

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610683-8 A2**

(22) Data de Depósito: 18/05/2006
(43) Data da Publicação: 20/07/2010
(RPI 2063)



(51) Int.Cl.:

A61K 9/16
A61K 47/36
A61K 9/50

(54) Título: **APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES**

(30) Prioridade Unionista: 18/05/2005 US 60/682,074

(73) Titular(es): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, DA VOLTERRA

(72) Inventor(es): Antoine Andreumont, Elias Fattal, Hélène-Céline Huguet, Nicolas Tsapis

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005629 de 18/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/122835 de 23/11/2006

(57) Resumo: APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES. Sistemas de aplicação em partículas, específicos de sítio (colônicos), oralmente administráveis, incluindo absorventes são revelados. Quando aplicados especificamente ao colo, eles podem remover várias substâncias presentes no, ou conforme elas atingem o colo. Métodos de tratamento usando os sistemas de aplicação, e métodos de preparação dos sistemas de aplicação, são também revelados. Os sistemas de aplicação em partícula são baseados em matrizes absorventes encapsuladas em e/ou sobre partículas, que seletivamente liberam os absorventes para o colo. Dispositivos de aplicação de fármaco representativos incluem contas de pectina, que podem ser opcionalmente ligadas com cruzamento com ions de metal tal como zinco e/ou cálcio. O sistema de aplicação protege o absorvente e previne seu efeito de absorção no trato gastrointestinal superior (G1). Quando as partículas são feitas de pectina, e as contas são administradas ao colo, enzimas pectinolíticas específicas no colo degradam a pectina, permitindo que o absorvente seja liberado e seja completamente ativo. Antibióticos, toxinas e outras substâncias absorvíveis presentes no colo será então inativados através de absorção no ou sobre o absorvente.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES**".

Campo da Invenção

O presente pedido está no campo de aplicação colônica de agentes terapêuticas e, especificamente, lida com a aplicação específica de materiais absorventes ao colo.

Antecedentes da Invenção

Resistência bacteriana a antibióticos emergiu um pouco depois do início do uso dos antibióticos e tem aumentado continuamente desde então, mas a magnitude dos problemas foi de certa forma ocultada até o início dos anos noventa por causa das contínuas descobertas e liberação de novos agentes antibacterianos. Hoje em dia, no entanto, enfrenta-se uma crise de saúde pública global porque a indústria farmacêutica está falta de novos agentes bacterianos. Uso global daqueles disponíveis está ainda aumentando e, como uma consequência, a incidência de bactéria resistente em humanos está atingindo um nível alarmante em todo o mundo.

Embora a resistência bacteriana possa emergir através de seleção direta de patógenos resistentes no sítio de infecção, a resistência alta de patógenos bacterianos é na maioria dos casos um processo de duas etapas, onde resistência acontece primeiro na flora comensal e é seguido por transferência horizontal de resistência a espécies patogênicas.

Embora oculta, a resistência grande em flora intestinal comensal é um efeito secundário quase constante de todos os usos de antibiótico. Pesquisadores mostraram que administração orogástrica de beta-lactamase em camundongos reduziu alterações associadas com beta-lactamase da microflora nativa e crescimento excessivo de patógenos. Transposição deste princípio a humanos para reduzir a emergência de resistência intestinal durante tratamentos antibióticos requer a aplicação específica de enzimas de hidrolisação de antibiótico ao colo. Um exemplo desta abordagem é descrito no PCT WO 2004/016248 depositado em 6 de agosto de 2003, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. No entanto, há ainda um grande número de antibióticos que induzem resistência

bacteriana, mas não podem ser removidos por enzimas específicas. Ainda, muitas bactérias produzem toxinas, que causam efeitos colaterais tal como diarreia quando as toxinas atingem o colo.

5 Absorventes são sabidos absorver uma variedade de agentes químicos orgânicos, tal como antibióticos. No entanto, a administração de absorventes é tipicamente contra-indicada com prescrição de antibióticos, porque os absorventes podem absorver e então inativar uma grande quantidade desses antibióticos antes que eles possam atingir o fluxo sanguíneo [Referências 3-5].

10 É então um objeto da presente invenção prover um sistema que direcione agentes de inativação ao colo, usando sistemas de aplicação em partícula específicos de sítio, bem como métodos de inativação de antibióticos e outros agentes ativos, e métodos para absorção de produtos prejudiciais ou perigosos tal como, mas não limitado a, toxinas, agentes químicos, 15 alérgenos, etc. É um objeto adicional da presente invenção prover tal sistema, onde o sistema especificamente libera seu teor no colo, e não interfere com o sítio de absorção normal do antibiótico, isto é o trato gastrointestinal superior ("GI"). A presente invenção provê tais sistemas e métodos.

Sumário da Invenção

20 A presente invenção refere-se a sistemas de aplicação em partícula, específicos de sítio (colônicos), oralmente administráveis. Quando os sistemas são aplicados especificamente ao colo, eles são capazes de remover várias substâncias presentes no, ou conforme eles atingem o, colo. A invenção refere-se também a métodos de tratamento usando os sistemas de 25 aplicação e métodos de preparação dos sistemas de aplicação.

Os sistemas de aplicação em partícula são baseados em matrizes absorventes encapsuladas em e/ou sobre partículas, que seletivamente liberam os absorventes no colo. Sistemas de aplicação de fármaco representativos incluem contas à base de pectina, onde a pectina pode ser opcionalmente ligada com cruzamento com íons de metal tal como íons de zinco 30 e/ou cálcio, e as contas de pectina ligadas com cruzamento podem ser opcionalmente reticuladas com um polímero catiônico tal como polietilenoimina,

quitosana e polilisina. Em adição a, ou no lugar da pectina, outros polímeros, tal como quitosana, alginatos, xantana, curdlan, goma guar e outros polissacarídeos (particularmente polissacarídeos ionicamente ligados com cruzamento) e Eudragit® (polímeros de polimetilmetacrilato), podem ser também
5 usados para reticular as partículas.

O papel do sistema de aplicação em partícula é proteger o absorvente e prevenir seu efeito absorvente no trato gastrointestinal superior (GI). Quando as partículas são feitas de pectina, e as contas atingem o colo, enzimas pectinolíticas específicas degradam a pectina, permitindo que o ab-
10 sorvente seja liberado e seja completamente ativo. Antibióticos, agentes químicos, toxinas e outras substâncias absorvíveis presentes no colo serão então inativados através de absorção no ou sobre o absorvente.

Devido ao fato dos sistemas de aplicação em partícula específicos de sítio liberarem os absorventes no colo, eles não interferem a um pon-
15 to significativo com a cinética de absorção normal do antibiótico ou qualquer outra substância ativa enquanto no trato GI superior ou em outro local no corpo humano.

Em uma modalidade, os absorventes são usados para absorver antibióticos residuais, tal como, mas não restrito a, beta-lactamas, ciclinas, quinolonas, macrólidos e aminoglicosídeos, quando antibióticos são adminis-
20 trados em conjunto com (isto é, antes, durante ou após administração) o sistema. Nesta modalidade, as contas podem opcionalmente também incluir enzimas capazes de inativação dos antibióticos. Exemplos dessas enzimas incluem enzimas que inativam beta-lactamas, quinolonas e/ou macrólidos, tal como beta-lactamases. Acredita-se que o absorvente possa ajudar a tra-
25 zer o antibiótico em contato com a enzima, auxiliando mais na remoção do antibiótico do colo do paciente.

Em uma outra modalidade, os absorventes são usados para absorver produtos prejudiciais ou perigosos tal como, mas não limitado a, toxinas, agentes químicos, alérgenos e similar absorvidos ou produzidos por
30 bactérias e/ou fungos e que podem produzir sérios efeitos adversos no colo.

Em ainda uma outra modalidade, os absorventes são usados

para absorver agentes farmacêuticos que são administrados sistemicamente, e que resultam em efeitos benéficos quando eles interagem com receptores fora do colo, mas resultam em efeitos colaterais adversos, tal como diarreia e/ou constipação, quando eles interagem com os receptores no colo.

- 5 As partículas contendo absorvente podem ser preparadas usando métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Em uma modalidade, as partículas são preparadas misturando o absorvente em uma solução de pectina, ligando com cruzamento a pectina com um cátion de metal tal como zinco ou cálcio para formar contas de pectina que encapsulam o absorvente,
- 10 e então opcionalmente reticulando as contas de pectina ligadas com cruzamento com uma solução de polietilenoimina ou qualquer outro polímero policationico. As contas de pectina resultantes podem então ser incluídas em qualquer dispositivo de aplicação de fármaco adequado, tal como comprimido ou cápsula.

15 Breve Descrição das figuras

A figura 1 representa uma vista esquemática de um método que pode ser usado para preparar as contas de Zn-pectinato ou Ca-pectinato descritas aqui.

- 20 A figura 2 mostra imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de uma conta s eca de Ca-pectinato típica (esquerda) e sua superfície relativamente lisa (direita).

A figura 3 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando carvão ativado (razão de carvão para pectina = 5/3 p/p).

- 25 A figura 4 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando atapulgita (razão de atapulgita para pectina = 1/1 p/p).

A figura 5 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando caulim (razão de caulim para pectina = 5/3 p/p). Na imagem da direita a estrutura em camada de caulim é visível na superfície das contas.

- 30 A figura 6 mostra imagens de SEM de contas de pectinato de cálcio encapsulando ou sílica coloidal (esquerda, razão de sílica para pectina = 80/12 p/p) ou laponina (direita, razão de laponina para pectina = 16/6 p/p).

As figuras 7 e 8 representam a porcentagem de amoxicilina elimi-

nada através de absorção (0,5 e 1 mg/mL) versus tempo de contato (min) de incubação com cada absorvente testado, em Meio Colônico Simulado (SCM) sem enzimas pectinolíticas. Na figura 7, diamantes representam carvão ativado em uma concentração de 10 mg/mL, triângulos representam atapulgita em uma concentração de 200 mg/mL e quadrados representam caulim em uma concentração de 200 mg/mL. Na figura 8, triângulos representam carvão ativado em uma concentração de 10 mg/mL, diamantes representam carvão ativado em uma concentração de 5 mg/mL e círculos representam carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL.

10 A figura 9 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) (concentração inicial é 100 µg/ml) versus tempo (min) de incubação com matrizes absorventes em SCM sem atividade pectinolítica. Triângulos representam carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL, diamantes representam atapulgita em uma concentração de 1 mg/mL e quadrados representam caulim em ma concentração de 1 mg/mL.

15 A figura 10 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) (concentração inicial é 500 µg/mL) versus tempo (min) de incubação em matrizes absorventes incluindo carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL em SCM sem atividade pectinolítica.

20 A figura 11a representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através da absorção (%) (concentração inicial é 100%) versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de cálcio carregadas com carvão ativado (1 conta/mL) em meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas.

25 A figura 11b representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) concentração inicial é 500 µg/mL) versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de cálcio carregadas com carvão ativado (1 conta/mL) em meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas.

30 A figura 12 representa a dose de ciprofloxacina eliminada através da absorção dada em µg/mg de carvão ativado versus tempo (min) de incubação; comparação entre contas de pectinato de cálcio (quadrados a-

zuis) e pectinato de zinco (círculos vermelhos) carregadas com carvão ativado (6% p/p de contra-íons). As contas são incubadas em meio colônico simulado contendo 500 µg/mL de ciprofloxacina (n=2).

5 A figura 13 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado (6% p/v de acetato de zinco) em meio colônico simulado. A concentração de ciprofloxacina inicial é 500 µg/mL).

10 A figura 14 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco ativadas com carvão (10% p/v de acetato de zinco) no meio colônico simulado. Contas (2 mg/mL (círculos cheios azuis) ou 5 mg/mL (círculos vazios pretos)) são incubadas em meio colônico simulado contendo uma concentração de ciprofloxacina inicial de 100 µg/mL.

15 A figura 15 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado e 10% (p/v) Tween 80 (10% p/v de acetato de zinco) no meio colônico simulado. Contas (2 mg/mL (círculos azuis)) são incubadas em meio colônico simulado contendo uma
20 concentração de ciprofloxacina inicial de 100 mg/mL.

A figura 16 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado e 5% (p/v) de Lutro® F68 (10% p/v de acetato de zinco). Contas (2 mg/mL (círculos cheios azuis) ou 5
25 mg/mL (círculos vazios pretos)) são incubadas em SCM contendo uma concentração de ciprofloxacina inicial de 100 µg/mL.

Descrição Detalhada da Invenção

Os sistemas de aplicação em partícula incluindo os absorventes encapsulados, e métodos para sua preparação e uso, são descritos em mais
30 detalhes abaixo. Conforme aqui usado, os termos "encapsulado" e "encapsulação" referem-se a absorventes que estão presentes nas contas e/ou sobre a superfície das contas.

I. Componentes das Partículas Contendo Absorvente

As partículas contendo absorvente incluem um absorvente, um componente polimérico que não libera uma quantidade significativa do absorvente até que as partículas atinjam o colo.

5 A. Tipos de Absorventes

Os absorventes usados para preparar as partículas devem ter uma superfície específica alta, e podem ser de grau farmacêutico ou não. Exemplos de absorventes adequados incluem carvão ativado, argilas, incluindo bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, haloisita, laponita e similar, sílica, incluindo sílica coloidal (Ludox[®] AS-40, por exemplo), sílica meso-
 10 porosa (MCM41), sílica fumê, zeólitos e similar, talco, e resinas para testes bacteriológicos tal como resinas BACTEC[®]. Dentre esses absorventes, pode ser preferido usar aqueles de grau farmacêutico, tal como carvão ativado obedecendo a padrões Pharmacopoeia (ex. Merck, França), caulim (ex.
 15 VWR, França), atapulgita (ex. Lavollée, França), bentonita (ex. Across Organics, França), Talco USP (ex. VWR, França).

B. Contas de Pectina

A pectina é um exemplo de um polímero adequado para a preparação das partículas, íons de zinco e cálcio são exemplos de íons adequados para ligar com cruzamento ionicamente a pectina nas partículas
 20 (contas) e polietilenoimina é um exemplo de um polímero adequado para reticulação de contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento, naquelas modalidades onde reticulação for desejada. Contas de pectina adequadas podem ser formadas de pectina, um íon de metal polivalente (isto é,
 25 divalente ou trivalente) e, opcionalmente, um polímero catiônico, e as contas de pectina podem encapsular um ou mais absorventes.

Pectina

A pectina é um polissacarídeo isolado das paredes celulares de vegetais superiores, usada amplamente na indústria alimentícia agrícola
 30 (como um coagulante ou espessante de geléias, sorvetes e similar) e agentes farmacêuticos. Ela é polimolecular e polidispersa. Sua composição varia de acordo com a fonte, condições de extração e fatores ambientais.

As pectinas são principalmente compostas de cadeias lineares de ácidos beta-1,4-(D)-galacturônicos, de vez em quando inter espaçadas por unidades de ramnose. Os grupos carboxílicos de ácidos galacturônicos podem ser parcialmente esterificados para dar pectinas metiladas. Dois tipos de pectina são distinguidos de acordo com seu grau de metilação (DM: número de grupo metóxi por 100 unidades de ácido galacturônico):

- pectina altamente metilada (HM: muito metóxi) a partir da qual o grau de metilação varia entre 50 e 80%. Ela é altamente solúvel em água e forma géis em meio ácido ($\text{pH} < 3,6$) ou na presença de açúcares.

10 - Pectina fracamente metilada (LM: pouco metóxi), com um grau de metilação variando de 25 a 50%. Mais solúvel em água do que a pectina HM, ela dá géis na presença de cátions divalentes tal como íons de Zn^{2+} e Ca^{2+} . Na realidade, íons de Zn^{2+} e Ca^{2+} formam "pontes" entre os grupos carboxilados livres de ácidos galacturônicos. A rede então formada foi descrita por Grant e outros sob o nome de <<modelo caixa de ovo>> (Grant G.T. e outros (1973) **Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model**, *FEBS Letters*, 32, 195).

Há também as pectinas amidadas. Usando tratamento de pectina por amônia certos grupos metil carboxilato ($-\text{COOCH}_3$) podem ser transformados em grupos carboxamida ($-\text{CONH}_2$). Esta amidação confere novas propriedades às pectinas, especialmente melhor resistência a variações em pH. Pectinas amidadas tendem a ser mais tolerantes às variações em pH, e foram também estudadas para elaboração de comprimidos matriciais para aplicação colônica (Wakerly, Z. e outros (1997)). **Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery**, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 622).

A pectina é degradada por enzimas que se originam de vegetais superiores e vários microorganismos (isto é, fungos e bactérias) dentre as quais bactérias de flora colônica humana é encontrada. As enzimas produzidas pela microflora são compostas de um conjunto de polissacaridases, glicosidases e esterases.

Outros polímeros, tal como quitosana, alginatos, xantano, cur-

dlan, goma guar e outros polissacarídeos (particularmente polissacarídeos que podem ser ionicamente ligados com cruzamento) e Eudragit® (polímeros de polimetilmetacrilato), pode ser também usados para preparar as partículas.

5 Cátions de Metal

Em algumas modalidades, a pectina é ionicamente ligada com cruzamento com um cátion de metal. Qualquer cátion de metal polivalente (isto é, divalente, trivalente e similar) pode ser usado para ligar com cruzamento a pectina. Exemplos incluem cálcio, zinco, alumínio, magnésio, ferro e similar. Zinco e cálcio são cátions de metal preferidos.

Polímero Catiônico

Naquelas modalidades onde a pectina é ionicamente ligada com cruzamento com um cátion de metal, ela pode ser opcionalmente também reticulada com um polímero catiônico, tal como polietilenoimina, quitosana ou polilisina. Foi observado que quando a pectina é ligada com cruzamento com íons de zinco, tal como aqueles de acetato de zinco, reticulação é menos importante do que quando íons de cálcio são usados.

Desses polímeros catiônicos, polietilenoimina pode ser preferida. Polietilenoimina é um polímero fortemente catiônico que se liga a certas proteínas, e é freqüentemente usada como um marcador em imunologia, para precipitar e purificar enzimas e lipídeos. Ela é também conhecida como polímero de aziridina; epamina; epomina; polímero de etilenoimina; montrek; PEI; e poliimina(s). O peso molecular da polietilenoimina está entre 10.000 e 100.000 Daltons, de preferência entre 20.000 e 50.000 Daltons.

A quantidade de polietilenoimina usada pode ser otimizada, dependendo do peso molecular e do tipo de pectina usada. Vantajosamente, a concentração ótima para polietilenoimina (quando presente se alguma) é aquela que proveja contas de pectina reticuladas que sejam estáveis o suficiente para sobreviverem no trato gastrintestinal, ainda que instáveis o suficiente para serem suficientemente degradadas no colo de modo a liberarem uma quantidade eficaz do absorvente e/ou agente ativo. Em algumas modalidades, tal como onde íons de cálcio são usados para ligar com cruzamento

a pectina, acredita-se que entre 0 e 1% seja a faixa ótima de concentração de polietilenoimina para atingir esses objetivos.

