foi necessária a adição de agentes solubilizantes.

Para a determinação da solubilidade do fármaco no meio de dissolução selecionado, inicialmente, 2,0mg do fármaco, precisamente pesados, foram adicionados a 100,0mL de PBS pH 7,4 e mantidos sob agitação magnética por 24 horas.

A seguir, foram testadas soluções contendo PBS pH 7,4 e diferentes proporções de polissorbato 80 (Tween 80). As proporções testadas foram: 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%. Estas amostras também foram mantidas sob agitação magnética por 24 horas.

Decorrido este tempo, procedeu-se, então, a adição de etanol absoluto (EtOH) ou propilenoglicol (PPG) às três soluções contendo as menores quantidades de sólidos dispersos, com o objetivo de melhorar a solubilização. As proporções de solvente orgânico testadas foram: 5,0%, 10,0%, 20,0%, 30,0% e 40,0%.

Com base nos estudos realizados conforme descrito acima, foram realizados cinco experimentos para definir as condições experimentais a serem utilizadas no estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas produzidas.

No primeiro experimento, 100,0mg de sulfóxido de albendazol introduzidos em uma membrana de diálise foram colocados em cada uma das cubas do dissolutor e analisados de acordo com as seguintes condições:

- x Volume de meio: 500,0mL
- x Temperatura: 37,0°C
- x Aparato: pá
- x Velocidade rotacional: 50rpm
- x Tempo: 36h

Abaixo, encontram-se os meios de dissolução testados neste primeiro experimento:

- x PBS pH 7,4:EtOH (75:25) acrescido de 2,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:EtOH (70:30) acrescido de 2,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 1,0% de Tween 80

A análise das amostras coletadas foi realizada por CLAE, de acordo com o método descrito no item 3.4. Para a obtenção da solução padrão, preparou-se uma solução estoque do fármaco em metanol, na concentração de 1,0mg/mL, a qual foi diluída nos diversos meios de dissolução testados, resultando em soluções de concentração igual a 0,2mg/mL.

O cálculo da porcentagem dissolvida em cada uma das amostras foi realizado por análise dimensional, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{Dissolvida}_{(t)} = \frac{AA}{AP} \cdot \frac{MP}{DP} \cdot \frac{Pot}{100} \cdot \frac{V}{MA} \cdot 100$$

Em que:

AA = área do pico da amostra

AP = área do pico do padrão

MP = massa do padrão (mg)

DP = diluição do padrão (mL)

Pot = potência do padrão (%)

V = volume de meio de dissolução (mL)

Verificou-se que ocorreu evaporação de uma determinada quantidade de meio após o tempo do estudo. O volume de meio de dissolução restante em cada uma das cubas foi medido e estes valores foram aplicados à fórmula acima para calcular a porcentagem de fármaco dissolvida.

No segundo experimento, foram testados diversos agentes solubilizantes, comparando a solubilidade do sulfóxido de albendazol em EtOH e em PPG. A concentração de fármaco em cada uma das cubas de dissolução foi novamente de 0,2mg/mL. Os meios testados foram:

- x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 1,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 2,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:PPG (70:30)
- x PBS pH 7,4:PPG (70:30) acrescido de 1,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:PPG (70:30) acrescido de 2,0% de Tween 80

As demais condições experimentais utilizadas foram:

- x Volume de meio: 500,0mL
- x Temperatura: 37,0°C
- x Aparato: pá
- x Velocidade rotacional: 100rpm
- x Tempo: 36h

No terceiro experimento realizado, 2,0mg do fármaco foram solubilizados em 100mL de meio. Neste experimento, os meios testados foram:

- x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:PPG (70:30) acrescido de 5,0% de Tween 80
- x PBS pH 7,4:EtOH:PPG (70:15:15) acrescido de 5,0% de Tween 80

Neste experimento, as demais condições de análise foram:

- x Volume de meio: 100,0mL
- x Temperatura: 37,0°C
- x Aparato: mini pá
- x Velocidade rotacional: 100rpm
- x Tempo: 24h
- x Tempos de coleta: 12h, 24h

Em cada uma das coletas, foi retirada uma alíquota de 1,0mL, volume este que foi repostado com meio de dissolução. A porcentagem dissolvida foi calculada por análise dimensional, através da fórmula:

$$\% \text{Dissolvida}_{(t)} = \frac{AA}{AP} \cdot \frac{MP}{DP} \cdot \frac{Pot}{100} \cdot \frac{V}{MA} \cdot (\% \text{Dissolvida}_{(t-1)} \cdot \frac{1}{V}) \cdot 100$$

Em que:

AA = área do pico da amostra

AP = área do pico do padrão

MP = massa do padrão (mg)

DP = diluição do padrão (mL)

Pot = potência do padrão (%)

V = volume de meio de dissolução (mL)

No quarto experimento, realizou-se uma comparação entre os tensoativos Tween 80 e óleo de mamona polietoxilado (Cremophor EL[®]), na concentração de 5,0%:

x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Tween 80

x PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Cremophor EL[®]

As demais condições experimentais foram idênticas às do terceiro experimento, com exceção dos tempos de coleta, correspondendo a 12h, 24h, 36h e 48h.