Por exemplo, quando as contas de pectina são preparadas a partir de uma solução de pectina a 1-10% (p/v), vantajosamente de a partir de 2 a 6% (p/v) e uma solução de cloreto de cálcio a 2-10% (p/v), uma concentração de 0 a 10% (p/v) de polietilenoimina (PEI) é ótima.

Aqueles de habilidade na técnica, usando os ensinamentos descritos aqui, podem prontamente otimizar a quantidade de polietilenoimina, ou evitar seu uso totalmente, se houver variações na concentração de pectina, do tipo de pectina ou da concentração ou tipo de cátion de metal usado, com relação àqueles usados nos exemplos de trabalho descritos aqui. Ainda, no lugar de polietilenoimina, outros polímeros catiônicos, tal como quitosana ou polilisina, podem ser usados, contanto que eles permitam que as contas de pectina especificamente apliquem o absorvente encapsulado ao colo.

15 Agentes de Desintegração

Agentes de desintegração podem ser adicionados à solução de pectina antes da gelação ionotrópica. Esses agentes de desintegração podem precipitar a desintegração das contas no meio colônico quando necessário. Agentes de desintegração representativos incluem D-lactose, tensoativos polissorbato tal como Tween[®] 80, poloxâmeros tal como Lutrol[®] F68 (BASF) ou polímeros tal como povidona Kollidon[®] K17, embora outros agentes de desintegração conhecidos na técnica possam ser usados.

Componentes Adicionais Opcionais

As contas de pectina podem incluir opcionalmente um ou mais componentes adicionais. Idealmente, esses são componentes que não são absorvidos pelo absorvente, e incluem excipientes e enzimas que inativam antibióticos ou outras substâncias absorvidas. Por exemplo, as enzimas podem ser enzimas que inativam beta-lactamas, quinolonas e/ou macrólidos, tal como beta-lactamases. Embora não desejando ser limitado a uma teoria particular, acredita-se que o absorvente possa ajudar a trazer o antibiótico em contato com a enzima, auxiliando mais na remoção do antibiótico do colo do paciente.

I. Preparação dos Sistemas de Aplicação em Partícula

As partículas podem ser preparadas através de meios conhecidos daqueles de habilidade na técnica. Quando as partículas são contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento, elas podem ser tipicamente preparadas através de mistura do absorvente e/ou agentes ativos em uma solução de pectina, ligação com cruzamento da pectina com um cátion de metal tal como zinco ou cálcio para formar contas de pectina que encapsulam o absorvente e/ou os agentes ativos, e então opcionalmente reticulação das contas com uma solução de polietilenoimina.

5 Tipicamente, contas não contendo o absorvente são preparadas através da adição de uma solução de pectina aquosa em uma concentração de 1 a 10% (p/v) em gotas a uma solução de um sal de zinco tal como acetato de zinco, ou um sal de cálcio tal como cloreto de cálcio, para formar contas de pectinato de zinco ou cálcio, que são então recuperadas. Opcionalmente, as contas de pectinato ionicamente ligadas com cruzamento podem ser introduzidas em uma solução aquosa de polietilenoimina ou outro polímero catiônico para reticular as contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento.

10 Um processo ligeiramente diferente é usado para preparar contas incluindo os absorventes. Os absorventes são misturados com água suficiente para hidratá-los e então agitados por tempo suficiente para prover uma suspensão homogênea (tipicamente 12 horas), e pectina (ou solução de pectina) é adicionada, com aquecimento conforme necessário para manter a viscosidade da solução. Então, o processo prossegue de uma maneira substancialmente similar àquela para preparação de contas nuas (isto é, 20 contas que não encapsulam um absorvente).

25 A solução de pectina é vantajosamente de a partir de 1 a 10% (p/v), de preferência 2 a 6%, a solução de íon de zinco ou cálcio é vantajosamente de a partir de 2 a 15% (p/v) e a solução de polietilenoimina, quando usada, é vantajosamente de a partir de 0,5 a 2,% (p/v). Com mais preferência, a solução de pectina é de cerca de 3% (p/v), a solução de zinco é cerca de 10% (p/v) ou a solução de íon de cálcio é cerca de 6% e a solução de 30

polietilenoimina, quando usada, é cerca de 0,5 a 1% (p/v), de preferência cerca de 0,8% (p/v), embora em qualquer caso, a quantidade de polietilenoimina (se presente alguma) é vantajosamente selecionada para prover contas de pectina reticuladas que sobrevivem no trato gastrintestinal até que
5 elas atinjam o colo, e que sejam suficientemente degradadas no colo para prover liberação eficaz do agente ativo.

As contas de pectina são vantajosamente agitadas na solução de íon de zinco ou cálcio sob agitação lenta entre 10 minutos e uma hora, de preferência por cerca de 20 a 30 minutos. Cerca de 200 contas são lavadas
10 três vezes em 50 mL de água milli-Q sob agitação lenta entre 0,5 e 10 minutos, de preferência por cerca de 1 minuto. O número de lavagens podem ser opcionalmente modificado. As contas são opcionalmente reticuladas com polietilenoimina sob agitação lenta por entre 15 a 40 minutos, de preferência por 20 minutos e então lavadas de acordo com o processo descrito acima.
15 Após recuperação das contas de pectina, elas são secas em uma temperatura entre 20 e 40° C por 30 minutos a 10 horas, de preferência a 37° C por 2 horas ou secas com congelamento. O diâmetro das partículas é entre cerca de 0,5 mm e 5 mm, de preferência entre cerca de 0,5 e 2 mm. O diâmetro das partículas pode ser finamente ajustado usando tamanho de agulha e
20 fluxo de pectina através da agulha diferentes.

Em uma modalidade, os sistemas de aplicação baseados em pectina são preparados de acordo com o processo que segue, que é baseado na gelação ionotrópica de gotículas de solução de pectina quando postas em uma solução de um íon de metal divalente ou polivalente tal como acetato de zinco ou cloreto de cálcio. O princípio do método é apresentado na figura 1.
25

Nesta modalidade, uma pectina tal como uma pectina metoxilada e amidada (Unipectin OG175C, Degussa Texturant System, França) é dissolvida em água Milli-Q usando um agitador magnético. A solução pode ser aquecida em torno de 50° C para facilidade de dissolução. A concentração de pectina final está tipicamente entre 1% e 10% (p/v), embora concentrações fora desta faixa possam ser usadas. A solução de pectina é então
30

dirigida com uma bomba peristáltica ou uma bomba de seringa através de uma agulha (diâmetro interno: 0,5 mm) e cai de gota em gota em uma solução de um íon de metal divalente ou polivalente, tal como um acetato de zinco ou cloreto de cálcio (com uma concentração de sal típica entre cerca de 1 e 12% p/v) em uma taxa típica de 60 a 80 contas por minuto (embora taxas maiores e menores possam ser usadas, e a taxa pode variar dependendo da escala do processo).

Para reduzir sua viscosidade, a solução pode ser aquecida para em torno de 50° C aproximadamente enquanto sendo bombeada. Os íons de metal, tal como zinco ou cálcio, interagem com os grupos de COO⁻ disponíveis nas moléculas de pectina de acordo com o modelo de caixa de ovo [Referência 6]. As gotas de pectina são deixadas agitar por 20 a 30 minutos ou aproximadamente no banho de sal para permitir a difusão do sal com a matriz de pectina e formação completa da rede de íon de metal-pectinato (tal como Zn-pectinato ou Ca-pectinato). As contas são idealmente então filtradas, enxaguadas e lavadas pelo menos três vezes com água milli-Q para eliminar o excesso de sal conforme anteriormente descrito, e então secas. Secagem pode ser obtida usando quaisquer meios apropriados, tipicamente ou simplesmente deixando as contas no forno em torno de 37° C por pelo menos 2 horas secando-as com congelamento.

Após secagem, contas nuas (isto é, não encapsulando nada) têm um tamanho de torno de 1 milímetro. Uma pessoa pode variar o tamanho das contas, por exemplo, variando a taxa de fluxo da solução de pectina, o tamanho da agulha, a concentração de pectina ou a quantidade do material encapsulado. Uma conta nua seca típica é apresentada na figura 2. Contas nuas têm uma superfície ligeiramente lisa.

Encapsulação dos absorventes com contas de pectinato de Zn ou Ca

A encapsulação dos absorventes foi simplesmente realizada preparando separadamente uma suspensão do absorvente em água e uma solução de pectina. A suspensão absorvente foi preparada como segue: o absorvente seco foi pesado e adicionado à água (concentração entre 1 e 10% p/v) usando um agitador magnético. A suspensão foi deixada agitar da

- noite para o dia para assegurar que o absorvente fosse completamente hidratado (ou esfoliado no caso de argilas). Esta agitação prolongada parece ser também importante para carvão ativado: se o absorvente não for deixado agitar da noite para o dia, a suspensão não é homogênea e encapsulação não é fácil. A solução de pectina é aquecida (máximo 50° C) e a suspensão absorvente foi misturada com ela usando uma ferramenta propelente de três lâminas por pelo menos 30 minutos. Mistura da solução de pectina com a suspensão absorvente é crucial para encapsulação adequada e homogênea do absorvente dentro da matriz de pectina. Por exemplo, se a suspensão absorvente não for deixada agitar da noite para o dia, uma separação de fase é observada quando a solução de pectina é adicionada: uma fase rica em pectina e uma fase rica em absorvente. A falta de homogeneidade desaparece quando a suspensão é bem hidratada da noite para o dia. Em adição absorventes de grau farmacêutico, laponita XLG (Rockwood, UK) e sílica coloidal (Ludox® AS-40; Sigma, França) foram também encapsuladas. Laponita foi hidratada da mesma maneira que as argilas naturais. No caso de sílica coloidal (40%, p/v), uma vez que este absorvente já é uma suspensão, ela foi misturada diretamente com a solução de pectina usando uma ferramenta propelente de três lâminas.
20. Contas contendo absorvente podem ser preparadas usando o mesmo método que o descrito para agulhas nuas. Imagens SEM de contas secas são apresentadas nas figuras 3, 4, 5 e 6.
25. Todas as contas têm uma superfície ligeiramente rugosa em comparação com contas nuas. A rugosidade surge da encapsulação dos absorventes. Confirmação de que encapsulação era homogênea dentro das contas pode ser obtida cortando as contas antes da secagem e obtendo-se imagem do interior com microscopia eletrônica de escaneamento (não mostrada aqui). Absorventes parecem ser homogeneamente distribuídos dentro da matriz de pectinato. Esses resultados mostram que apesar das dificuldades de formulação devido à alta viscosidade das soluções de pectina, e dos problemas de separação de fase, é possível incorporar quantidades importantes de absorventes dentro das soluções de pectina e então formar contas
- 30

de Zn-pectinato ou Ca-pectinato encapsulando uma quantidade grande desses absorventes.

- 5 As propriedades de estabilidade e absorção das contas preparadas de acordo com os métodos descritos aqui foram avaliadas nos Exemplos apresentados abaixo.

Sistema de Aplicação de Fármaco Incluindo as Contas de Pectina

- 10 As contas de pectina podem ser coletadas, e combinadas com excipientes apropriados e formuladas em uma variedade de dispositivos de aplicação de fármaco oral. Por exemplo, as contas podem ser combinadas com um excipiente sólido e moldadas em comprimido ou incluídas em uma cápsula.

As contas de pectina podem ser também combinadas com excipientes líquido/gel que não degradam as contas de pectina, e a mistura/dispersão pode ser incorporada a uma cápsula, tal como uma *gel-cap*.

- 15 Os comprimidos ou cápsulas feitos com as contas de pectina podem ser revestidos, se desejado, com um revestimento entérico adequado para prover estabilidade aumentada enquanto no estômago sem degradação. O pH no estômago é da ordem de 1 a 3 mas aumenta no intestino delgado e no colo para atingir valores próximos a 7 (Hovgaard, L. e outros, 20 (1996) **Current Applications of Polyssacharides in Colon Targeting**, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13, 185). Os dispositivos de aplicação de fármaco, na forma de comprimidos, cápsulas de gelatina, esferóides e similar contendo as contas de pectina, podem atingir o colo, sem ser expostos a essas variações em pH, através de seu revestimento 25 com um polímero dependente do pH, insolúvel a pH ácido mas solúvel em pH neutro ou alcalino (Kinget e outros, op. cit.). Os polímeros mais atualmente usados para este propósito são derivados de ácido metacrílico, Eudragit® L e S (Ashford, M. e outros, (1993), **An in vivo investigation into the suitability of pH dependent polymers for colonic targeting**, *International Journal of Pharmaceutics*, 95, 193 e 95, 241; e David A. e outros (1997) **Acrylic polymers for colon-specific drug delivery**, *S.T.P. Pharma Sciences*, 7, 546).
- 30

Os dispositivos de aplicação de fármaco são administrados em

uma quantidade escolhida adequada para prover tratamento ou prevenção eficiente dos distúrbios para os quais os absorventes são administrados. Idealmente, a dose eficaz dos absorventes descrita aqui é suficiente para prover os efeitos de absorção desejados no colo, que podem variar dependendo da natureza da substância a ser absorvida.

Tipicamente, a dose eficaz dos absorventes está em uma quantidade de menos do que 100 mg/kg de peso do corpo, freqüentemente menos do que 1 mg/kg por peso do paciente e geralmente, mas freqüentemente, entre cerca de 10 mg a menos do que 100 mg/kg de peso do paciente. As doses eficazes acima tipicamente representam a quantidade administrada como uma dose única, ou como uma ou mais doses administradas durante um período de 24 horas.

IV. Métodos de Tratamento Usando os Dispositivos de Aplicação de Fármaco contendo contas de pectina absorventes

Os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser usados para tratar aqueles tipos de condições e distúrbios para os quais aplicação colônica dos absorventes é apropriada. Em uma modalidade, os distúrbios são aqueles que resultam da exposição do colo a antibióticos, tal como diarreia. Nesta modalidade, os absorventes inativam antibióticos, e os dispositivos podem ser administrados em uma dosagem terapeuticamente eficaz a um paciente ao qual foi, está sendo ou será dado um antibiótico. Qualquer antibiótico que possa ser absorvido no/sobre o absorvente pode ser inativado. Exemplos representativos de classes de antibióticos que podem ser absorvidos incluem beta-lactamas, ciclinas, macrólidos, quinolonas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, sulfamidas, fenicóis, sulfamidas, furanos, polipeptídeos, oxazolidonas e antibióticos tal como fosfomicina, rifampin e similar.

Em uma outra modalidade, os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser administrados a um paciente que sofre dos efeitos de toxinas bacterianas ou fúngicas presentes no colo. Exemplos de tais toxinas incluem monotoxinas, endotoxinas e enterotoxinas, tal como aquelas produzidas por *Clostridium difficile* (acreditada ser a causa principal de diarreia pós-antibiótico em todo o mundo). Nesta modalidade, os absorventes são

administrados em uma dosagem terapeuticamente eficaz para absorver as toxinas.

Em uma outra modalidade, os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser administrados a um paciente que sofre de um distúrbio tratado com agentes farmacologicamente ativos que se ligam a receptores relevantes no corpo do paciente que não no colo para tratar o distúrbio, mas que, quando ligados a receptores no colo, resultam em efeitos colaterais. Por exemplo, o colo inclui receptores colinérgicos (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>) e serotonina, que estão também presentes no sistema nervoso central. Tratamento com agentes que se ligam a receptores colinérgicos pode resultar em efeitos colaterais se os compostos se ligarem a receptores no colo. Co-administração das partículas absorventes descritas aqui e dos agentes que se ligam a tais receptores pode minimizar ou eliminar esses efeitos colaterais.

Sabe-se que problemas gastrintestinais são reações de fármaco adversas geralmente relatadas com medicações para pressão sangüínea (bloqueadores de Canal de Cálcio), medicações para dor (especialmente narcóticos), antidepressivos, antiácidos que contêm alumínio e cálcio, fármacos antiparkinson, antiespasmódicos, diuréticos e anticonvulsivos, e que muitas classes de fármaco estão associadas com constipação. Frequentemente, a constipação persiste, e pacientes descontinuem o tratamento porque o efeito colateral é incômodo (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>). Fármacos tal como risperidona podem ser associados com distúrbios colônicos, tal como megacolo (<http://www.sma.org.sg/smi/4310/4310cr2.pdf>).

A presente invenção será compreendida mais com referência aos exemplos não-limitantes que seguem.

Exemplo 1: Estabilidade de contas carregadas em meios gastrintestinais simulados

O tempo de dissolução de formulações selecionadas, preparadas usando os métodos descritos acima, foi avaliado em meio gástrico simulado (SGM) (USP XXIV) (Tabela 1), meio intestinal simulado (SIM) (USP

XXIV) (Tabela 2) e meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas (SCM) (Tabela 3), sob agitação tangencial leve a 37° C.

	<i>Estabilidade em SGM</i> (pH = 1,2)	
	Contra-íon	
	Cloreto de Cálcio	Acetato de Zinco
Pectina (3% p/v) + Atapulgita (3% p/v)	Nenhuma desintegração após 6 h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Caulim (5% p/v)	Nenhuma desintegração após 6h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	Desintegração começa após 6 h	Nenhuma desintegra- ção após 6 h

Tabela 1: Tempo de desintegração no meio gástrico simulado quando cloreto de cálcio é substituído por acetato de zinco (6% p/v) para gelação ionotrópica. As contas foram lavadas apenas uma vez para este conjunto de experimento.

	<i>Estabilidade em SIM (pH = 6,8)</i>	
	Contra-íon	
	Cloreto de Cálcio	Acetato de Zinco
Pectina (3% p/v) + Atapulgita (3% p/v)	Desintegração come- ça após 4 h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Caulim (5% p/v)	Desintegração come- ça após 2h30	Não testado
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	Desintegração come- ça após 2h30	Nenhuma desintegra- ção após 6h

Tabela 2: Tempo de desintegração no meio intestinal simulado quando cloreto de cálcio (6% p/v) é substituído por acetato de zinco (6% p/v) para gelação ionotrópica. As contas foram lavadas apenas uma vez para este conjunto de experimento.

- 5 Aumento da estabilidade nos meios intestinal e colônico simulados é observada quando cloreto de cálcio é substituído por acetato de zinco para gelação ionotrópica.

	Contra-íon Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com en- zimas pectinolíti- cas (5200 PG/mL) Após 5 h em SIM
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	4 a 6	Desintegração antes de 5 h	Não testado
	8	Nenhuma desin- tegração após 5h	Desintegração começa após 3 h
	10		
	12		

- 10 **Tabela 3:** Estabilidade de contas de Zn-pectinato preparadas com concentrações diferentes de solução de acetato de zinco, em SIM e em SCM após 5 h em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 5 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Quanto maior a concentração de zinco usada para gelação ionotrópica, mais estável as contas em meio intestinal simulado (Tabela 3).

	Contra-íon Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3%p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	8	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h

	10	Desintegração começa após 1h Total desintegração após 2h30
	12	Desintegração começa após 1h Total desintegração após 3h

Tabela 4: Estabilidade de contas de Zn-pectinato preparadas com concentrações diferentes de acetato de zinco, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Sem pré-incubação em meio intestinal simulado, para concentrações de zinco maiores do que 8% (p/v), o tempo de desintegração em meio colônico simulado é compreendido entre 1 e 3 horas (Tabela 4).

	Mistura de contra-íon		Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
	Acetato de zinco (% p/v)	Cloreto de cálcio (% p/v)		
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	6	3	Nenhuma desintegração após 5h	Desintegração começa após 3 h
		6		
	12	3	Nenhuma desintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
		6		

Tabela 5: Estabilidade de contas de Zn-Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de misturas de acetato de zinco e cloreto de cálcio, em SIM e em SCM após 5 h em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Adição de cloreto de cálcio à solução de acetato de zinco a 6% usada para gelação ionotrópica aumenta a estabilidade das contas em SIM conforme comparado com contas preparadas sem cálcio (Tabela 5). No en-

tanto, nenhuma diferença é observada quando CaCl_2 é adicionado à solução de acetato de zinco a 12%.

	Mistura de contra-íon		Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
	Acetato de zinco (% p/v)	Cloreto de cálcio (% p/v)	
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	6	3	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 2h30
		6	
	12	3	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h
		6	

Tabela 6: Estabilidade de contas de Zn-Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de misturas de acetato de zinco e cloreto de cálcio, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Sem pré-incubação em SIM, a estabilidade das contas em SCM é aproximadamente a mesma para as concentrações de zinco e cálcio diferentes que foram avaliadas. O tempo de desintegração em meio colônico simulado é compreendido entre 1 e 3 horas (Tabela 6).

	Contra-íon Cloreto de cálcio (% p/v)	Revestimento PEI (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	2	0,6	Nenhuma desintegração após 5 h	Desintegração começa após 5 h
		0,8		
		1		

	6	0,6	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 5 h
		0,8		
		1		

Tabela 7: Estabilidade de contas de Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de cloreto de cálcio e revestidas com polietilenoimina, em SIM e em SCM após 5 h em SIM. O processo de lavagem de contas consistia no enxágüe de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Revestimento PEI consideravelmente aumenta a estabilidade das contas em ambos meio intestinal simulado e meio colônico simulado conforme comparado com contas de Ca-pectinato não-revestidas (Tabela 7).

	Contra-íon Cloreto de cálcio (% p/v)	Revestimento PEI (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pecti- nolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + carvão ativado (5% p/v)	2	0,6	Desintegração co- meça após 5 h
		0,8	
		1	
	6	0,6	Desintegração co- meça após 5 h
		0,8	
		1	

Tabela 8: Estabilidade de contas de Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de cloreto de cálcio e revestidas com polietilenoimina, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

Sem pré-incubação em SIM, revestimento PEI consideravelmente aumenta a estabilidade das contas no meio colônico simulado conforme comparado com contas de Ca-pectinato não-revestidas (Tabela 8).

			Contra- íon Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com en- zimas pectinolí- ticas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v) + <u>Agente de desinte- gração</u>	d-lactose USP (% p/v)	10	10	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
			12		
		20	10	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
	PVP <i>Kol- lidon</i> [®] <i>K17 PF</i> (% p/v)	0,5	10	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
		1		Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
		5			
		10			
	POE Monoo- leato sorbitano <i>Tween</i> [®] 80 (% p/v)	1	10	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 4 h
		5		Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração total após 3 h
		10		Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 1h30 Desintegração total após 3 h
	Poloxâ- mero 188 <i>Lutrol</i> [®] <i>F68</i> (% p/v)	0,1	10	Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 3h
		0,5			
		1			
		5		Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 2h Desintegração total após 3h15

		10		Nenhuma de- sintegração após 5 h	Desintegração começa após 2h30 Desintegração total após 4h
--	--	----	--	--	--

Tabela 9: Estabilidade de contas de pectinato de zinco incluindo um agente de desintegração, em SIM e SCM após 5 h 'em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-

5 Q para cerca de 200 contas

Os agentes de desintegração diferentes testados não influenci-
am a estabilidade das contas no SIM: todas as formulações são estáveis por
pelo menos 5 horas (Tabela 9). A inclusão de d-lactose ou Kollidon® K17 não
modifica o tempo de desintegração das contas no SCM após incubação no
10 SIM, conforme comparado com contas de Zn-pectinato preparadas sem a-
gente de desintegração. Por outro lado, concentrações grandes de Tween®
80 (c=10% (p/v)) e concentrações médias de Lutrol® F68 (c=5% (p/v)) dimi-
nuem a estabilidade das contas em SCM após incubação no SIM. Para
Tween® 80 (c=10% (p/v)), a desintegração começa após 1,5 hora de incuba-
15 ção em SCM e termina após 3 horas. Para Lutrol® F68 (c=5% (p/v)), a desin-
tegração começa após 2 horas de incubação em SCM e termina após 3 ho-
ras e 15 minutos.

			Contra- ção Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectínicas (5200 PG/mL)
	d-lactose USP (% p/v)	10	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 2h30
			12	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 4h
		20	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h

Pectina (3% p/v) + Carvão ativa- do (5% p/v) + Agente de desintegra- ção	PVP <i>Kollidon</i> [®] K17 PF (% p/v)	0,5	10	Não testada
		1		Desintegração começa após 45 min Desintegração total após 1h15
		5		
		10		
	POE Monoo- leato sor- bitano <i>Tween</i> [®] 80 (% p/v)	1	10	Desintegração começa após 2h Desintegração total após 3h30
		5		Desintegração começa após 30 min Desintegração total após 1h15
		10		
	Poloxâ- mero 188 <i>Lutrol</i> [®] F68 (% p/v)	0,1	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 1h30
		0,5		Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 1h30
		1		Desintegração começa após 30 min Desintegração total após 1h30
		5		Desintegração começa após 30 min Desintegração total após 1h15
		10		Desintegração começa após 2h30 Desintegração total após 4h

Tabela 10: Estabilidade de contas de pectinato de zinco incluindo um agente de desintegração, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 100 contas.

Como já observado com pré-incubação em SIM, duas formulações são de interesse quando se precisa de desintegração rápida: Tween[®] 80 (c=10% (p/v)) e Lutrol[®] F 68 (c=5% (p/v)) (Tabela 10).

Exemplo 2: Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com absorventes limitados

Absorção de três absorventes de grau farmacêutico foi testada quanto à amoxicilina e ciprofloxacina sob condições colônicas estimuladas através da determinação da concentração residual de antibióticos, usando HPLC. O meio colônico simulado (SMC) usado para esses experimentos foi

- o que segue: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6). Absorventes foram incubados no meio colônico descrito acima a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as suspensões foram coletadas e centrifugadas a 10.000 RPM Usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em uma unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm; Millipore, França) e ensaiado quanto à sua concentração de antibiótico usando HPLC. Amostras de controle dos SCM testados foram incubadas com as mesmas condições experimentais. A porcentagem de antibióticos restante no SCM após incubação com absor-
- 5
- 10
- ventes foi determinada através de comparação com controles incubados.

Cinética de absorção de amoxilina

- A capacidade da atapulgita, carvão ativado e caulim em absorve amoxilina em condições colônicas simuladas foi estudada. A concentração de amoxilina antes e após exposição dos absorventes foi determinada usando HPLC acoplada com detecção de UV ($\lambda=230$ nm). A separação foi conseguida usando Ypersphere® 5 µm (250 x 4,6 mm, Interchim, França), uma coluna de fase reversa C18, em temperatura ambiente. A fase móvel consistia em uma solução de fosfato a 95% (KH₂PO₄, 0,01M, acidificada em pH 3 com ácido ortofosfórico) e mistura de acetonitrila a 5%. A taxa de fluxo foi
- 15
- 20
- fixada a 1,3 mL/min. Condições experimentais e resultados de experimentos de ligação com amoxilina são mostrados na Tabela 11.

[Atapulgita] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180	-		
20	1	0, 30, 60, 180	-		

Continuação...

[Atapulgita] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absor- ção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈45
200	1	0, 180, 900	+	>360	≈25

[Caulim] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180	-		
20	1	0, 30, 60, 180	-		
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈25
200	1	0, 180, 900	+	>180	≈30

[Carvão ativa- do] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incu- bação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
**1	1	0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 360	+	15-30	~25
**5	1	0, 5, 15, 30, 45, 60	++	15	75

Continuação...

[Carvão ativado] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
*10	0,5	0, 5, 15,30, 60, 120, 180, 360	++	15	>95
**	1	0, 5,15,30, 45, 60	++	15	>95

*figura 7.

**figura 8.

Tabela 11: Condições experimentais e características da eliminação de amoxilina através de absorção nos absorventes limitados.

As figura 7 e 8 apresentam a porcentagem de amoxilina eliminada (0,5 e 1 mg/mL) versus tempo de contato com cada absorvente testado, em SCM sem enzimas pectinolíticas. Conforme mostrado nessas figuras, absorção de amoxilina é muito eficiente com carvão ativado enquanto ela é observada em um grau menor com atapulgita e caulim. Após 6 horas de incubação, a porcentagem de amoxilina eliminada a partir de absorventes diferentes variou de a partir de em torno de 25% até 95% com redução maior para carvão ativado. Esses resultados mostram que a máxima de absorção é sempre atingida após um tempo de contato relativamente curto com carvão ativado. O platô aparece após 15 a 30 ml de incubação sem importar a concentração de amoxilina testada (0,5 e 1 mg/mL) e a quantidade de carvão (1, 5 e 10 mg/mL). Atapulgita e caulim realmente reduzem a concentração de amoxilina, mas para concentração maior (200 mg/mL) e o estado fixo é atingido apenas após 6 horas.

Ainda, resultados apresentados na figura 8 demonstram que a velocidade de absorção não está relacionada com a concentração de carvão. No entanto, a quantidade de amoxilina absorvida na saturação é fortemente dependente da dose.

Os resultados obtidos para carvão ativado foram muito promiss-

- sores. Eles evidenciam que particularmente pequenas quantidades deste absorvente (1 mg/mL a 10 mg/mL) permitem que uma pessoa elimine amoxilina em uma concentração compreendida entre 0,250 mg/mL e 1 mg/mL de fezes. A partir do que é sabido sobre farmacologia de amoxilina, a concentração residual esperada de amoxilina em fezes (em torno de 5 a 10% de doses orais padrão (1 a 2 g/dia)) que corresponde a 0,08 a 0,33 mg/mL de fezes. Esta faixa de concentração está de acordo com a faixa de concentração que as partículas descritas aqui são capazes de inativar.

Cinética de absorção de ciprofloxacina

- 10 A concentração de ciprofloxacina após contato com absorventes limitados foi determinada usando HPLC acoplado com detecção UV a 278 nm. Amostras de controle foram preparadas tal conforme acima mencionado. A separação foi conseguida a 25° C, usando uma coluna Symmetry® C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm; Waters, França). A fase móvel era 10% de acetonitrila em 0,02M de solução de NaH₂PO₄ (acidificada em pH 3 com ácido ortofosfórico). A taxa de fluxo era 1 mL/min.
- 15

A Tabela 12 apresenta as condições experimentais e os resultados de cinética de absorção com ciprofloxacina.

[Atapulgita] (mg/mL)	(ciprofloxacina) (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45
[Caulim] (mg/mL)	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	+	15	≈10
10	100	0, 15, 60, 180	++	15-30	≈80

[Carvão ativado] (mg/mL)	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	++	15	>95
**10	500	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45

*figura 9.

**figura 10.

Tabela 12: Condições experimentais e características da eliminação de ciprofloxacina através de absorção em absorventes limitados.

5 A figura 9 apresenta a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo de incubação com matrizes absorventes. Em comparação com amoxicilina, foi observado que a velocidade de absorção é mais rápida para os três absorventes testados. O platô é atingido entre 15 e 30 minutos independentemente do absorvente usado. Como já visto
10 com amoxicilina, carvão ativado exibe capacidade de absorção maior do que a atapulgita, que é mais eficiente do que caulim. Conforme mostrado na figura 10, quando a concentração de ciprofloxacina é aumentada cinco vezes, o equilíbrio de absorção em carvão ainda acontece após 15 a 30 minutos de incubação. Além disso, carvão ativado a 1 mg/mL era ainda eficiente na eliminação de antibiótico através de absorção (45% de 0,5 mg/mL), que era
15 eliminado em 15 a 30 minutos. Mesmo que apenas 45% da concentração inicial tenham sido inativados, ela ainda representa quantitativamente uma quantidade maior de antibiótico eliminada através de absorção: em torno de 0,225 mg/mL. Esses resultados estão de acordo com a concentração residual esperada de ciprofloxacina em fezes, que significa um máximo de 25%
20 de doses orais (1 a 1,5 g/dia), isto é, em torno de 0,420 mg/mL a 0,625 mg/mL.

Exemplo 3: Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com absorventes encapsulados

25 Experimento 1: Contas de pectinato de Ca encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). As contas foram lavadas apenas uma vez para este experimento. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para esta estudo era o que segue:
30 solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/20; v/v).

- As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Cinética de absorção de ciprofloxacina

A Tabela 13 representa condições experimentais e porcentagens de ciprofloxacina eliminada através da absorção a partir de carvão ativado após sua liberação a partir de contas de pectinato de Ca.

Conta de Ca-pectinato carregada com carvão ativado	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Ciprofloxacina eliminada (%)
1 conta/mL	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	>95
	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	
	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	
	100	0, 15	+		59
	500	0, 15, 60	+	>60	≈40
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45

- 10 **Tabela 13:** Condições experimentais dos experimentos de ligação e parâmetros de eliminação de ciprofloxacina através da absorção em carvão ativado liberado de contas de Ca-pectinato, sob condições colônicas simuladas.

- Usando um SCM contendo pectina a 1/20, contas de Ca-pectinato desintegraram completamente após mais ou menos 30 minutos. As 15 figuras 11 a e b mostram que a ciprofloxacina foi eliminada através de ab-

sorção quando incubada com contas carregadas com carvão em SCM. Estado fixo foi retardado em comparação com experimentos de ligação com absorventes limitados. As diferenças observadas em velocidade de absorção poderiam resultar do tempo que leva para a matriz de pectinato desintegrar.

- 5 Em equilíbrio de absorção, a quantidade de ciprofloxacina eliminada através de absorção era quantitativamente a mesma que a quantidade absorvida no carvão não-encapsulado. Isto significa que o carvão ativado foi na verdade liberado das contas quando incubado em SCM contendo pectinases e que sua capacidade de absorção não foi afetada pela encapsulação.
- 10 Experimento 2: Contas de Ca-pectinato e Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de cálcio usada para gelação ionotrópica era 6% (p/v) e concentração de zinco usada para gelação ionotrópica era 6% (p/v). Uma lavagem suave foi realizada; as contas foram lavadas a-
- 15 penas uma vez para este experimento. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para esta estudo foi o que segue: solução de HEPES (2,838 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex[®] SPL Ultra,
- 20 Sigma, França)(1/20; v/v).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos desejados, amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex[®]-

25 HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC. Tipicamente, uma conta foi incubada com 1,5 mL de SCM.

A figura 12 mostra que ambos tipos de contas (Ca e Zn) são capazes de absorver ciprofloxacina. A cinética de absorção é mais longa para contas de Zn-pectinato, provavelmente devido a seu tempo de desintegração

30 mais lento no SCM. A capacidade de absorção de carvão ativado liberado a partir de contas de Ca-pectinato tende a atingir a saturação após 3 horas de incubação enquanto eliminação de ciprofloxacina através de absorção em

carvão ativado liberado de contas de Zn-pectinato ainda aumenta após 4 horas de contato.

Conforme mostrado na figura 13, cerca de 40% da ciprofloxacina inicial são eliminados através de absorção após 4 horas de incubação em SCM.

5 Experimento 3: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelação ionotrópica era 10% (p/v). Para este experimento, as contas foram lavadas três vezes por 1 minu-
10 to. A eficiência do absorvente em reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o que segue: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (0,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/5; v/v). Tipicamen-
15 te, uma ou duas contas foram incubadas com SCM contendo 100 µg/ml de ciprofloxacina (2 mg ou 5 mg de contas/mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma mi-
20 crocentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 14, a cinética de absorção de ciprofloxacina por contas de Zn-pectinato carregadas com carvão ativado é um processo em duas etapas. Antes das contas serem completamente de-
25 sintegradas, ciprofloxacina é absorvida lentamente e fracamente (em torno de 10% ou 30% absorvida durante a primeira hora de incubação, para SCM de contas de 2 mg ou 5 mg respectivamente). Após uma hora de incubação, as contas liberaram seu teor de carvão e a absorção é mais rápida e mais forte. Após 4 horas de incubação até 70% da ciprofloxacina inicial são elimi-
30 nados por uma concentração de carvão de SCM de 2 mg/mL. Um aumento da quantidade de conta para SCM 5 mg/mL leva a um aumento da velocidade de absorção na matriz; processo de absorção tende a um platô após 2

horas de incubação e após 4 horas até 95% da ciprofloxacina inicial ser removida através de absorção.

Experimento 4: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelação ionotrópica era 10% (p/v). As contas foram formuladas com 10% (p/v) de Tween 80. As contas foram lavadas três vezes por 1 minuto. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/5; v,v). Tipicamente, uma conta foi incubada com SCM contendo 100 µg/mL de ciprofloxacina (2 mg de contas/1 mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada com seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 15, ciprofloxacina absorveu lentamente e fracamente: apenas 10% da concentração inicial tinham absorvido após 3 horas de incubação mesmo que o carvão ativado tenha sido liberado das contas. Ciprofloxacina pode estar em competição com Tween 80 para absorção em carvão ativado.

Experimento 5: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelação ionotrópica era 10% (p/v). As contas foram formuladas com 5% (p/v) Lutrol® F68. As contas foram lavadas três vezes por 1 minuto. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma,

França) (1/5; v/v). Tipicamente, uma ou duas contas foram incubadas com SCM contendo 100 µg/mL de ciprofloxacina (2 mg ou 5 mg de contas/mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. No tempo de ponto desejado as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 16, a quantidade de ciprofloxacina eliminada através de absorção em carvão ativado liberado de contas de Zn-pectinato preparadas com Lutrol® F68 aumenta até ela atingir um platô após 2 a 3 horas de incubação, independentemente da quantidade de contas usadas. A ciprofloxacina eliminada é em torno de 30% e 60% da concentração inicial após 3 horas de incubação, para concentração de conta de SCM 2 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente. A capacidade de absorção de carvão ativado parece ser afetada pela presença de Lutrol® F68.