No quinto experimento, 1,5mg de sulfóxido de albendazol foram adicionados a cada uma das cubas de dissolução contendo 150mL de meio. Neste experimento, o único meio de dissolução empregado foi PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Tween 80, seguindo as condições determinadas no terceiro experimento. As alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo correspondentes a: 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h. Este último experimento teve como objetivo traçar um perfil de dissolução detalhado do sulfóxido de albendazol no meio de dissolução selecionado.

As condições finais para a realização do estudo de solubilidade do sulfóxido de albendazol (as quais posteriormente seriam também utilizadas para o estudo do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas obtidas) foram as seguintes:

- x Meio de dissolução: PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Tween 80
- x Volume de meio: 150,0mL
- x Aparato: mini pá
- x Velocidade rotacional: 100rpm
- x Temperatura: 37,0°C
- x Tempo: 48h
- x Tempos de coleta: 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h.

3.6. Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica foi realizada com base na Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (“Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”), tendo sido utilizada a técnica de padronização externa (ANVISA, 2003).

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido estão sendo atendidos (NBR ISSO/IEC 17025, 2001).

Para a validação do método desenvolvido foram avaliados os parâmetros: linearidade; precisão e exatidão intraensaio (ou repetitividade); precisão e exatidão interensaio (ou precisão intermediária); robustez de fluxo, pH e proporções entre os componentes da fase móvel.

3.6.1. Calibração e linearidade

Preparou-se uma solução estoque contendo exatamente 0,25mg/mL de sulfóxido de albendazol em metanol, a partir da qual foram preparadas soluções nas concentrações de 0,0005mg/mL (0,5µg/mL), 0,0025mg/mL (2,5µg/mL), 0,005mg/mL (5,0µg/mL), 0,0075mg/mL (7,5µg/mL), 0,01mg/mL (10,0µg/mL) e 0,0125mg/mL (12,5µg/mL), as quais foram analisadas em triplicata.

Para a construção da curva de calibração, foram inseridas no eixo das abscissas as concentrações de cada uma das soluções e no eixo das ordenadas os valores de área dos seus respectivos picos.

Para a determinação da linearidade, utilizou-se a curva acima, verificando-se a proporcionalidade da resposta em relação à concentração, através do cálculo do coeficiente de correlação linear (r).

3.6.2. Precisão e exatidão

A precisão do método, medida por meio do coeficiente de variação (CV - %), bem como a exatidão (E - %), foram determinadas através de análises inter e intraensaios.

Para a determinação da precisão e da exatidão intraensaios, ou repetitividade, foram utilizadas três concentrações diferentes (0,5µg/mL, 7,5µg/mL e 12,5µg/mL). Seguindo as mesmas condições de análise, foram analisadas 10 alíquotas de cada uma das concentrações, em um mesmo dia.

Os estudos de exatidão e precisão intermediária (interensaios) foram realizados em cinco dias consecutivos, utilizando-se as mesmas concentrações descritas nos ensaios de repetitividade, as quais foram analisadas em triplicata. Vale lembrar que a curva de calibração foi reanalisada em todos os dias de experimento, em triplicata.

A avaliação da precisão do método foi realizada através da determinação do CV, utilizando-se os gráficos de calibração e as dispersões em relação aos valores médios. O CV pode ser expresso pela fórmula:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Em que:

S = desvio padrão amostral

$\bar{x}$ = média dos valores obtidos

Para o cálculo da exatidão (E), foram utilizadas as concentrações medidas nos experimentos intra e interensaios e também a concentração real das amostras. O valor de E foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$E(\%) = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

3.6.3. Robustez

O teste de robustez da metodologia desenvolvida foi realizado efetuando-se as seguintes variações nas condições analíticas:

- x pH: 2,1; 2,3 e 2,5.
- x Vazão da fase móvel: 0,7mL/min; 1,0mL/min e 1,2mL/min.
- x Proporção entre água e acetonitrila: 10:90; 15:85 e 20:80.

Para a determinação da robustez, foram utilizadas três concentrações de amostra diferentes (0,5µg/mL, 7,5µg/mL e 12,5µg/mL). Cada uma das amostras foi analisada em duplicata, determinando-se o CV (%) entre as análises. Construiu-se uma curva de calibração com as três concentrações utilizadas e determinou-se o coeficiente de correlação linear (r).

3.7. Preparação das micropartículas de sulfóxido de albendazol - Eudragit RS 30 D[®] utilizando a técnica de spray-drying

Antes de preparar as micropartículas, uma determinada quantidade do fármaco foi micronizada em moinho de bola por 24 horas. A seguir, foi efetuada uma análise de distribuição de tamanho de partícula comparativa entre o fármaco antes e depois da micronização.