Experimento 6: Controles para absorção de ciprofloxacina em contas carregadas com carvão: eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com "contas nuas"

"Contas nuas" foram usadas para esses experimentos. Contas de Ca-pectinato e Zn-pectinato foram preparadas com uma solução de pectina a 3% (p/v) e com solução de acetato de zinco a 6 e 10% p/v respectivamente, conforme mencionado para contas carregadas com absorvente. Ciprofloxacina (100 µg/ml) foi incubada com "contas nuas" sob as mesmas condições experimentais que testes de ligação com contas carregadas. Com base no fato de que uma conta carregada com carvão incluía em torno de 0,5 mg de pectina, testes de controle foram realizados usando solução de ciprofloxacina em proporção 1 mL/0,5 mg de contas nuas. A concentração de antibiótico residual foi determinada usando HPLC-UV mista, conforme acima descrito. Após 3 horas de incubação, o nível de ciprofloxacina em amostras testadas não difere de controles (Tabelas 14 e 15). A quantidade de antibiótico permaneceu constante, demonstrando que a ciprofloxacina

não foi absorvida pela pectina.

Tempo de incubação (min)	Concentração de Ciprofloxacina (µg/mL)		
	15	60	189
Controles (sem contas) (n=3)	95,6±0,1	95,7±0,1	95,9±0,4
Com contas nuas de Ca-pectinato (n=3)	95,50±,1 96,2±0,2	95,9±0,1 96,6±0,25	95,1±0,3 95,3±0,5

Tabela 14: Concentração de ciprofloxacina residual após incubação sem ou com contas de pectinato de cálcio nuas, em SCM (enzimas pectinolítica: 1/20)

Tempo de incubação (min)	Concentração de Ciprofloxacina (µg/mL)		
	30	60	180
Controles (sem contas) (n=2)	106±0,1	106±0,1	107±0,1
Com contas nuas de Za-pectinato (n=2)	105±0,1	104±0,1	104±0,1

- 5 **Tabela 15:** Concentração de ciprofloxacina residual após incubação sem ou com contas de pectinato de zinco nuas, em SCM (enzimas pectinolítica: 1/20)

Exemplo 4: Absorção de toxinas *Clostridium difficile*

Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com absorventes encapsulados

10

Toxinas *Clostridium difficile* (A e B) foram providas pela Sigma-Aldrich (USA). Contas de Ca-pectinato encapsulando carvão ativado, substancialmente conforme acima descrito, foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A eficiência do absorvente na redução da concentração de toxinas *C. difficile* após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas.

15

O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL, Ultra, Sigma, França) (1/20; v/v). As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo toxinas *C. difficile* a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando um ensaio ELISA (kit Premier Toxins A&B da meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio).

10 Absorção rápida das toxinas incubadas em SCM foi observada, sugerindo que os sistemas de aplicação em partícula colônicos descritos aqui vão absorver toxinas bacterianas e fúngicas no colo e aliviar sintomas causados por essas toxinas.

Referências:

15 1. Leonard, F. e outros, Use of beta-lactamase producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. J. Infect. Dis., 1989, 160(2):p. 274-80.

2. Stiefel, U. e outros, Oral administration of beta-lactamase preserves colonization resistance of piperacillin-treated mice. J. Infect. Dis., 20 2003, 188(10): p. 1605-9.

3. Alegakis, A.K. e outros, In vitro study of oxytetracycline adsorption on activated charcoal. J. Environ. Sci. Health. B., 2000. 35(5): p. 559-69.

4. Browne, J.E. e outros, Characterization and adsorptive properties of pharmaceutical grade clays. J. Pharm. Sci., 1980. 69(7): p. 816-23.

5. Khalil, S.L., Mortada e M. El-Khawas, The uptake of ampicillin and amoxycilin by some adsorbents. Int. J. Pharm., 1984. 18: p. 157-167.

6. Grant, G. e outros, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. FEBS letter, 1973. 32: p. 195-198.

Cada documento referido aqui é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos.

Tendo pelo presente descrito a matéria objeto da presente invenção, deve ser aparente que muitas modificações, substituições e variações da presente invenção são possíveis à sua luz. Deve ser compreendido que a presente invenção pode ser praticada que não conforme especificamente descrito. Tais modificações, substituições e variações pretendem estar dentro do escopo do presente pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivos de aplicação oral para liberação colônica de absorventes compreendendo:

5 a) um absorvente capaz de absorver um antibiótico, uma toxina bacteriana ou fúngica, ou um agente farmaceuticamente ativo sabido causar efeitos colaterais adversos quando eles atingem o colo, e

b) um dispositivo de aplicação de fármaco feito de contas de pectina.

10 2. Sistema de aplicação de acordo com a reivindicação 1, onde a pectina é ligada com cruzamento com íons de zinco ou cálcio.

3. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 2, onde a pectina ligada com cruzamento contém um agente de desintegração.

4. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 2, onde a pectina ligada com cruzamento é reticulada com polietilenoimina.

15 5. Dispositivo de acordo com a reivindicação 4, onde a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das contas de pectina passem pelo trato gastrintestinal para o colo sem liberação do absorvente, e é também suficiente de modo que as contas de pectina são suficientemente degradadas no colo para libera uma quantidade
20 efetiva do absorvente.

6. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, onde o absorvente é selecionado do grupo consistindo em carvão ativado, argilas, talco e resinas tal como aquelas usadas em garrafas de cultura de sangue.

25 7. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 6, onde a argila é selecionada do grupo consistindo em bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, halloysita e laponita.

8. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 6, onde a sílica é selecionada do grupo consistindo em sílica coloidal, sílica mesoporosa, sílica fumê e zeólitos.
30

9. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, onde a pectina é pectina amidada.

10. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, onde o dispositivo é preparado a partir de uma solução compreendendo 1-10% (p/v) de pectina e 2-12% (p/v) de acetato de zinco ou cloreto de cálcio.

5 11. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 compreendendo ainda uma enzima que inativa um antibiótico.

12. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um antibiótico sobre flora intestinal compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um paciente, ou antes, durante ou após administração do antibiótico.

13. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de uma toxina bacteriana ou fúngica sobre flora intestinal compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um paciente.

14. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um agente farmacologicamente ativo que tem efeitos benéficos quando ele interage com receptores fora do colo, mas tem efeitos colaterais adversos quando ele interage com receptores dentro do colo, compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um paciente, ou antes, durante ou após administração do agente farmacologicamente ativo.

15. Processo para preparação de um dispositivo de aplicação de fármaco oral para aplicação de um agente ativo que inativa um antibiótico ao colo compreendendo:

a) adição de uma solução de pectina aquosa contendo um absorvente dissolvido, disperso ou suspenso, onde o absorvente inativa um antibiótico através de absorção, a uma solução aquosa de um sal catiônico divalente, de modo a se obter contas de pectina na forma de um sal catiônico incluindo o agente ativo, e

b) opcionalmente reticulação das contas resultantes através da introdução delas em uma solução aquosa de polietilenoimina.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, onde o sal catiônico é um íon de zinco ou cálcio.

17. Processo de acordo com a reivindicação 15, onde a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das contas de pectina passe através do trato gastrointestinal para o colo sem liberação do agente ativo, e é também suficiente de modo que as contas de pectina são suficientemente degradadas no colo para liberar uma quantidade eficaz do absorvente.

18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, onde o absorvente é selecionado do grupo consistindo em carvão ativado, argilas, talco e resinas para testes bacteriológicos.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, onde a argila é selecionada do grupo consistindo em bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, halloysita e laponita.

20. Processo de acordo com a reivindicação 18, onde a sílica é selecionada do grupo consistindo em sílica coloidal e sílica mesoporosa, sílica fumê e zeólitos.

21. Dispositivos de aplicação oral para liberação colônica de absorventes compreendendo:

a) um absorvente, e
b) um dispositivo de aplicação de fármaco compreendendo contas de pectina.

22. Dispositivo de aplicação oral de acordo com a reivindicação 21, onde a pectina é ligada com cruzamento com íons de zinco ou cálcio.

23. Dispositivo de aplicação oral de acordo com a reivindicação 22, onde a pectina ligada com cruzamento é reticulada com polietilenoimina.

24. Dispositivo de aplicação de fármaco oral de acordo com a reivindicação 23, onde a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das contas de pectina passe pelo trato gastrointestinal para o colo sem liberação do absorvente, e é também suficiente de modo que as contas de pectina são suficientemente degradadas no colo para liberar uma quantidade eficaz do absorvente.

25. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um antibiótico sobre flora intestinal compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24 a um paciente, ou antes, durante ou após administração do antibiótico.

- 5 26. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de uma toxina bacteriana ou fúngica sobre a flora intestinal compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24 a um paciente.

- 10 27. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um agente farmacologicamente ativo que tem efeitos benéficos quando ele interage com receptores fora do colo, mas tem efeitos colaterais adversos quando ele interage com receptores dentro do colo, compreendendo administrar o dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24 a um paciente, ou antes, durante ou após administração do
- 15 agente farmacologicamente ativo.

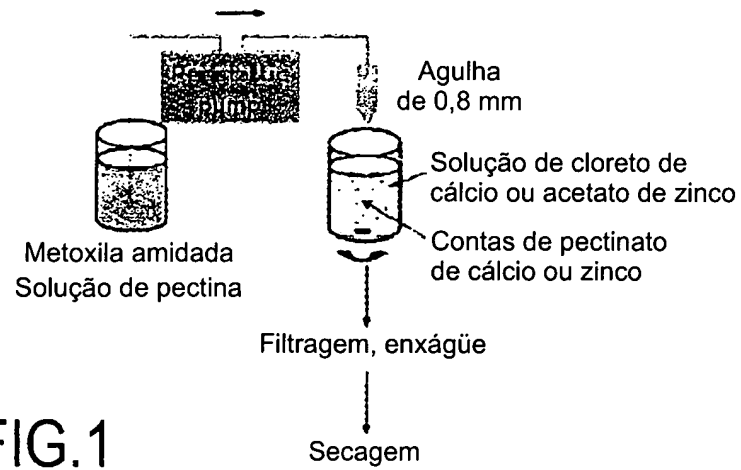


FIG.1

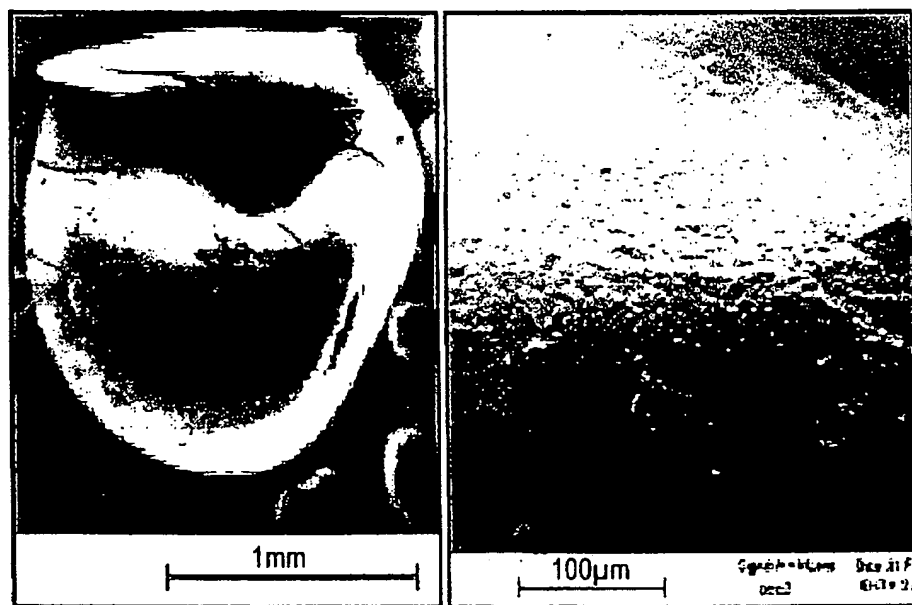


FIG.2

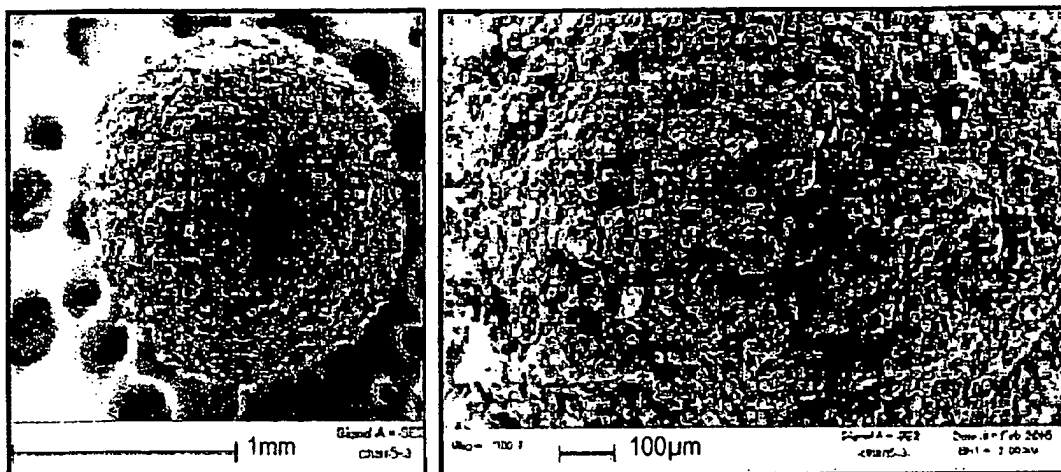


FIG.3

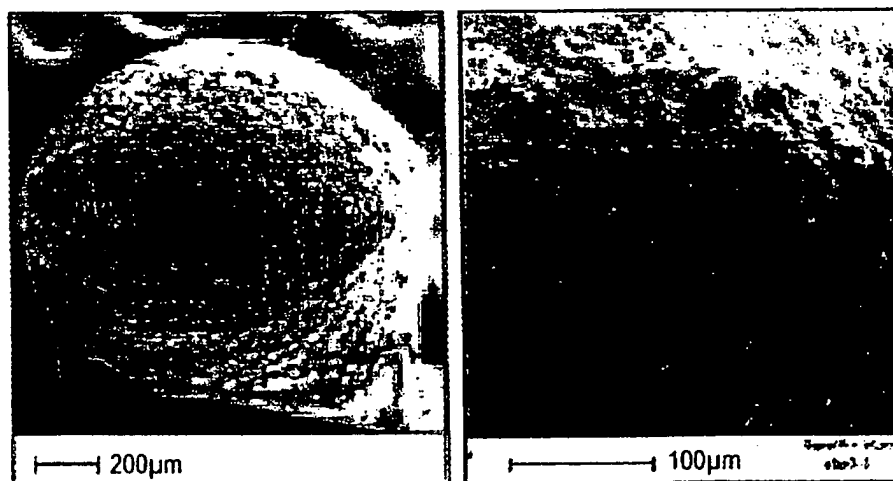


FIG.4

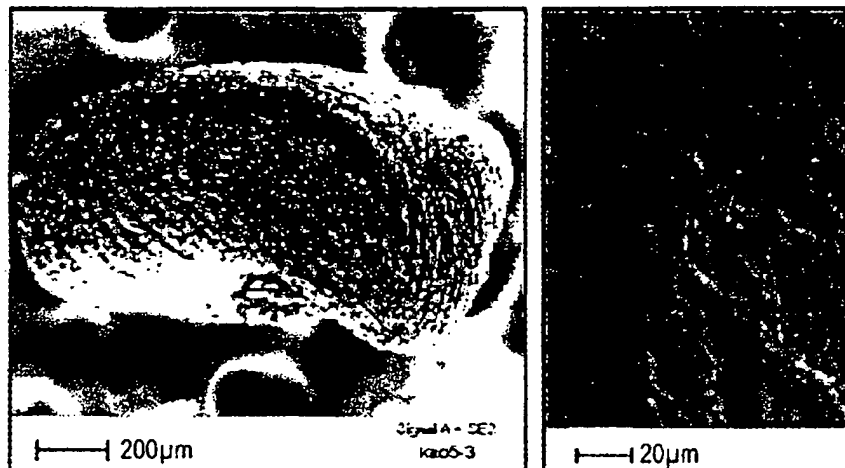


FIG.5

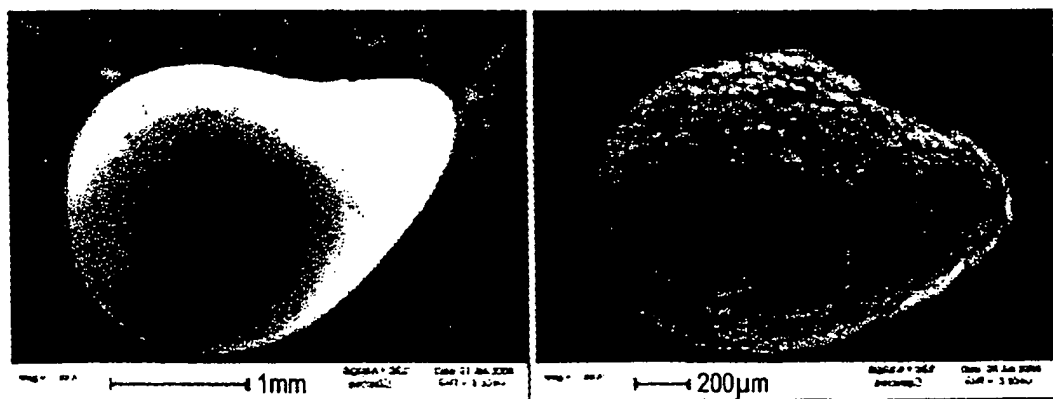


FIG.6

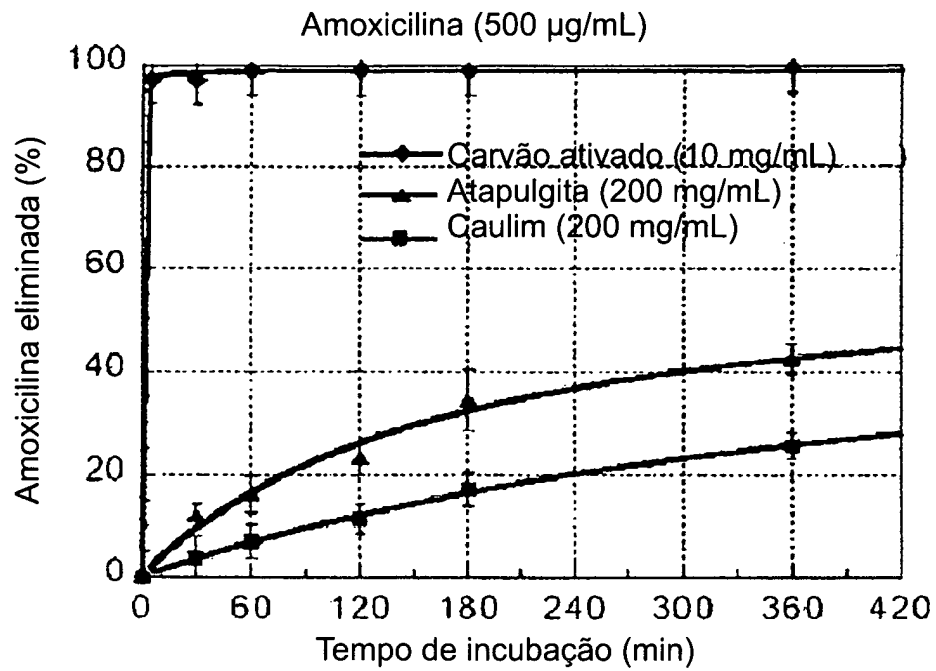


FIG.7

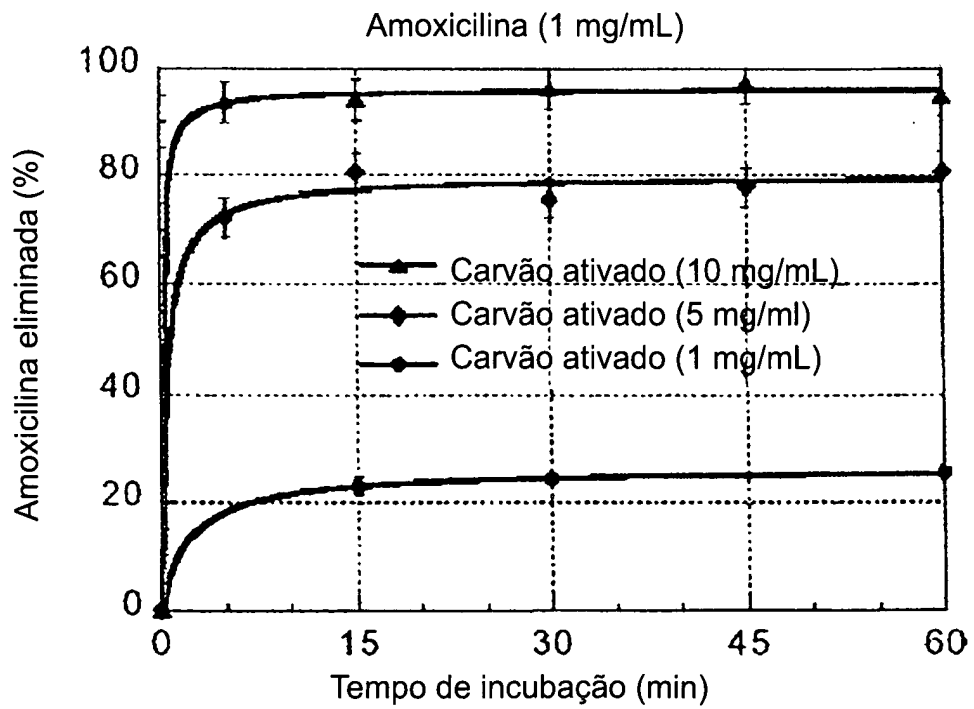


FIG.8

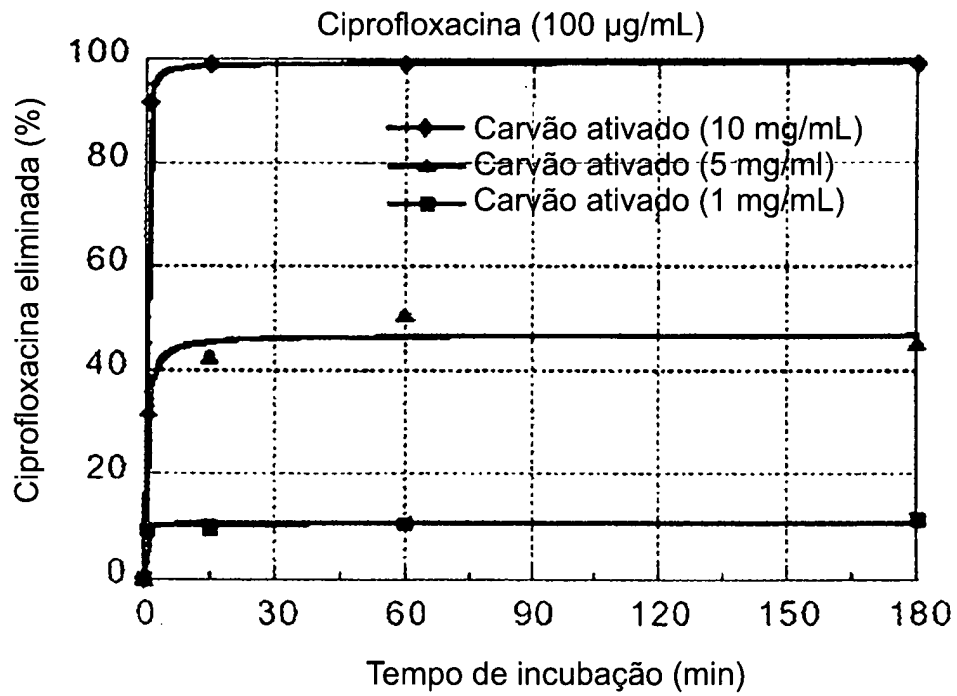


FIG.9

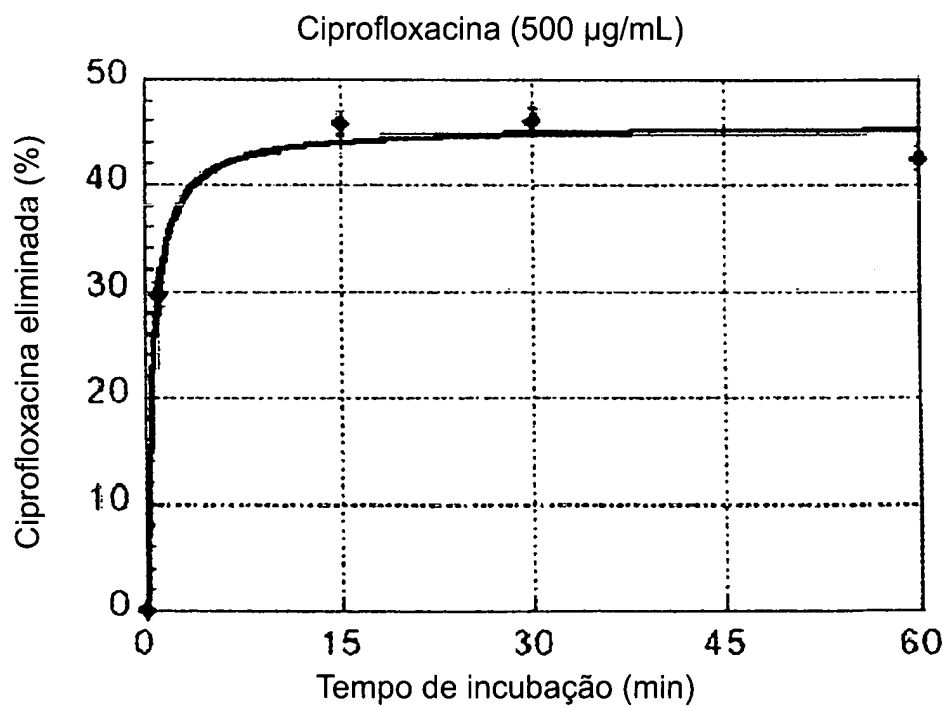


FIG.10

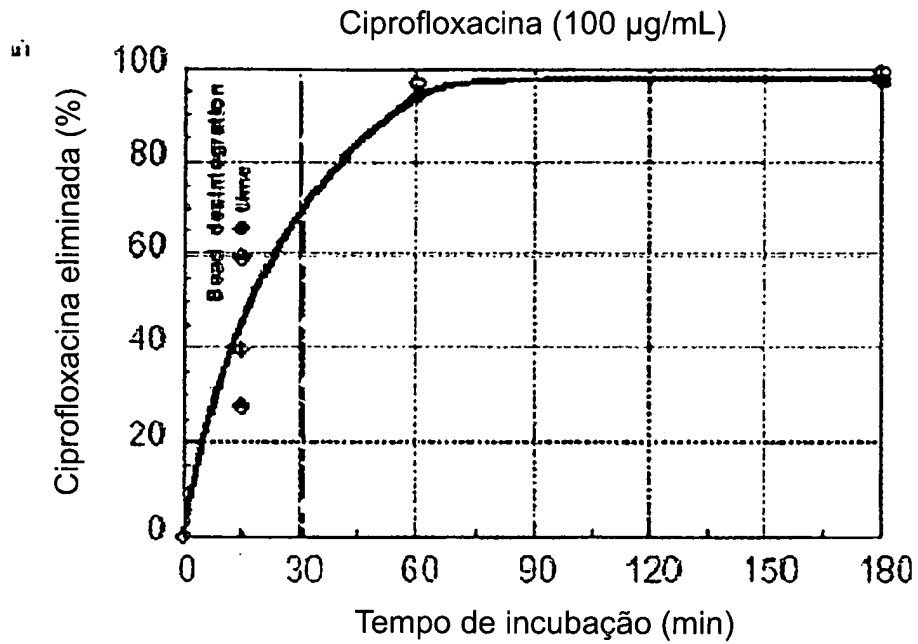


FIG.11A

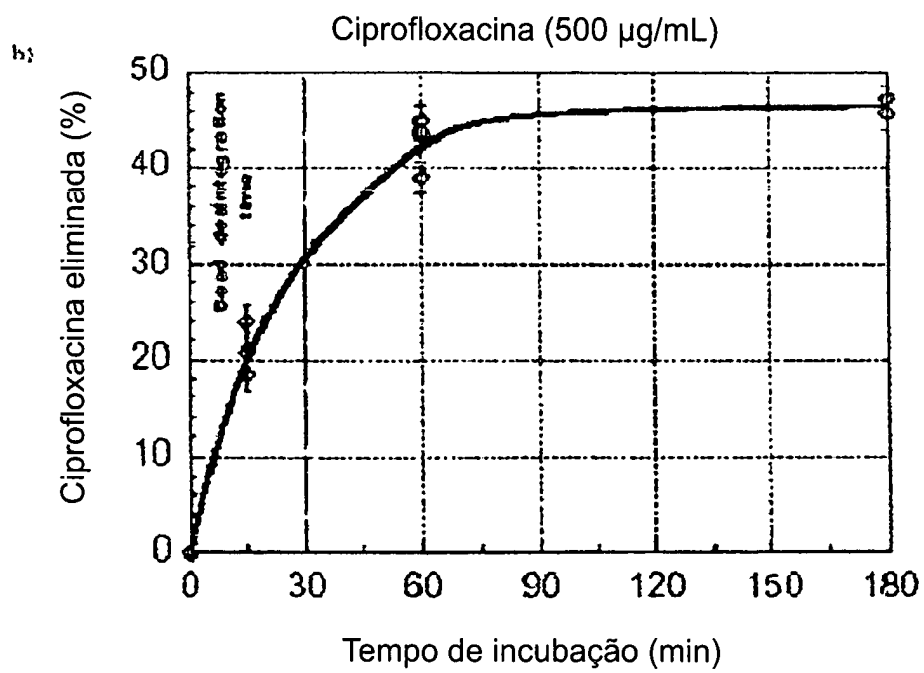


FIG.11B

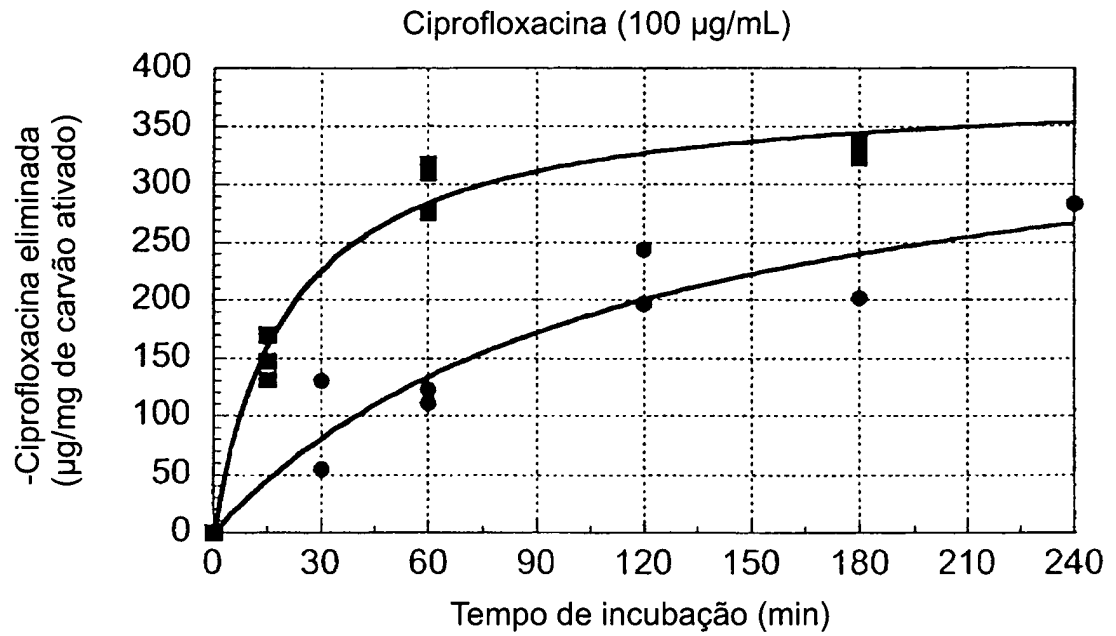


FIG.12

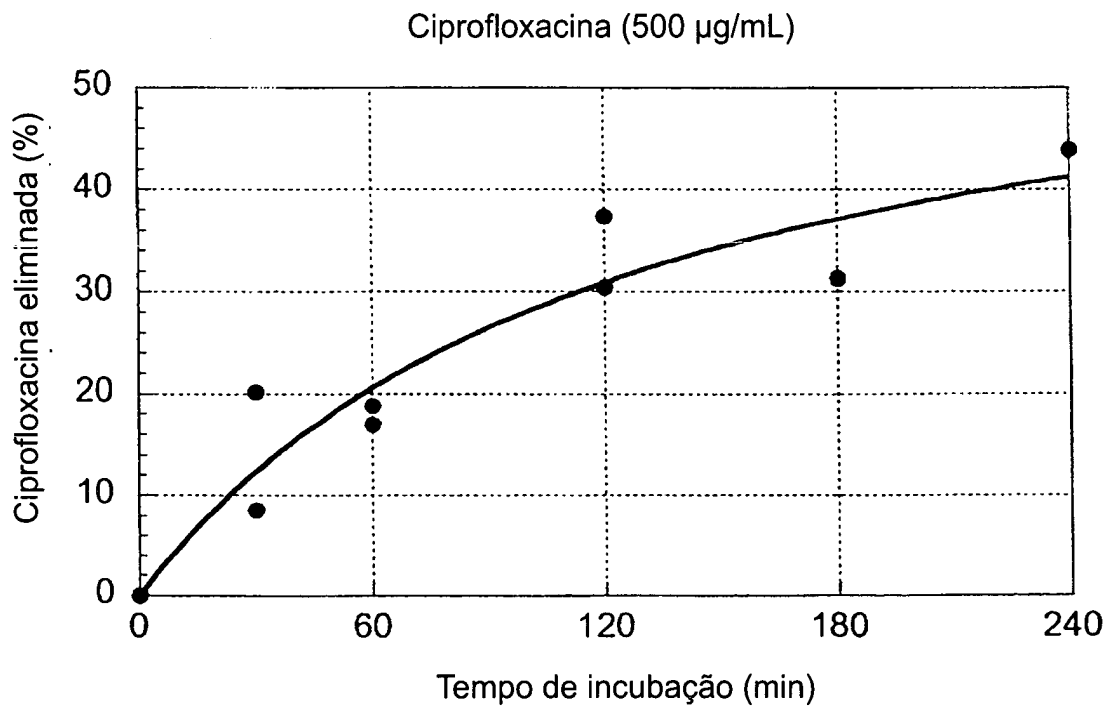


FIG.13

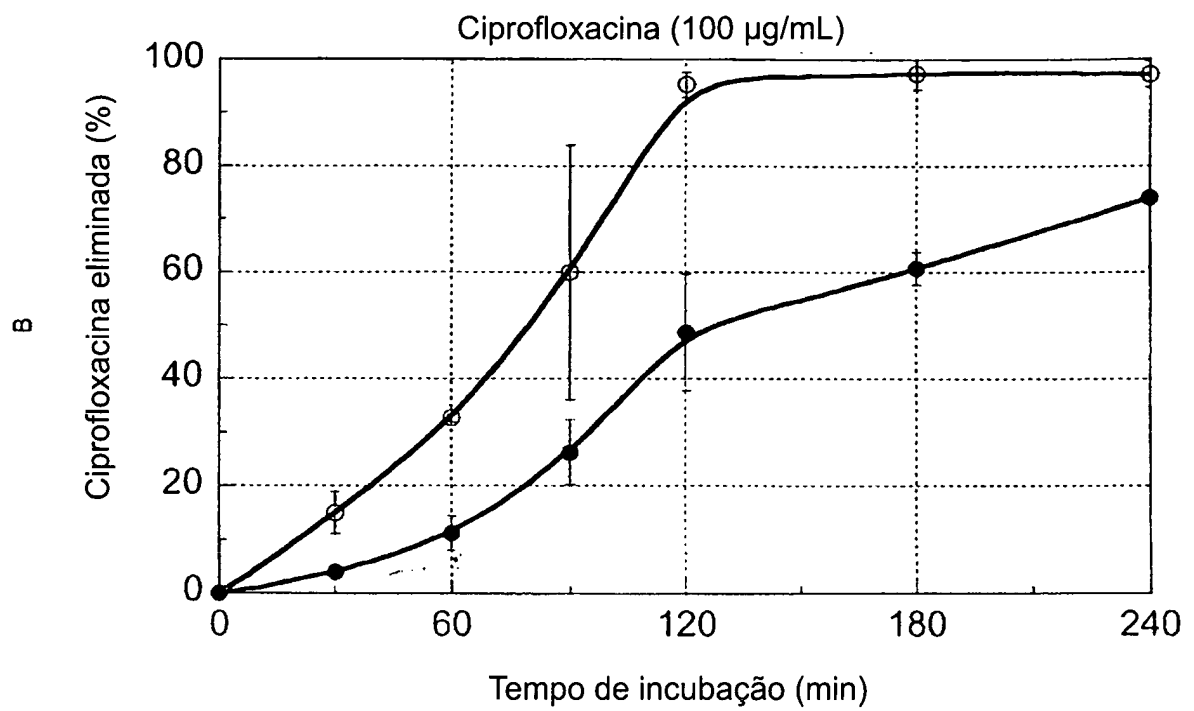


FIG.14

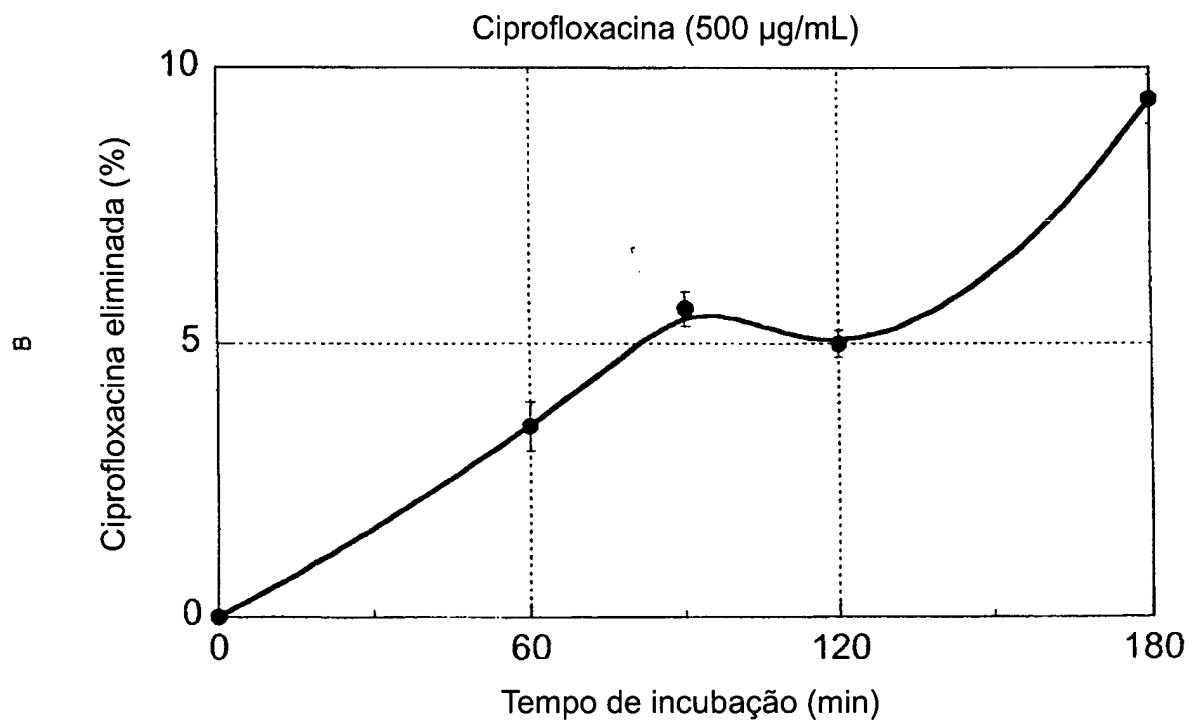


FIG.15

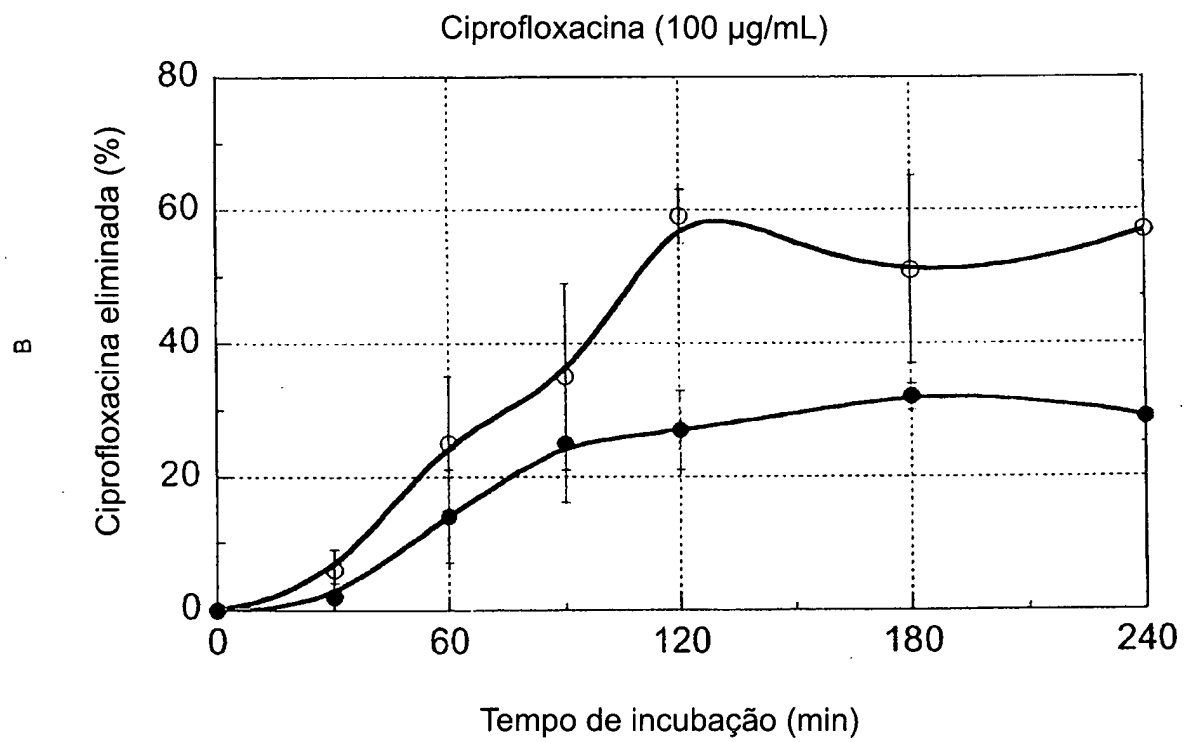


FIG.16

RESUMO

Patente de Invenção: "**APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES**".

Sistemas de aplicação em partículas, específicos de sítio (colônicos), oralmente administráveis, incluindo absorventes são revelados.

- 5 Quando aplicados especificamente ao colo, eles podem remover várias substâncias presentes no, ou conforme elas atingem o, colo. Métodos de tratamento usando os sistemas de aplicação, e métodos de preparação dos sistemas de aplicação, são também revelados. Os sistemas de aplicação em partícula são baseados em matrizes absorventes encapsuladas em e/ou sobre
- 10 partículas, que seletivamente liberam os absorventes para o colo. Dispositivos de aplicação de fármaco representativos incluem contas de pectina, que podem ser opcionalmente ligadas com cruzamento com íons de metal tal como zinco e/ou cálcio. O sistema de aplicação protege o absorvente e previne seu efeito de absorção no trato gastrointestinal superior (GI). Quando
- 15 as partículas são feitas de pectina, e as contas são administradas ao colo, enzimas pectinolíticas específicas no colo degradam a pectina, permitindo que o absorvente seja liberado e seja completamente ativo. Antibióticos, toxinas e outras substâncias absorvíveis presentes no colo será então inativados através de absorção no ou sobre o absorvente.

Pt 020080007373
Pi 0610673-8

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES**".

Campo da Invenção

O presente pedido está no campo de aplicação colônica de a-
5 gentes terapêuticas e, especificamente, lida com a aplicação específica de materiais absorventes ao colo.

Antecedentes da Invenção

Resistência bacteriana a antibióticos emergiu um pouco depois
do início do uso dos antibióticos e tem aumentado continuamente desde en-
10 tão, mas a magnitude dos problemas foi de certa forma ocultada até o início dos anos noventa por causa das contínuas descobertas e liberação de novos agentes antibacterianos. Hoje em dia, no entanto, enfrenta-se uma crise de saúde pública global porque a indústria farmacêutica está falta de novos agentes bacterianos. Uso global daqueles disponíveis está ainda aumentan-
15 do e, como uma consequência, a incidência de bactéria resistente em seres humanos está atingindo um nível alarmante em todo o mundo.

Embora a resistência bacteriana possa emergir através de sele-
ção direta de patógenos resistentes no sítio de infecção, a resistência alta de patógenos bacterianos é na maioria dos casos um processo de duas etapas,
20 onde resistência acontece primeiro na flora comensal e é seguido por transferência horizontal de resistência a espécies patogênicas.

Embora oculta, a resistência grande em flora intestinal comensal é um efeito secundário quase constante de todos os usos de antibiótico. Pesquisadores mostraram que administração orogástrica de beta-lactamase
25 em camundongos reduziu alterações associadas com beta-lactamase da microflora nativa e crescimento excessivo de patógenos. Transposição deste princípio a seres humanos para reduzir a emergência de resistência intestinal durante tratamentos antibióticos requer a aplicação específica de enzimas de hidrolisação de antibiótico ao colo. Um exemplo desta abordagem é
30 descrito no PCT WO 2004/016248 depositado em 6 de agosto de 2003, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. No entanto, há ainda um grande número de antibióticos que induzem resis-

tência bacteriana, mas não podem ser removidos por enzimas específicas. Ainda, muitas bactérias produzem toxinas, que causam efeitos colaterais tal como diarreia quando as toxinas atingem o colo.

5 Absorventes são sabidos absorver uma variedade de agentes químicos orgânicos, tal como antibióticos. No entanto, a administração de absorventes é tipicamente contra-indicada com prescrição de antibióticos, porque os absorventes podem absorver e então inativar uma grande quantidade desses antibióticos antes que eles possam atingir o fluxo sanguíneo [Referências 3-5].

10 É então um objetivo da presente invenção prover um sistema que direcione agentes de inativação ao colo, usando sistemas de aplicação em partícula específicos de sítio, bem como métodos de inativação de antibióticos e outros agentes ativos, e métodos para absorção de produtos prejudiciais ou perigosos tal como, mas não limitado a, toxinas, agentes químicos, alérgenos, etc. É um objetivo adicional da presente invenção prover tal sistema, onde o sistema especificamente libera seu teor no colo, e não interfere com o sítio de absorção normal do antibiótico, isto é o trato gastrintestinal superior ("GI"). A presente invenção provê tais sistemas e métodos.

Sumário da Invenção

20 A presente invenção refere-se a sistemas de aplicação em partícula, específicos de sítio (colônicos), oralmente administráveis. Quando os sistemas são aplicados especificamente ao colo, eles são capazes de remover várias substâncias presentes no, ou conforme eles atingem o, colo. A invenção refere-se também a métodos de tratamento usando os sistemas de aplicação e métodos de preparação dos sistemas de aplicação.

25 Os sistemas de aplicação em partícula são baseados em matrizes absorventes encapsuladas em e/ou sobre partículas, que seletivamente liberam os absorventes no colo. Sistemas de aplicação de fármaco representativos incluem contas à base de pectina, onde a pectina pode ser opcionalmente ligada com cruzamento com íons de metal tal como íons de zinco e/ou cálcio, e as contas de pectina ligadas com cruzamento podem ser opcionalmente reticuladas com um polímero catiônico tal como polietilenoimina,

quitosana e polilisina. Em adição a, ou no lugar da pectina, outros polímeros, tal como quitosana, alginatos, xantana, curdlano, goma guar e outros polissacarídeos (particularmente polissacarídeos ionicamente ligados com cruzamento) e Eudragit® (polímeros de polimetilmetacrilato), podem ser também
5 usados para reticular as partículas.

O papel do sistema de aplicação em partícula é proteger o absorvente e prevenir seu efeito absorvente no trato gastrointestinal superior (GI). Quando as partículas são feitas de pectina, e as contas atingem o colo, enzimas pectinolíticas específicas degradam a pectina, permitindo que o absorvente seja liberado e seja completamente ativo. Antibióticos, agentes
10 químicos, toxinas e outras substâncias absorvíveis presentes no colo serão então inativados através de absorção no ou sobre o absorvente.

Devido ao fato dos sistemas de aplicação em partícula específicos de sítio liberarem os absorventes no colo, eles não interferem a um ponto
15 significativo com a cinética de absorção normal do antibiótico ou qualquer outra substância ativa enquanto no trato GI superior ou em outro local no corpo humano.

Em uma modalidade, os absorventes são usados para absorver antibióticos residuais, tal como, mas não restrito a, beta-lactamas, ciclinas, quinolonas, macrólidos e aminoglicosídeos, quando antibióticos são administrados em conjunto com (isto é, antes, durante ou após administração) o sistema. Nesta modalidade, as contas podem opcionalmente também incluir enzimas capazes de inativação dos antibióticos. Exemplos dessas enzimas incluem enzimas que inativam beta-lactamas, quinolonas e/ou macrólidos,