Para a preparação das micropartículas, preparou-se uma suspensão de polímero e fármaco micronizado, na proporção de 4:1. Foram pesados 133,33g de Eudragit RS 30 D[®] (equivalente a 40,0g do polímero) e dissolvidos para 400mL com água destilada. A dispersão foi levada ao agitador mecânico a 600rpm. Lentamente, foram adicionados 10,0g de sulfóxido de albendazol, mantendo-se a agitação por 30 minutos. Decorrido este tempo, a suspensão foi atomizada para o interior da câmara de secagem do spray-dryer. Durante todo o tempo em que a suspensão foi atomizada, a mesma foi mantida sob agitação magnética.

As condições empregadas no spray-dryer para a preparação das micropartículas foram:

- x Vazão do ar de secagem: 60°C
- x Temperatura de saída do ar: 60°C
- x Diâmetro do bico atomizador: 0,7mm
- x Vazão de alimentação da suspensão polímero:fármaco: 3,8mL/min
- x Pressão do bico atomizador: 45psi
- x Vazão de ar do bico atomizador: 40L/min

Após a secagem do solvente, as micropartículas foram coletadas em um frasco acoplado à câmara de secagem e realizou-se a análise das mesmas por microscopia óptica (aumento de 32 vezes). Realizou-se, ainda, a determinação da distribuição de tamanho, utilizando-se a técnica de difração a laser.

3.7.1. Estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS 30 D[®] preparadas pela técnica de spray-drying

Realizou-se um estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS 30 D[®] preparadas de acordo com o item 3.7, utilizando-se 150mL por cuba de PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% de Tween 80 como meio de dissolução. O estudo foi realizado durante 48 horas, empregando-se o aparato mini pá, com velocidade rotacional de 100rpm. As cubas de dissolução foram mantidas em banho termostatizado, na temperatura de 37,0°C. As micropartículas foram introduzidas em uma membrana de diálise, tendo sido coletadas 8 alíquotas de 1,0mL, com reposição do volume de meio de dissolução retirado, nos seguintes tempos: 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas. Após filtração através de membrana de 0,45µm, realizou-se a quantificação do sulfóxido de albendazol em cada uma das amostras por CLAE, de acordo com as condições descritas no item 3.4. O cálculo das porcentagens de fármaco dissolvido foi realizado por análise dimensional, através da fórmula:

$$\% \text{Dissolvida}_{(t)} = \frac{AA}{AP} \cdot \frac{MP}{DP} \cdot \frac{Pot}{100} \cdot \frac{V}{MA} \cdot (\% \text{Dissolvida}_{(t-1)} \cdot \frac{1}{V}) \cdot 100$$

Em que:

AA = área do pico da amostra

AP = área do pico do padrão

MP = massa do padrão (mg)

DP = diluição do padrão (mL)

Pot = potência do padrão (%)

V = volume de meio de dissolução (mL)

3.8. Preparação e avaliação das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS PO[®] utilizando a técnica de emulsificação / evaporação de solvente

A preparação das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS PO[®] foi realizada baseando-se nas metodologias descritas por: Cong et al. (2008); Scholes et al. (1993), adaptada por Ricci-Júnior e Marchetti (2006b); Hombreiro-Pérez et al. (2003).

Na fase orgânica, foram empregados diclorometano (CH₂Cl₂) e as misturas de solventes CH₂Cl₂:EtOH (9:1) e CH₂Cl₂:álcool benzílico (AB) (10:0,25). Quando se utilizou CH₂Cl₂ como fase orgânica, ocorreu solubilização apenas do polímero, permanecendo o fármaco em suspensão. Quando foram utilizadas as misturas de solventes já mencionadas como fase orgânica, o polímero e o fármaco foram solubilizados. Álcool polivinílico (PVA), em solução aquosa, foi utilizado como tensoativo, nas proporções de 0,25%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 3,0%.

A fase orgânica foi gotejada lentamente sobre a solução aquosa de PVA sob agitação com o auxílio de um agitador de alta velocidade. A seguir, a evaporação do solvente foi realizada por rotaevaporação e sob agitação magnética em câmara de exaustão, visando à comparação dos resultados. Inicialmente, as partículas obtidas foram centrifugadas a 2451g, por 1 hora, e lavadas com água por duas vezes. Posteriormente, as partículas passaram a ser centrifugadas a 8460g por 40 minutos, objetivando aumentar o rendimento do processo. Ao final, as partículas foram secas

por liofilização (overnight) e armazenadas em temperatura ambiente (25°C). A Tabela 2 mostra as condições em que as micropartículas foram preparadas.