20 tal como beta-lactamases. Acredita-se que o absorvente possa ajudar a trazer o antibiótico em contato com a enzima, auxiliando mais na remoção do antibiótico do colo do paciente.

Em uma outra modalidade, os absorventes são usados para absorver produtos prejudiciais ou perigosos tal como, mas não limitado a, toxinas, agentes químicos, alérgenos e similar absorvidos ou produzidos por
30 bactérias e/ou fungos e que podem produzir sérios efeitos adversos no colo.

Em ainda uma outra modalidade, os absorventes são usados

para absorver agentes farmacêuticos que são administrados sistemicamente, e que resultam em efeitos benéficos quando eles interagem com receptores fora do colo, mas resultam em efeitos colaterais adversos, tal como diarreia e/ou constipação, quando eles interagem com os receptores no colo.

- 5 As partículas contendo absorvente podem ser preparadas usando métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Em uma modalidade, as partículas são preparadas misturando o absorvente em uma solução de pectina, ligando com cruzamento a pectina com um cátion de metal tal como zinco ou cálcio para formar contas de pectina que encapsulam o absorvente,
10 e então opcionalmente reticulando as contas de pectina ligadas com cruzamento com uma solução de polietilenoimina ou qualquer outro polímero policationico. As contas de pectina resultantes podem então ser incluídas em qualquer dispositivo de aplicação de fármaco adequado, tal como comprimido ou cápsula.

15 Breve Descrição das figuras

A figura 1 representa uma vista esquemática de um método que pode ser usado para preparar as contas de Zn-pectinato ou Ca-pectinato descritas aqui.

- 20 A figura 2 mostra imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de uma conta s eca de Ca-pectinato típica (esquerda) e sua superfície relativamente lisa (direita).

A figura 3 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando carvão ativado (razão de carvão para pectina = 5/3 p/p).

- 25 A figura 4 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando atapulgita (razão de atapulgita para pectina = 1/1 p/p).

A figura 5 mostra contas de pectinato de cálcio encapsulando caulim (razão de caulim para pectina = 5/3 p/p). Na imagem da direita a estrutura em camada de caulim é visível na superfície das contas.

- 30 A figura 6 mostra imagens de SEM de contas de pectinato de cálcio encapsulando ou sílica coloidal (esquerda, razão de sílica para pectina = 80/12 p/p) ou laponina (direita, razão de laponina para pectina = 16/6 p/p).

As figuras 7 e 8 representam a porcentagem de amoxicilina elimi-

nada através de absorção (0,5 e 1 mg/mL) versus tempo de contato (min) de incubação com cada absorvente testado, em Meio Colônico Simulado (SCM) sem enzimas pectinolíticas. Na figura 7, diamantes representam carvão ativado em uma concentração de 10 mg/mL, triângulos representam atapulgita em uma concentração de 200 mg/mL e quadrados representam caulim em uma concentração de 200 mg/mL. Na figura 8, triângulos representam carvão ativado em uma concentração de 10 mg/mL, diamantes representam carvão ativado em uma concentração de 5 mg/mL e círculos representam carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL.

10 A figura 9 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) (concentração inicial é 100 µg/ml) versus tempo (min) de incubação com matrizes absorventes em SCM sem atividade pectinolítica. Triângulos representam carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL, diamantes representam atapulgita em uma concentração de 1 mg/mL e quadrados representam caulim em ma concentração de 1 mg/mL.

15 A figura 10 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) (concentração inicial é 500 µg/mL) versus tempo (min) de incubação em matrizes absorventes incluindo carvão ativado em uma concentração de 1 mg/mL em SCM sem atividade pectinolítica.

20 A figura 11a representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através da absorção (%) (concentração inicial é 100%) versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de cálcio carregadas com carvão ativado (1 conta/mL) em meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas.

25 A figura 11b representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção (%) concentração inicial é 500 µg/mL) versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de cálcio carregadas com carvão ativado (1 conta/mL) em meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas.

30 A figura 12 representa a dose de ciprofloxacina eliminada através da absorção dada em µg/mg de carvão ativado versus tempo (min) de incubação; comparação entre contas de pectinato de cálcio (quadrados a-

zuis) e pectinato de zinco (círculos vermelhos) carregadas com carvão ativado (6% p/p de contra-íons). As contas são incubadas em meio colônico simulado contendo 500 µg/mL de ciprofloxacina (n=2).

5 A figura 13 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado (6% p/v de acetato de zinco) em meio colônico simulado. A concentração de ciprofloxacina inicial é 500 µg/mL).

10 A figura 14 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco ativadas com carvão (10% p/v de acetato de zinco) no meio colônico simulado. Contas (2 mg/mL (círculos cheios azuis) ou 5 mg/mL (círculos vazios pretos)) são incubadas em meio colônico simulado contendo uma concentração de ciprofloxacina inicial de 100 µg/mL.

15 A figura 15 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado e 10% (p/v) Tween 80 (10% p/v de acetato de zinco) no meio colônico simulado. Contas (2 mg/mL (círculos azuis)) são incubadas em meio colônico simulado contendo uma
20 concentração de ciprofloxacina inicial de 100 mg/mL.

A figura 16 representa a porcentagem de ciprofloxacina eliminada através de absorção versus tempo (min) de incubação com contas de pectinato de zinco carregadas com carvão ativado e 5% (p/v) de Lutro® F68 (10% p/v de acetato de zinco). Contas (2 mg/mL (círculos cheios azuis) ou 5
25 mg/mL (círculos vazios pretos)) são incubadas em SCM contendo uma concentração de ciprofloxacina inicial de 100 µg/mL.

Descrição Detalhada da Invenção

Os sistemas de aplicação em partícula incluindo os absorventes encapsulados, e métodos para sua preparação e uso, são descritos em mais
30 detalhes abaixo. Conforme aqui usado, os termos "encapsulado" e "encapsulação" referem-se a absorventes que estão presentes nas contas e/ou sobre a superfície das contas.

I. Componentes das Partículas Contendo Absorvente

As partículas contendo absorvente incluem um absorvente, um componente polimérico que não libera uma quantidade significativa do absorvente até que as partículas atinjam o colo.

5 A. Tipos de Absorventes

Os absorventes usados para preparar as partículas devem ter uma superfície específica alta, e podem ser de grau farmacêutico ou não. Exemplos de absorventes adequados incluem carvão ativado, argilas, incluindo bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, haloisita, laponita e similar, sílica, incluindo sílica coloidal (Ludox[®] AS-40, por exemplo), sílica mesoporosa (MCM41), sílica fumê, zeólitos e similar, talco, e resinas para testes bacteriológicos tal como resinas BACTEC[®]. Dentre esses absorventes, pode ser preferido usar aqueles de grau farmacêutico, tal como carvão ativado obedecendo a padrões Pharmacopoeia (ex. Merck, França), caulim (ex. VWR, França), atapulgita (ex. Lavollée, França), bentonita (ex. Across Organics, França), Talco USP (ex. VWR, França).

B. Contas de Pectina

A pectina é um exemplo de um polímero adequado para a preparação das partículas, íons de zinco e cálcio são exemplos de íons adequados para ligar com cruzamento ionicamente a pectina nas partículas (contas) e polietilenoimina é um exemplo de um polímero adequado para reticulação de contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento, naquelas modalidades onde reticulação for desejada. Contas de pectina adequadas podem ser formadas de pectina, um íon de metal polivalente (isto é, divalente ou trivalente) e, opcionalmente, um polímero catiônico, e as contas de pectina podem encapsular um ou mais absorventes.