Tabela 2 - Condições testadas para a preparação de micropartículas de sulfóxido de albandazol – Eudragit RS PO[®] pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente

Fase aquosa	Fase orgânica	Proporção polímero : fármaco	Velocidade de agitação / Tempo	Evaporação
25mL PVA 3,0%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	11000 rpm / 5'	ambiente
25mL PVA 3,0%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	25000 rpm / 5'	ambiente
50mL PVA 1,5%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	11000 rpm / 3'	ambiente
50mL PVA 1,5%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	11000 rpm / 3'	vácuo
125mL PVA 0,25%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	11000 rpm / 5'	1500rpm / 3h
125mL PVA 0,25%	5mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9:1)	4:1	11000 rpm / 5'	vácuo
125mL PVA 0,25%	5mL CH ₂ Cl ₂	4:1	11000 rpm / 5'	vácuo
125mL PVA 0,25%	5mL CH ₂ Cl ₂	40:1	11000 rpm / 5'	vácuo
20mL PVA 1,0%	10mL CH ₂ Cl ₂	10:1	13000 rpm / 5'	vácuo
20mL PVA 1,0%	10mL CH ₂ Cl ₂ : EtOH (9 : 1)	10:1	13000rpm / 5'	vácuo
20mL PVA 1,0%	10mL CH ₂ Cl ₂	10:1	13000 rpm / 5'	ambiente
20mL PVA 1,0%	10mL CH ₂ Cl ₂	4:1	13000 rpm / 5'	ambiente
20mL PVA 1,0%	10mL CH ₂ Cl ₂	5:1	13000 rpm / 5'	ambiente
20mL PVA 2,0%	10mL CH ₂ Cl ₂	5:1	13000 rpm / 5'	ambiente
20mL PVA 2,0%	10mL CH ₂ Cl ₂ + 5mL AB	10:1	13000 rpm / 5'	vácuo

Após a preparação das micropartículas, procedeu-se a determinação da eficiência de encapsulação, visando à adequação dos parâmetros da técnica proposta para a obtenção das micropartículas com as características desejadas, considerando a via de administração pretendida.

A determinação da distribuição de tamanho de partícula foi realizada por análise de espalhamento de luz, utilizando-se o equipamento Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

Posteriormente, as mesmas partículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.9. Determinação da eficiência de encapsulação das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS PO[®]

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada pelo método direto, quantificando-se o fármaco por CLAE, utilizando-se as condições cromatográficas estabelecidas no item 3.4.

Para a determinação da eficiência de encapsulação, preparou-se uma solução padrão de sulfóxido de albendazol em metanol, na concentração de 10,0µg/mL. As micropartículas foram rompidas utilizando-se metanol e agitação por ultrassom por 10 minutos, preparando-se uma solução de concentração teórica de fármaco equivalente à concentração da solução padrão.

Ambas as soluções foram analisadas por CLAE, calculando-se a eficiência de encapsulação (%) por análise dimensional, através da equação:

$$EE(\%) = \frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{DP} \times \frac{Pot}{100} \times \frac{DA}{MA} \times 100$$

Em que:

AA = área do pico da amostra

AP = área do pico do padrão

MP = massa do padrão (mg)

DP = diluição do padrão (mL)

Pot = potência do padrão (%)

DA = diluição da amostra (mL)

MA = massa teórica de fármaco na amostra (mg)

3.10. Estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS PO[®] obtidas pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente

Após a seleção das melhores condições para a preparação das micropartículas por emulsificação / evaporação de solvente, realizou-se o estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas obtidas, utilizando-se as mesmas condições descritas no item 3.7.1.

3.10.1. Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS PO[®], realizado através de delineamento inteiramente casualizado (DIC) com parcela subdividida no tempo, foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, objetivando identificar diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens dissolvidas médias em função do tempo.

A análise de variância é utilizada para dois diferentes propósitos. O primeiro deles é testar hipóteses sobre variâncias populacionais. O segundo é testar hipóteses sobre médias populacionais (DANIEL, 1991).

No presente trabalho, a mesma foi empregada com o objetivo de estudar as médias populacionais obtidas (porcentagens dissolvidas do fármaco puro não micronizado, do fármaco puro micronizado e das micropartículas, considerados como “sistemas de liberação”, em função do tempo). Para tanto, empregou-se o Teste F, determinando-se os valores críticos na distribuição F, de modo que, assim, a hipótese nula (todas as médias seriam iguais) pudesse ser testada.

A análise de variância permite somente avaliar a presença ou não de diferença estatística entre os grupos de valores observados, sem, no entanto, avaliar individualmente cada uma das subdivisões das parcelas (neste caso, os tempos de coleta). Para esta análise mais detalhada, utilizou-se o Teste de Tukey, em que as porcentagens dissolvidas foram comparadas estatisticamente em cada um dos tempos de coleta.

4. Resultados e discussão

4.1. Desenvolvimento da metodologia analítica

Inicialmente, efetuou-se uma varredura espectroscópica do sulfóxido de albendazol entre 190nm e 450nm, com o objetivo de determinar o comprimento de onda de análise (Figura 4).

Figura 4. Espectro de absorção do sulfóxido de albendazol na região de 190 a 450nm em solução metanólica, na concentração de 0,01mg/mL, cela de quartzo de 1cm de caminho óptico; temperatura de 25°C $\pm$ 2°C, espectrofotômetro UV-Visível FEMTO, modelo 800XI

Através desta varredura espectroscópica foi possível confirmar que o comprimento de onda ideal para a análise do sulfóxido de albendazol corresponde a 290nm, conforme já descrito por Sarin, Dash e Dua. (2004).

Após a determinação do comprimento de onda de máxima absorção, foram realizados testes utilizando-se exatamente a mesma fase móvel descrita no método citado acima. Entretanto, neste trabalho foi utilizada uma coluna cromatográfica com recheio C₁₆. Em nosso trabalho, utilizamos uma coluna C₁₈, de dimensões 4,0 x 150mm. As análises realizadas com a fase móvel descrita no trabalho acima não mostraram resultados satisfatórios, uma vez que o pico apresentou grande assimetria (presença de cauda), e tempo de retenção muito próximo ao volume morto, em torno de 2,5 minutos.

Na tentativa de melhorar a simetria do pico, dietilamina (DEA) foi adicionada à fase móvel nas proporções de 0,1 e 0,2%. Esta última concentração mostrou-se adequada para que o pico apresentasse simetria. Para aumentar o tempo de retenção sem, no entanto, prejudicar a simetria do pico, diversas proporções entre

AcN e H₂O foram testadas, bem como também foram realizadas algumas alterações de vazão. O melhor resultado encontrado foi aquele em que se utilizou como fase móvel a mistura AcN:H₂O:HClO₄:DEA (15:85:0,08:0,2) e vazão de 1,0mL/min. O pH desta fase móvel foi determinado em 2,3. A Figura 5 mostra uma representação esquemática do cromatograma obtido com estas condições analíticas.

Figura 5. Representação esquemática do cromatograma do sulfóxido de albendazol obtido por CLAE. As análises foram realizadas em um cromatógrafo modelo SPD 10A, equipado com detector UV-Vis (290nm), bomba LC 10AD e integrador C-R6A. Coluna C₁₈ fase reversa Lichrospher 100[®] (Merck, 4 x 150mm, 5µm) e coluna de guarda 4 x 4mm (5µm) (25°C ± 2°C). Fase móvel: AcN:H₂O:HClO₄:DEA (15:85:0,08:0,2); vazão de 1,0mL/min e volume de injeção correspondente a 20µL

Embora o pico do sulfóxido de albendazol analisado com as condições descritas acima apresentasse uma simetria razoável e também um tempo de retenção adequado, verificou-se que o CV das áreas entre as análises de uma mesma amostra era muito elevado (chegando até a 15%). Suspeitou-se que alguma impureza pudesse estar coeluinto com o analito de interesse, causando este tipo de variação.

Objetivando sanar este problema, testou-se a mesma fase móvel com uma coluna de dimensões maiores (4,0 x 250mm). Com a substituição da coluna

cromatográfica, o CV entre as áreas exibiu valores inferiores a 5%, além de que houve também uma melhora na simetria do pico. Obviamente, ocorreu também um aumento no tempo de retenção do analito. Após este teste, a nova coluna testada foi eleita como sendo mais adequada para a análise do analito em questão. Na Figura 6 verifica-se uma representação esquemática de um cromatograma obtido com a nova coluna cromatográfica.

Figura 6. Representação esquemática do cromatograma do sulfóxido de albendazol obtido por CLAE. As análises foram realizadas em um cromatógrafo modelo SPD 10A, equipado com detector UV-Vis (290nm), bomba LC 10AD e integrador C-R6A. Coluna C₁₈ fase reversa Purospher Star® (Merck, 4 x 150mm, 5µm) e coluna de guarda 4 x 4mm (5µm) (25°C ± 2°C). Fase móvel: AcN:H₂O:HClO₄:DEA (15:85:0,08:0,2); vazão de 1,0mL/min e volume de injeção correspondente a 20µL

4.2. Determinação da solubilidade do sulfóxido de albendazol no meio de dissolução a ser utilizado

Conforme exposto anteriormente, o sulfóxido de albendazol apresenta solubilidade mínima em pH 7,5 (41,4µg/mL), permanecendo muito pouco solúvel (<70µg/mL) na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,0, fato este que explica sua baixa biodisponibilidade (WU et al., 2005).

Para que futuramente fosse possível realizar estudos comparativos in vitro entre o perfil de liberação da matéria-prima de sulfóxido de albendazol versus o perfil de liberação do mesmo a partir das micropartículas obtidas em pH 7,4, foi necessária a padronização de um meio de dissolução contendo componentes capazes de melhorar a solubilidade do fármaco no referido pH, de modo a garantir as condições de sink. Para tanto, foram utilizados tensoativos e compostos orgânicos.

Conforme descrito no item 3.5., o fármaco foi disperso em PBS pH 7,4, na concentração de 0,02mg/mL, e mantido sob agitação por 24 horas, quando, então, diversas proporções de Tween 80 foram testadas. Verificou-se que, após 24 horas sob agitação magnética, as soluções contendo 1,0%, 2,0% e 5,0% de Tween 80 foram as que apresentaram menores quantidades de sólidos dispersos.