Pectina

A pectina é um polissacarídeo isolado das paredes celulares de vegetais superiores, usada amplamente na indústria alimentícia agrícola (como um coagulante ou espessante de geléias, sorvetes e similar) e agentes farmacêuticos. Ela é polimolecular e polidispersa. Sua composição varia de acordo com a fonte, condições de extração e fatores ambientais.

As pectinas são principalmente compostas de cadeias lineares de ácidos beta-1,4-(D)-galacturônicos, de vez em quando inter espaçadas por unidades de ramnose. Os grupos carboxílicos de ácidos galacturônicos podem ser parcialmente esterificados para dar pectinas metiladas. Dois tipos de pectina são distinguidos de acordo com seu grau de metilação (DM: número de grupo metóxi por 100 unidades de ácido galacturônico):

- pectina altamente metilada (HM: muito metóxi) a partir da qual o grau de metilação varia entre 50 e 80%. Ela é altamente solúvel em água e forma géis em meio ácido ($\text{pH} < 3,6$) ou na presença de açúcares.

- pectina fracamente metilada (LM: pouco metóxi), com um grau de metilação variando de 25 a 50%. Mais solúvel em água do que a pectina HM, ela dá géis na presença de cátions divalentes tal como íons de Zn^{2+} e Ca^{2+} . Na realidade, íons de Zn^{2+} e Ca^{2+} formam "pontes" entre os grupos carboxilados livres de ácidos galacturônicos. A rede então formada foi descrita por Grant e outros sob o nome de <<modelo caixa de ovo>> (Grant G.T. e outros (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, *FEBS Letters*, 32, 195).

Há também as pectinas amidadas. Usando tratamento de pectina por amônia certos grupos metil carboxilato ($-\text{COOCH}_3$) podem ser transformados em grupos carboxamida ($-\text{CONH}_2$). Esta amidação confere novas propriedades às pectinas, especialmente melhor resistência a variações em pH. Pectinas amidadas tendem a ser mais tolerantes às variações em pH, e foram também estudadas para elaboração de comprimidos matriciais para aplicação colônica (Wakerly, Z. e outros (1997)). Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 622).

A pectina é degradada por enzimas que se originam de vegetais superiores e vários microorganismos (isto é, fungos e bactérias) dentre as quais bactérias de flora colônica humana é encontrada. As enzimas produzidas pela microflora são compostas de um conjunto de polissacaridases, glicosidases e esterases.

Outros polímeros, tal como quitosana, alginatos, xantano, cur-

dlano, goma guar e outros polissacarídeos (particularmente polissacarídeos que podem ser ionicamente ligados com cruzamento) e Eudragit® (polímeros de polimetilmetacrilato), pode ser também usados para preparar as partículas.

5 Cátions de Metal

Em algumas modalidades, a pectina é ionicamente ligada com cruzamento com um cátion de metal. Qualquer cátion de metal polivalente (isto é, divalente, trivalente e similar) pode ser usado para ligar com cruzamento a pectina. Exemplos incluem cálcio, zinco, alumínio, magnésio, ferro e similar. Zinco e cálcio são cátions de metal preferidos.

Polímero Catiônico

Naquelas modalidades onde a pectina é ionicamente ligada com cruzamento com um cátion de metal, ela pode ser opcionalmente também reticulada com um polímero catiônico, tal como polietilenoimina, quitosana ou polilisina. Foi observado que quando a pectina é ligada com cruzamento com íons de zinco, tal como aqueles de acetato de zinco, reticulação é menos importante do que quando íons de cálcio são usados.

Desses polímeros catiônicos, polietilenoimina pode ser preferida. Polietilenoimina é um polímero fortemente catiônico que se liga a certas proteínas, e é freqüentemente usada como um marcador em imunologia, para precipitar e purificar enzimas e lipídeos. Ela é também conhecida como polímero de aziridina; epamina; epomina; polímero de etilenoimina; montrek; PEI; e poliimina(s). O peso molecular da polietilenoimina está entre 10.000 e 100.000 Dáltons, de preferência entre 20.000 e 50.000 Dáltons.

A quantidade de polietilenoimina usada pode ser otimizada, dependendo do peso molecular e do tipo de pectina usada. Vantajosamente, a concentração ótima para polietilenoimina (quando presente se alguma) é aquela que proveja contas de pectina reticuladas que sejam estáveis o suficiente para sobreviverem no trato gastrointestinal, ainda que instáveis o suficiente para serem suficientemente degradadas no colo de modo a liberarem uma quantidade eficaz do absorvente e/ou agente ativo. Em algumas modalidades, tal como onde íons de cálcio são usados para ligar com cruzamento

a pectina, acredita-se que entre 0 e 1% seja a faixa ótima de concentração de polietilenoimina para atingir esses objetivos.

Por exemplo, quando as contas de pectina são preparadas a partir de uma solução de pectina a 1-10% (p/v), vantajosamente de a partir de 2 a 6% (p/v) e uma solução de cloreto de cálcio a 2-10% (p/v), uma concentração de 0 a 10% (p/v) de polietilenoimina (PEI) é ótima.

Aqueles de habilidade na técnica, usando os ensinamentos descritos aqui, podem prontamente otimizar a quantidade de polietilenoimina, ou evitar seu uso totalmente, se houver variações na concentração de pectina, do tipo de pectina ou da concentração ou tipo de cátion de metal usado, com relação àqueles usados nos exemplos de trabalho descritos aqui. Ainda, no lugar de polietilenoimina, outros polímeros catiônicos, tal como quitosana ou polilisina, podem ser usados, contanto que eles permitam que as contas de pectina especificamente apliquem o absorvente encapsulado ao colo.

15 Agentes de Desintegração

Agentes de desintegração podem ser adicionados à solução de pectina antes da gelação ionotrópica. Esses agentes de desintegração podem precipitar a desintegração das contas no meio colônico quando necessário. Agentes de desintegração representativos incluem D-lactose, tensoativos polissorbato tal como Tween® 80, poloxâmeros tal como Lutrol® F68 (BASF) ou polímeros tal como povidona Kollidon® K17, embora outros agentes de desintegração conhecidos na técnica possam ser usados.

Componentes Adicionais Opcionais

As contas de pectina podem incluir opcionalmente um ou mais componentes adicionais. Idealmente, esses são componentes que não são absorvidos pelo absorvente, e incluem excipientes e enzimas que inativam antibióticos ou outras substâncias absorvidas. Por exemplo, as enzimas podem ser enzimas que inativam beta-lactamas, quinolonas e/ou macrólidos, tal como beta-lactamases. Embora não desejando ser limitado a uma teoria particular, acredita-se que o absorvente possa ajudar a trazer o antibiótico em contato com a enzima, auxiliando mais na remoção do antibiótico do colo do paciente.

II. Preparação dos Sistemas de Aplicação em Partícula

As partículas podem ser preparadas através de meios conhecidos daqueles de habilidade na técnica. Quando as partículas são contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento, elas podem ser tipicamente preparadas através de mistura do absorvente e/ou agentes ativos em uma solução de pectina, ligação com cruzamento da pectina com um cátion de metal tal como zinco ou cálcio para formar contas de pectina que encapsulam o absorvente e/ou os agentes ativos, e então opcionalmente reticulação das contas com uma solução de polietilenoimina.

10 Tipicamente, contas não contendo o absorvente são preparadas através da adição de uma solução de pectina aquosa em uma concentração de 1 a 10% (p/v) em gotas a uma solução de um sal de zinco tal como acetato de zinco, ou um sal de cálcio tal como cloreto de cálcio, para formar contas de pectinato de zinco ou cálcio, que são então recuperadas. Opcionalmente, as contas de pectinato ionicamente ligadas com cruzamento podem ser introduzidas em uma solução aquosa de polietilenoimina ou outro polímero catiônico para reticular as contas de pectina ionicamente ligadas com cruzamento.

Um processo ligeiramente diferente é usado para preparar contas incluindo os absorventes. Os absorventes são misturados com água suficiente para hidratá-los e então agitados por tempo suficiente para prover uma suspensão homogênea (tipicamente 12 horas), e pectina (ou solução de pectina) é adicionada, com aquecimento conforme necessário para manter a viscosidade da solução. Então, o processo prossegue de uma maneira substancialmente similar àquela para preparação de contas nuas (isto é, 25 contas que não encapsulam um absorvente).

A solução de pectina é vantajosamente de a partir de 1 a 10% (p/v), de preferência 2 a 6%, a solução de íon de zinco ou cálcio é vantajosamente de a partir de 2 a 15% (p/v) e a solução de polietilenoimina, quando usada, é vantajosamente de a partir de 0,5 a 2,% (p/v). Com mais preferência, a solução de pectina é de cerca de 3% (p/v), a solução de zinco é cerca de 10% (p/v) ou a solução de íon de cálcio é cerca de 6% e a solução de 30

polietilenoimina, quando usada, é cerca de 0,5 a 1% (p/v), de preferência cerca de 0,8% (p/v), embora em qualquer caso, a quantidade de polietilenoimina (se presente alguma) é vantajosamente selecionada para prover contas de pectina reticuladas que sobrevivem no trato gastrointestinal até que
5 elas atinjam o colo, e que sejam suficientemente degradadas no colo para prover liberação eficaz do agente ativo.

As contas de pectina são vantajosamente agitadas na solução de íon de zinco ou cálcio sob agitação lenta entre 10 minutos e uma hora, de preferência por cerca de 20 a 30 minutos. Cerca de 200 contas são lavadas
10 três vezes em 50 mL de água milli-Q sob agitação lenta entre 0,5 e 10 minutos, de preferência por cerca de 1 minuto. O número de lavagens pode ser opcionalmente modificado. As contas são opcionalmente reticuladas com polietilenoimina sob agitação lenta por entre 15 a 40 minutos, de preferência por 20 minutos e então lavadas de acordo com o processo descrito acima.
15 Após recuperação das contas de pectina, elas são secas em uma temperatura entre 20 e 40° C por 30 minutos a 10 horas, de preferência a 37° C por 2 horas ou secas com congelamento. O diâmetro das partículas é entre cerca de 0,5 mm e 5 mm, de preferência entre cerca de 0,5 e 2 mm. O diâmetro das partículas pode ser finamente ajustado usando tamanho de agulha e
20 fluxo de pectina através da agulha diferentes.

Em uma modalidade, os sistemas de aplicação baseados em pectina são preparados de acordo com o processo que segue, que é baseado na gelação ionotrópica de gotículas de solução de pectina quando postas em uma solução de um íon de metal divalente ou polivalente tal como acetato de zinco ou cloreto de cálcio. O princípio do método é apresentado na figura 1.
25

Nesta modalidade, uma pectina tal como uma pectina metoxilada e amidada (Unipeptin OG175C, Degussa Texturant System, França) é dissolvida em água Milli-Q usando um agitador magnético. A solução pode
30 ser aquecida em torno de 50° C para facilidade de dissolução. A concentração de pectina final está tipicamente entre 1% e 10% (p/v), embora concentrações fora desta faixa possam ser usadas. A solução de pectina é então

dirigida com uma bomba peristáltica ou uma bomba de seringa através de uma agulha (diâmetro interno: 0,5 mm) e cai de gota em gota em uma solução de um íon de metal divalente ou polivalente, tal como um acetato de zinco ou cloreto de cálcio (com uma concentração de sal típica entre cerca de 1 e 12% p/v) em uma taxa típica de 60 a 80 contas por minuto (embora taxas maiores e menores possam ser usadas, e a taxa pode variar dependendo da escala do processo).

Para reduzir sua viscosidade, a solução pode ser aquecida para em torno de 50° C aproximadamente enquanto sendo bombeada. Os íons de metal, tal como zinco ou cálcio, interagem com os grupos de COO- disponíveis nas moléculas de pectina de acordo com o modelo de caixa de ovo [Referência 6]. As gotas de pectina são deixadas agitar por 20 a 30 minutos ou aproximadamente no banho de sal para permitir a difusão do sal com a matriz de pectina e formação completa da rede de íon de metal-pectinato (tal como Zn-pectinato ou Ca-pectinato). As contas são idealmente então filtradas, enxaguadas e lavadas pelo menos três vezes com água milli-Q para eliminar o excesso de sal conforme anteriormente descrito, e então secas. Secagem pode ser obtida usando quaisquer meios apropriados, tipicamente ou simplesmente deixando as contas no forno em torno de 37° C por pelo menos 2 horas secando-as com congelamento.

Após secagem, contas nuas (isto é, não encapsulando nada) têm um tamanho de torno de 1 milímetro. Uma pessoa pode variar o tamanho das contas, por exemplo, variando a taxa de fluxo da solução de pectina, o tamanho da agulha, a concentração de pectina ou a quantidade do material encapsulado. Uma conta nua seca típica é apresentada na figura 2. Contas nuas têm uma superfície ligeiramente lisa.

Encapsulação dos absorventes com contas de pectinato de Zn ou Ca

A encapsulação dos absorventes foi simplesmente realizada preparando separadamente uma suspensão do absorvente em água e uma solução de pectina. A suspensão absorvente foi preparada como segue: o absorvente seco foi pesado e adicionado à água (concentração entre 1 e 10% p/v) usando um agitador magnético. A suspensão foi deixada agitar da

noite para o dia para assegurar que o absorvente fosse completamente hidratado (ou esfoliado no caso de argilas). Esta agitação prolongada parece ser também importante para carvão ativado: se o absorvente não for deixado agitar da noite para o dia, a suspensão não é homogênea e encapsulação não é fácil. A solução de pectina é aquecida (máximo 50° C) e a suspensão absorvente foi misturada com ela usando uma ferramenta propelente de três lâminas por pelo menos 30 minutos. Mistura da solução de pectina com a suspensão absorvente é crucial para encapsulação adequada e homogênea do absorvente dentro da matriz de pectina. Por exemplo, se a suspensão absorvente não for deixada agitar da noite para o dia, uma separação de fase é observada quando a solução de pectina é adicionada: uma fase rica em pectina e uma fase rica em absorvente. A falta de homogeneidade desaparece quando a suspensão é bem hidratada da noite para o dia. Em adição absorventes de grau farmacêutico, laponita XLG (Rockwood, UK) e sílica coloidal (Ludox® AS-40; Sigma, França) foram também encapsuladas. Laponita foi hidratada da mesma maneira que as argilas naturais. No caso de sílica coloidal (40%, p/v), uma vez que este absorvente já é uma suspensão, ela foi misturada diretamente com a solução de pectina usando uma ferramenta propelente de três lâminas.

20 Contas contendo absorvente podem ser preparadas usando o mesmo método que o descrito para agulhas nuas. Imagens SEM de contas secas são apresentadas nas figuras 3, 4, 5 e 6.

Todas as contas têm uma superfície ligeiramente rugosa em comparação com contas nuas. A rugosidade surge da encapsulação dos absorventes. Confirmação de que encapsulação era homogênea dentro das 25 contas pode ser obtida cortando as contas antes da secagem e obtendo-se imagem do interior com microscopia eletrônica de escaneamento (não mostrada aqui). Absorventes parecem ser homogeneamente distribuídos dentro da matriz de pectinato. Esses resultados mostram que apesar das dificuldades de formulação devido à alta viscosidade das soluções de pectina, e dos 30 problemas de separação de fase, é possível incorporar quantidades importantes de absorventes dentro das soluções de pectina e então formar contas

de Zn-pectinato ou Ca-pectinato encapsulando uma quantidade grande desses absorventes.

5 As propriedades de estabilidade e absorção das contas preparadas de acordo com os métodos descritos aqui foram avaliadas nos Exemplos apresentados abaixo.

III. Sistema de Aplicação de Fármaco Incluindo as Contas de Pectina

10 As contas de pectina podem ser coletadas, e combinadas com excipientes apropriados e formuladas em uma variedade de dispositivos de aplicação de fármaco oral. Por exemplo, as contas podem ser combinadas com um excipiente sólido e moldadas em comprimido ou incluídas em uma cápsula.

As contas de pectina podem ser também combinadas com excipientes líquido/gel que não degradam as contas de pectina, e a mistura/dispersão pode ser incorporada a uma cápsula, tal como uma *gel-cap*.

15 Os comprimidos ou cápsulas feitos com as contas de pectina podem ser revestidos, se desejado, com um revestimento entérico adequado para prover estabilidade aumentada enquanto no estômago sem degradação. O pH no estômago é da ordem de 1 a 3 mas aumenta no intestino delgado e no colo para atingir valores próximos a 7 (Hovgaard, L. e outros, 20 (1996) Current Applications of Polyssacharides in Colon Targeting, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13, 185). Os dispositivos de aplicação de fármaco, na forma de comprimidos, cápsulas de gelatina, esferóides e similar contendo as contas de pectina, podem atingir o colo, sem ser expostos a essas variações em pH, através de seu revestimento com um 25 polímero dependente do pH, insolúvel a pH ácido mas solúvel em pH neutro ou alcalino (Kinget e outros, op. cit.). Os polímeros mais atualmente usados para este propósito são derivados de ácido metacrílico, Eudragit® L e S (Ashford, M. e outros, (1993), An in vivo investigation into the suitability of pH dependent polymers for colonic targeting, *International Journal of Pharmaceutics*, 95, 193 e 95, 241; e David A. e outros (1997) Acrylic polymers for colon-specific drug delivery, *S.T.P. Pharma Sciences*, 7, 546). 30

Os dispositivos de aplicação de fármaco são administrados em

uma quantidade escolhida adequada para prover tratamento ou prevenção eficiente dos distúrbios para os quais os absorventes são administrados. Idealmente, a dose eficaz dos absorventes descrita aqui é suficiente para prover os efeitos de absorção desejados no colo, que podem variar dependendo da natureza da substância a ser absorvida.

Tipicamente, a dose eficaz dos absorventes está em uma quantidade de menos do que 100 mg/kg de peso do corpo, freqüentemente menos do que 1 mg/kg por peso do paciente e geralmente, mas freqüentemente, entre cerca de 10 mg a menos do que 100 mg/kg de peso do paciente. As doses eficazes acima tipicamente representam a quantidade administrada como uma dose única, ou como uma ou mais doses administradas durante um período de 24 horas.

IV. Métodos de Tratamento Usando os Dispositivos de Aplicação de Fármaco contendo contas de pectina absorventes

Os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser usados para tratar aqueles tipos de condições e distúrbios para os quais aplicação colônica dos absorventes é apropriada. Em uma modalidade, os distúrbios são aqueles que resultam da exposição do colo a antibióticos, tal como diarreia. Nesta modalidade, os absorventes inativam antibióticos, e os dispositivos podem ser administrados em uma dosagem terapeuticamente eficaz a um paciente ao qual foi, está sendo ou será dado um antibiótico. Qualquer antibiótico que possa ser absorvido no/sobre o absorvente pode ser inativado. Exemplos representativos de classes de antibióticos que podem ser absorvidos incluem beta-lactamas, ciclinas, macrolídeos, quinolonas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, sulfamidas, fenicóis, sulfamidas, furanos, polipeptídeos, oxazolidonas e antibióticos tal como fosfomicina, rifampin e similar.