Adicionou-se, então, às soluções acima, diferentes proporções de EtOH ou PPG. Decorridas mais 24 horas sob agitação magnética, as soluções que continham a partir de 1,0% de Tween 80 e 40% de EtOH ou 30% de PPG mostraram-se límpidas. Estas soluções foram eleitas para os testes de dissolução do sulfóxido de albendazol no dissolutor.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no primeiro experimento realizado para determinar as condições a serem utilizadas no perfil de dissolução do sulfóxido de albendazol a partir das micropartículas.

Tabela 3 - Resultados obtidos nos estudos de solubilidade do sulfóxido de albendazol, na concentração de 0,02mg/mL, em diversos meios de dissolução – experimento 1 (n = 2)

Meio de dissolução	% dissolvida em 36 horas ($\pm$ DP)
PBS pH 7,4:EtOH (75:25) + 2,0% Tween 80	26,90 $\pm$ 2,48
PBS pH 7,4:EtOH (70:30) + 2,0% Tween 80	19,66 $\pm$ 0,16
PBS pH 7,4:EtOH (60:40) + 1,0% Tween 80	36,72 $\pm$ 5,14

Observando-se os resultados acima, verificou-se que nenhum dos meios testados foi capaz de solubilizar adequadamente o fármaco. O melhor resultado obtido foi aquele referente ao meio PBS:EtOH (60:40) acrescido de 1,0% Tween 80.

A adição de até 40% de solvente orgânico ao meio de dissolução, com o objetivo de garantir as condições de sink, foi embasada no trabalho realizado por

Montenegro et al. (1996). Neste trabalho, utilizou-se PBS:EtOH (50:50) como solução aceptora em estudos de permeação cutânea in vitro de lipossomas contendo ácido retinóico, em virtude da baixa solubilidade do fármaco em meio aquoso.

A partir deste resultado, o segundo experimento foi montado, mantendo-se a mesma quantidade de EtOH e aumentando-se a quantidade de Tween 80. Além disso, testou-se também a substituição de EtOH por PPG, uma vez que, segundo Wu et al. (2005), a solubilidade do sulfóxido de albendazol no PPG é cerca de duas vezes maior do que no EtOH. Os resultados obtidos no segundo experimento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos nos estudos de solubilidade do sulfóxido de albendazol, na concentração de 0,02mg/mL, em diversos meios de dissolução – experimento 2 (n = 1)

Meio de dissolução	% dissolvida 36 horas
PBS:EtOH (60:40) + 1,0% Tween 80	25,56
PBS:EtOH (60:40) + 2,0% Tween 80	27,54
PBS:PPG (70:30)	11,06
PBS:PPG (70:30) + 1,0% Tween 80	8,37
PBS:PPG (70:30) + 2,0% Tween 80	10,74

Mais uma vez, os dados acima demonstraram que a solubilização do sulfóxido de albendazol não foi completa em nenhum dos meios testados. A análise dos resultados demonstrou que, embora no teste utilizando agitação magnética o PPG tenha solubilizado melhor o fármaco do que o EtOH, corroborando com os dados expostos por Wu et al. (2005), quando o teste foi realizado no dissolutor, tal resultado não se repetiu. Este fato pode ser explicado pela alta viscosidade do PPG em relação ao EtOH. Ao utilizar uma agitação vigorosa (agitação magnética), o fator viscosidade deixa de ser determinante e a solubilização do fármaco ocorre mais rapidamente no PPG, ao passo que quando o teste foi realizado no dissolutor, em agitação mais branda, a viscosidade do PPG possivelmente alterou de maneira negativa as condições hidrodinâmicas na cuba de dissolução, fazendo com que houvesse uma melhor solubilização do fármaco no EtOH.

Com base nos resultados do segundo experimento, preparou-se o terceiro experimento, utilizando uma quantidade maior de Tween 80 (5,0%). Realizou-se também uma tentativa de combinar partes iguais de EtOH e PPG, com o intuito de aumentar a solubilização sem alterar muito a viscosidade do meio. Os resultados provenientes do terceiro experimento são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados obtidos nos estudos de solubilidade do sulfóxido de albendazol, na concentração de 0,02mg/mL, em diversos meios de dissolução – experimento 3 (n = 2)

Meio de dissolução	% dissolvida 12 horas ($\pm$ DP)	% dissolvida 24 horas ($\pm$ DP)
PBS:EtOH (60:40) + 5,0% Tween 80	56,99 ($\pm$ 4,23)	89,30 ($\pm$ 3,74)
PBS:PPG (70:30) + 5,0% Tween 80	20,28 ($\pm$ 6,28)	44,63 ($\pm$ 7,11)
PBS:EtOH:PPG (70:30) + 5,0% Tween 80	16,66 ($\pm$ 5,41)	35,55 ($\pm$ 4,92)

Os resultados do terceiro experimento mostraram que, mais uma vez, o PPG apresentou solubilização do sulfóxido de albendazol inferior ao EtOH. Por este motivo, os testes prosseguiram apenas com a utilização de EtOH. Na proporção de 5,0% de Tween 80, verificou-se uma boa solubilização do sulfóxido de albendazol.

No quarto experimento, testou-se uma concentração menor de sulfóxido de albendazol em cada cuba (0,013mg/mL), Neste mesmo experimento, além do Tween 80, outro tensoativo, Cremophor EL[®], foi também testado. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 6 - Resultados obtidos nos estudos de solubilidade do sulfóxido de albendazol, na concentração de 0,013mg/mL, comparando-se Tween 80 e Cremophor EL[®] – experimento 4 (n = 2)

Meio de dissolução	% dissolvida 12 horas ($\pm$ DP)	% dissolvida 24 horas ($\pm$ DP)	% dissolvida 36 horas ($\pm$ DP)	% dissolvida 48 horas ($\pm$ DP)
PBS:EtOH (60:40) + 5,0% Tween 80	65,82 ($\pm$ 16,47)	92,59 ($\pm$ 7,45)	103,75 ($\pm$ 3,63)	106,39 ($\pm$ 2,36)
PBS:EtOH (60:40) + 5,0% Cremophor EL [®]	53,70 ($\pm$ 3,83)	72,8 ($\pm$ 9,70)	83,53 ($\pm$ 13,04)	82,69 ($\pm$ 14,97)

Constatou-se pelo experimento acima que o Tween 80 teve maior capacidade de auxiliar a solubilização do sulfóxido de albendazol que o Cremophor EL[®].

O quinto e último experimento foi realizado com o objetivo de traçar um perfil detalhado da solubilização do fármaco nas condições experimentais selecionadas. A concentração de fármaco neste experimento foi também reduzida, passando-se a trabalhar com a concentração de 0,010mg/mL. Os dados referentes a este último experimento encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Estudo in vitro do perfil de dissolução do sulfóxido de albendazol, na concentração de 0,010mg/mL. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 acrescido de 5,0% de Tween 80 e 40% de etanol - experimento 5 (n = 2)

Tempo de amostragem (h)	% dissolvida ($\pm$ DP)
1	17,29 ($\pm$ 1,00)
2	36,22 ($\pm$ 7,04)
4	41,81 ($\pm$ 1,17)
8	63,04 ($\pm$ 12,32)
12	69,40 ($\pm$ 13,09)
24	76,44 ($\pm$ 7,86)
36	79,97 ($\pm$ 1,32)
48	85,49 ($\pm$ 1,15)

4.3. Validação da metodologia analítica

Após o estudo de solubilidade do sulfóxido de albendazol e da determinação das condições para análise do estudo in vitro do perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas, iniciou-se o processo de validação da metodologia analítica.

O objetivo da validação é demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003). Assim sendo, a etapa de validação da metodologia analítica é de suma importância, pois dela depende a garantia da veracidade dos resultados obtidos.

4.3.1. Calibração e linearidade

A Figura 7 exibe a curva de calibração construída a partir das análises das seis soluções descritas no item 3.6.1.

Figura 7. Curva de calibração do sulfóxido de albendazol em PBS pH 7,4:EtOH (60:40) acrescido de 5,0% Tween 80

Define-se linearidade pela capacidade de um método analítico produzir resultados direta ou indiretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa (BARROS, 2002).

O valor de r da curva mostra que o método é linear no intervalo de concentração analisado, uma vez que se considera que há uma relação linear entre um determinado parâmetro e sua resposta analítica quando o valor de r da curva for superior a 0,99.

Pelo valor de r obtido a partir da curva de calibração, confirma-se a linearidade do método no intervalo testado.

4.3.2. Precisão e exatidão

4.3.2.1. Precisão e exatidão intraensaio

A precisão é definida como o grau de concordância entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra homogênea (BARROS, 2002). A precisão é calculada por meio do CV (%).

A exatidão é o grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência, determinada em porcentagem (BARROS, 2002).

Para os estudos de precisão e exatidão intraensaio, foram utilizadas três concentrações diferentes, com 10 análises de cada, conforme descrito no item 3.6.2. A Tabela 8 exibe os valores médios obtidos após as 10 análises de cada uma das três concentrações selecionadas, bem como o valor do CV:

Tabela 8 - Valores médios calculados para o teste de precisão intraensaio (n = 10)

Concentração (µg/mL)	0,5	7,5	12,5
Média	12413,30	197810,10	336129,50
Desv Pd	493,632	9020,259	14446,796
CV (%)	3,977	4,560	4,298

Observando-se os valores de CV obtidos, provenientes de cada uma das três concentrações utilizadas, concluiu-se que o método atende ao requisito do teste de precisão intraensaio ($CV < 5,0\%$) (ANVISA, 2003).

Para o cálculo da exatidão intraensaio, foram utilizadas as mesmas análises da precisão intraensaio, além da equação da reta obtida a partir da curva de calibração exposta no item 4.3.1., tendo sido calculada de acordo com a fórmula descrita no item 3.6.2. A Tabela 9 mostra os valores obtidos para o referido cálculo.

Tabela 9 - Valores médios calculados para o teste de exatidão intraensaio (n = 10)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média obtida (µg/mL)	E (%)
0,5	0,438	- 12,05%
7,5	7,763	3,70%
12,5	13,228	6,16%
Média		-0,73%

De acordo com Causon (1997), um método é considerado exato quando os valores médios de E encontram-se entre $\pm 15\%$. Assim sendo, o método testado foi aprovado no teste de exatidão intraensaio.

4.3.2.2. Precisão e exatidão interensaios

Conforme explicado no item 3.6.2., os dados necessários para avaliação da precisão e da exatidão interensaios foram coletados em 5 dias consecutivos. Cada uma das três concentrações utilizadas foi analisada em triplicata. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Valores obtidos para avaliação da precisão interensaios (n = 3)

Concentração (µg/mL)	0,5	7,5	12,5
Média	13418,67	206545,13	341926,78
Desv Pd	670,02	9579,39	17008,21
CV (%)	4,99	4,64	4,97

De acordo com a Tabela 10, todos os valores de CV encontram-se abaixo de 5%, condição esta que satisfaz os requisitos para um método ser aprovado na avaliação da precisão interensaios.

Tabela 11 - Cálculo da exatidão interensaios (n = 3)

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida média (µg/mL)	E (%)
0,5	0,509	1,80%
7,5	7,527	0,36%
12,5	12,485	-0,12%
Média		0,68%

Os resultados expostos na Tabela 11 mostram que os valores de E (%) encontram-se dentro do intervalo de $\pm 15\%$, satisfazendo os requisitos necessários para a avaliação da exatidão interensaios.

4.3.3. Robustez

O teste de robustez verificou a variação dos resultados analíticos em função de variações no pH, na vazão e na proporção entre água e acetonitrila na fase móvel. Os resultados obtidos mostraram que estas variações empregadas foram capazes de promover somente alterações no tempo de retenção do analito, conforme esperado, sem, no entanto, configurarem algum prejuízo em termos de separação ou perda de linearidade. Na Tabela 12 encontram-se os valores de r obtidos para cada uma das condições avaliadas.

Tabela 12 - Valores de coeficiente de correlação linear obtidos nos testes de robustez (n = 3)

pH			Vazão (mL/min)			Proporção Água : ACN		
2,1	2,3	2,5	0,7	1,0	1,2	10:90	15:85	20:80
0,9995	0,9992	0,9990	0,9999	0,9995	1,0000	0,9991	0,9995	1,0000

Todas as amostras foram injetadas em duplicata e o CV calculado para cada uma delas foi inferior a 5,0%.

A partir dos dados da Tabela 12 é possível verificar que todos os valores de r encontrados foram superiores a 0,99. Sendo assim, as variações testadas não foram capazes de influenciar a linearidade do método no intervalo testado, podendo-se, desta forma, concluir que o método desenvolvido satisfaz os requisitos necessários para avaliação da robustez dos parâmetros avaliados.

4.4. Preparação e avaliação das micropartículas de sulfóxido de albendazol - Eudragit RS 30 D[®] obtidas pela técnica de spray-drying

Previamente à preparação das micropartículas, efetuou-se a análise de distribuição de tamanho de partícula do fármaco antes e depois da micronização em moinho de bola por 24 horas (Figura 8).

Média: 27,40 μ m Desvio Padrão: 19,60 μ m (A)

Média: 7,130 μ m Desvio Padrão: 5,296 μ m (B)

Figura 8. Distribuição de tamanho das partículas de sulfóxido de albendazol, analisadas por difração a laser. (A) antes da micronização; (B) após a micronização em moinho de bola por 24 horas

De acordo com os resultados provenientes do referido ensaio, verificou-se que o fármaco apresentou distribuição de tamanho irregular, mesmo após o

processo de micronização. A micronização foi capaz de promover uma redução no tamanho médio das partículas, porém, não foi capaz de eliminar a irregularidade existente.

Subsequentemente, as micropartículas foram preparadas, conforme descrito no item 3.7., utilizando-se o fármaco micronizado. As mesmas foram analisadas por microscopia óptica, com aumento de 32 vezes (Figura 9).

Figura 9. Fotografia das micropartículas de sulfóxido de albendazol – Eudragit RS 30 D® preparadas pela técnica de spray-drying, obtida por microscopia óptica (aumento de 32 vezes)

Através da imagem exibida na Figura 9, nota-se que as micropartículas apresentaram morfologia e tamanho irregulares. Tal fato encontra-se em concordância com a irregularidade da morfologia das partículas da matéria-prima de sulfóxido de albendazol. Uma vez que o fármaco foi apenas suspenso, as micropartículas mantiveram a irregularidade inicial da matéria-prima.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos na determinação da distribuição de tamanho de partículas, confirmando a irregularidade demonstrada através da fotografia obtida por microscopia óptica.