Em uma outra modalidade, os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser administrados a um paciente que sofre dos efeitos de toxinas bacterianas ou fúngicas presentes no colo. Exemplos de tais toxinas incluem monotoxinas, endotoxinas e enterotoxinas, tal como aquelas produzidas por *Clostridium difficile* (acreditada ser a causa principal de diarreia pós-antibiótico em todo o mundo). Nesta modalidade, os absorventes são

administrados em uma dosagem terapeuticamente eficaz para absorver as toxinas.

Em uma outra modalidade, os dispositivos de aplicação de fármaco podem ser administrados a um paciente que sofre de um distúrbio tratado com agentes farmaceuticamente ativos que se ligam a receptores relevantes no corpo do paciente que não no colo para tratar o distúrbio, mas que, quando ligados a receptores no colo, resultam em efeitos colaterais. Por exemplo, o colo inclui receptores colinérgicos (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>) e serotonina, que estão também presentes no sistema nervoso central. Tratamento com agentes que se ligam a receptores colinérgicos pode resultar em efeitos colaterais se os compostos se ligarem a receptores no colo. Co-administração das partículas absorventes descritas aqui e dos agentes que se ligam a tais receptores pode minimizar ou eliminar esses efeitos colaterais.

Sabe-se que problemas gastrointestinais são reações de fármaco adversas geralmente relatadas com medicações para pressão sangüínea (bloqueadores de Canal de Cálcio), medicações para dor (especialmente narcóticos), antidepressivos, antiácidos que contêm alumínio e cálcio, fármacos antiparkinson, antiespasmódicos, diuréticos e anticonvulsivos, e que muitas classes de fármaco estão associadas com constipação. Frequentemente, a constipação persiste, e pacientes descontinuem o tratamento porque o efeito colateral é incômodo (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>). Fármacos tal como risperidona podem ser associados com distúrbios colônicos, tal como megacolo (<http://www.sma.org.sg/smj/4310/4310cr2.pdf>).

A presente invenção será compreendida mais com referência aos exemplos não-limitantes que seguem.

Exemplo 1: Estabilidade de contas carregadas em meios gastrintestinais simulados

O tempo de dissolução de formulações selecionadas, preparadas usando os métodos descritos acima, foi avaliado em meio gástrico simulado (SGM) (USP XXIV) (Tabela 1), meio intestinal simulado (SIM) (USP

XXIV) (Tabela 2) e meio colônico simulado contendo enzimas pectinolíticas (SCM) (Tabela 3), sob agitação tangencial leve a 37°C.

Tabela 1: Tempo de desintegração no meio gástrico simulado quando cloreto de cálcio é substituído por acetato de zinco (6% p/v) para gelação ionotrópica. As contas foram lavadas apenas uma vez para este conjunto de experimento.

	<i>Estabilidade em SGM (pH = 1,2)</i>	
	Contra-íon	
	Cloreto de Cálcio	Acetato de Zinco
Pectina (3% p/v) + Atapulgita (3% p/v)	Nenhuma desintegração após 6 h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Caulim (5% p/v)	Nenhuma desintegração após 6h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	Desintegração começa após 6 h	Nenhuma desintegração após 6 h

Tabela 2: Tempo de desintegração no meio intestinal simulado quando cloreto de cálcio (6% p/v) é substituído por acetato de zinco (6% p/v) para gelação ionotrópica. As contas foram lavadas apenas uma vez para este conjunto de experimento.

	<i>Estabilidade em SIM (pH = 6,8)</i>	
	Contra-íon	
	Cloreto de Cálcio	Acetato de Zinco
Pectina (3% p/v) + Atapulgita (3% p/v)	Desintegração começa após 4 h	Não testado
Pectina (3% p/v) + Caulim (5% p/v)	Desintegração começa após 2h30	Não testado
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	Desintegração começa após 2h30	Nenhuma desintegração após 6h

Aumento da estabilidade nos meios intestinal e colônico simulados é observada quando cloreto de cálcio é substituído por acetato de zinco para gelação ionotrópica.

Tabela 3: Estabilidade de contas de Zn-pectinato preparadas com concentrações diferentes de solução de acetato de zinco, em SIM e em SCM após

5 h em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 5 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Contra-íon A- cetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíti- cas (5200 PG/mL) Após 5 h em SIM
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	4 a 6	Desintegração antes de 5 h	Não testado
	8	Nenhuma desin- tegração após 5h	Desintegração co- meça após 3 h
	10		
	12		

Quanto maior a concentração de zinco usada para gelação ionotrópica, mais estável as contas em meio intestinal simulado (Tabela 3).

- 5 Tabela 4: Estabilidade de contas de Zn-pectinato preparadas com concentrações diferentes de acetato de zinco, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Contra-íon Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3%p/v) + Car- vão ativado (5% p/v)	8	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h
	10	Desintegração começa após 1h Total desintegração após 2h30
	12	Desintegração começa após 1h Total desintegração após 3h

- 10 Sem pré-incubação em meio intestinal simulado, para concentrações de zinco maiores do que 8% (p/v), o tempo de desintegração em meio colônico simulado é compreendido entre 1 e 3 horas (Tabela 4).

- 15 Tabela 5: Estabilidade de contas de Zn-Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de misturas de acetato de zinco e cloreto de cálcio, em SIM e em SCM após 5 h em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Mistura de contra-íon		Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
	Acetato de zinco (% p/v)	Cloreto de cálcio (% p/v)		
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	6	3	Nenhuma desintegração após 5h	Desintegração começa após 3 h
		6		
	12	3	Nenhuma desintegração após 5 h	Desintegração começa após 3 h
		6		

Adição de cloreto de cálcio à solução de acetato de zinco a 6% usada para gelificação ionotrópica aumenta a estabilidade das contas em SIM conforme comparado com contas preparadas sem cálcio (Tabela 5). No entanto, nenhuma diferença é observada quando CaCl_2 é adicionado à solução de acetato de zinco a 12%.

Tabela 6: Estabilidade de contas de Zn-Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de misturas de acetato de zinco e cloreto de cálcio, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Mistura de contra-íon		Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
	Acetato de zinco (% p/v)	Cloreto de cálcio (% p/v)	
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v)	6	3	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 2h30
		6	
	12	3	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h
		6	

Sem pré-incubação em SIM, a estabilidade das contas em SCM é aproximadamente a mesma para as concentrações de zinco e cálcio diferentes que foram avaliadas. O tempo de desintegração em meio colônico simulado é compreendido entre 1 e 3 horas (Tabela 6).

Tabela 7: Estabilidade de contas de Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de cloreto de cálcio e revestidas com polietilenoimina, em SIM e em SCM após 5 h em SIM. O processo de lavagem de contas consistia no enxágüe de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Contra-íon Cloreto de cálcio (% p/v)	Revestimen- to PEI (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + Car- vão ativado (5% p/v)	2	0,6	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 5 h
		0,8		
		1		
	6	0,6	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 5 h
		0,8		
		1		

Revestimento PEI consideravelmente aumenta a estabilidade das contas em ambos meio intestinal simulado e meio colônico simulado conforme comparado com contas de Ca-pectinato não-revestidas (Tabela 7).

Tabela 8: Estabilidade de contas de Ca-pectinato preparadas com concentrações diferentes de cloreto de cálcio e revestidas com polietilenoimina, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem de contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas.

	Contra-íon Cloreto de cálcio (% p/v)	Revestimento PEI (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pec- tinolíticas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + car- vão ativado (5% p/v)	2	0,6	Desintegração começa após 5 h
		0,8	
		1	
	6	0,6	Desintegração começa após 5 h
		0,8	
		1	

Sem pré-incubação em SIM, revestimento PEI consideravelmen-

te aumenta a estabilidade das contas no meio colônico simulado conforme comparado com contas de Ca-pectinato não-revestidas (Tabela 8).

Tabela 9: Estabilidade de contas de pectinato de zinco incluindo um agente de desintegração, em SIM e SCM após 5 h 'em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 200 contas

			Contra-íon A- cetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SIM (pH 6,8)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectinolíticas (5200 PG/mL) após 5 g em SIM
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v) + Agente de desinte- gração	d-lactose USP (% p/v)	10	10	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 3 h
			12		
		20	10	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 3 h
	PVP Kollidon® K17 PF (% p/v)	0,5	10	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 3 h
		1			
		5			
		10		Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 4 h
	POE Monoo- leato sorbitano Tween® 80 (% p/v)	1	10	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração total após 3 h
		5			
		10		Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 1h30 Desintegração total após 3 h
	Poloxâmero 188 Lutrol® F68 (% p/v)	0,1	10	Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 3h
		0,5			
		1			
		5		Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 2h Desintegração total após 3h15
		10		Nenhuma desintegra- ção após 5 h	Desintegração começa após 2h30 Desintegração total após 4h

- Os agentes de desintegração diferentes testados não influenciaram a estabilidade das contas no SIM: todas as formulações são estáveis por pelo menos 5 horas (Tabela 9). A inclusão de d-lactose ou Kollidon® K17 não modifica o tempo de desintegração das contas no SCM após incubação no
- 5 SIM, conforme comparado com contas de Zn-pectinato preparadas sem agente de desintegração. Por outro lado, concentrações grandes de Tween® 80 (c=10% (p/v)) e concentrações médias de Lutrol® F68 (c=5% (p/v)) diminuem a estabilidade das contas em SCM após incubação no SIM. Para Tween® 80 (c=10% (p/v)), a desintegração começa após 1,5 hora de incubação
- 10 ção em SCM e termina após 3 horas. Para Lutrol® F68 (c=5% (p/v)), a desintegração começa após 2 horas de incubação em SCM e termina após 3 horas e 15 minutos.

Tabela 10: Estabilidade de contas de pectinato de zinco incluindo um agente de desintegração, em SCM sem pré-incubação em SIM. O processo de lavagem das contas consistia em três enxágües de 1 minuto em 50 mL de água Milli-Q para cerca de 100 contas.

			Contra-íon Acetato de zinco (% p/v)	Estabilidade em SCM (pH 6) com enzimas pectínicas (5200 PG/mL)
Pectina (3% p/v) + Carvão ativado (5% p/v) + Agente de desinte- gração	d-lactose USP (% p/v)	10	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 2h30
			12	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 4h
		20	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 3h
				Não testada
	PVP Kolli- don® K17 PF (% p/v)	0,5	10	Desintegração começa após 45 min Desintegração total após 1h15
		1		
		5		
		10		
	POE Monooleato sorbitano Tween® 80 (% p/v)	1	10	Desintegração começa após 2h Desintegração total após 3h30
		5		
		10		
	Poloxâmero 188 Lutrol® F68 (% p/v)	0,1	10	Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 1h30
		0,5		Desintegração começa após 1 h Desintegração total após 1h30
		1		Desintegração começa após 30 min Desintegração total após 1h30
		5		Desintegração começa após 30 min Desintegração total após 1h15
		10		Desintegração começa após 2h30 Desintegração total após 4h

Como já observado com pré-incubação em SIM, duas formulações são de interesse quando se precisa de desintegração rápida: Tween® 80 (c=10% (p/v)) e Lutrol® F 68 (c=5% (p/v)) (Tabela 10).

Exemplo 2: Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com

5 absorventes limitados

Absorção de três absorventes de grau farmacêutico foi testada quanto à amoxilina e ciprofloxacina sob condições colônicas estimuladas através da determinação da concentração residual de antibióticos, usando HPLC. O meio colônico simulado (SMC) usado para esses experimentos foi o que segue: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6). Absorventes foram incubados no meio colônico descrito acima a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as suspensões foram coletadas e centrifugadas a 10.000 RPM Usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em uma unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm; Millipore, França) e ensaiado quanto à sua concentração de antibiótico usando HPLC. Amostras de controle dos SCM testados foram incubadas com as mesmas condições experimentais. A porcentagem de antibióticos restante no SCM após incubação com absorventes foi determinada através de comparação com controles incubados.

20 Cinética de absorção de amoxilina

A capacidade da atapulgita, carvão ativado e caulim em absorve amoxilina em condições colônicas simuladas foi estudada. A concentração de amoxilina antes e após exposição dos absorventes foi determinada usando HPLC acoplada com detecção de UV ($\lambda=230$ nm). A separação foi conseguida usando Ypersphere® 5 µm (250 x 4,6 mm, Interchim, França), uma coluna de fase reversa C18, em temperatura ambiente. A fase móvel consistia em uma solução de fosfato a 95% (KH₂PO₄, 0,01M, acidificada em pH 3 com ácido ortofosfórico) e mistura de acetonitrila a 5%. A taxa de fluxo foi fixada a 1,3 mL/min. Condições experimentais e resultados de experimentos de ligação com amoxilina são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Condições experimentais e características da eliminação de amoxicilina através de absorção nos absorventes limitados.

[Atapulgita] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180	-		
20	1	0, 30, 60, 180	-		
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈45
200	1	0, 180, 900	+	>360	≈25

[Caulim] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180			
20	1	0, 30, 60, 180	-		
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈25
200	1	0, 180, 900	+	>180	≈30

[Carvão ativado] (mg/mL)	[Amoxicilina] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Amoxicilina eliminada (%)
**1	1	0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 360	+	15-30	~25
**5	1	0, 5, 15, 30, 45, 60	++	15	75
*10	0,5	0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 360	++	15	>95
**	1	0, 5, 15, 30, 45, 60	++	15	>95

*figura 7. / **figura 8.

As figura 7 e 8 apresentam a porcentagem de amoxicilina eliminada (0,5 e 1 mg/mL) versus tempo de contato com cada absorvente testado, em SCM sem enzimas pectinolíticas. Conforme mostrado nessas figuras, absorção de amoxicilina é muito eficiente com carvão ativado enquanto ela é observada em um grau menor com atapulgita e caulim. Após 6 horas de incubação, a porcentagem de amoxicilina eliminada a partir de absorventes diferentes variou de a partir de em torno de 25% até 95% com redução maior para carvão ativado. Esses resultados mostram que a máxima de absorção é sempre atingida após um tempo de contato relativamente curto com carvão ativado. O platô aparece após 15 a 30 ml de incubação sem importar a concentração de amoxicilina testada (0,5 e 1 mg/mL) e a quantidade de carvão (1, 5 e 10 mg/mL). Atapulgita e caulim realmente reduzem a concentração de amoxicilina, mas para concentração maior (200 mg/mL) e o estado fixo é atingido apenas após 6 horas.

Ainda, resultados apresentados na figura 8 demonstram que a velocidade de absorção não está relacionada com a concentração de carvão. No entanto, a quantidade de amoxicilina absorvida na saturação é fortemente dependente da dose.

Os resultados obtidos para carvão ativado foram muito promissores. Eles evidenciam que particularmente pequenas quantidades deste

absorvente (1 mg/mL a 10 mg/mL) permitem que uma pessoa elimine amoxilina em uma concentração compreendida entre 0,250 mg/mL e 1 mg/mL de fezes. A partir do que é sabido sobre farmacologia de amoxilina, a concentração residual esperada de amoxilina em fezes (em torno de 5 a 10% de doses orais padrão (1 a 2 g/dia)) que corresponde a 0,08 a 0,33 mg/mL de fezes. Esta faixa de concentração está de acordo com a faixa de concentração que as partículas descritas aqui são capazes de inativar.

Cinética de absorção de ciprofloxacina

A concentração de ciprofloxacina após contato com absorventes limitados foi determinada usando HPLC acoplado com detecção UV a 278 nm. Amostras de controle foram preparadas tal conforme acima mencionado. A separação foi conseguida a 25° C, usando uma coluna Symmetry® C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm; Waters, França). A fase móvel era 10% de acetonitrila em 0,02M de solução de NaH₂PO₄ (acidificada em pH 3 com ácido ortofosfórico). A taxa de fluxo era 1 mL/min.

A Tabela 12 apresenta as condições experimentais e os resultados de cinética de absorção com ciprofloxacina.

Tabela 12: Condições experimentais e características da eliminação de ciprofloxacina através de absorção em absorventes limitados.

[Atapulgita] (mg/mL)	(ciprofloxacina) (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45
[Caulim] (mg/mL)	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	+	15	≈10
10	100	0, 15, 60, 180	++	15-30	≈80

[Carvão ativado] (mg/mL)	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Cipro eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	++	15	>95
**10	500	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45

*figura 9. / **figura 10.

A figura 9 apresenta a porcentagem de ciprofloxacina eliminada

através de absorção versus tempo de incubação com matrizes absorventes. Em comparação com amoxicilina, foi observado que a velocidade de absorção é mais rápida para os três absorventes testados. O platô é atingido entre 15 e 30 minutos independentemente do absorvente usado. Como já visto com amoxicilina, carvão ativado exibe capacidade de absorção maior do que a atapulgita, que é mais eficiente do que caulim. Conforme mostrado na figura 10, quando a concentração de ciprofloxacina é aumentada cinco vezes, o equilíbrio de absorção em carvão ainda acontece após 15 a 30 minutos de incubação. Além disso, carvão ativado a 1 mg/mL era ainda eficiente na eliminação de antibiótico através de absorção (45% de 0,5 mg/mL), que era eliminado em 15 a 30 minutos. Mesmo que apenas 45% da concentração inicial tenham sido inativados, ela ainda representa quantitativamente uma quantidade maior de antibiótico eliminada através de absorção: em torno de 0,225 mg/mL. Esses resultados estão de acordo com a concentração residual esperada de ciprofloxacina em fezes, que significa um máximo de 25% de doses orais (1 a 1,5 g/dia), isto é, em torno de 0,420 mg/mL a 0,625 mg/mL.

Exemplo 3: Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com absorventes encapsulados

Experimento 1: Contas de pectinato de Ca encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). As contas foram lavadas apenas uma vez para este experimento. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para esta estudo era o que segue: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/20; v/v).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Cinética de absorção de ciprofloxacina

A Tabela 13 representa condições experimentais e porcentagens de ciprofloxacina eliminada através da absorção a partir de carvão ativado após sua liberação a partir de contas de pectinato de Ca.

- 5 Tabela 13: Condições experimentais dos experimentos de ligação e parâmetros de eliminação de ciprofloxacina através da absorção em carvão ativado liberado de contas de Ca-pectinato, sob condições colônicas simuladas.

Conta de Ca-pectinato carregada com carvão ativado	[Ciprofloxacina] (µg/mL)	Tempo de incubação (min)	Absorção	Platô (min)	Ciprofloxacina eliminada (%)
1 conta/mL	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	>95
	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	
	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	
	100	0, 15	+		59
	500	0, 15, 60	+	>60	≈40
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45

- Usando um SCM contendo pectina a 1/20, contas de Ca-pectinato desintegraram completamente após mais ou menos 30 minutos. As
- 10 figuras 11 a e b mostram que a ciprofloxacina foi eliminada através de absorção quando incubada com contas carregadas com carvão em SCM. Estado fixo foi retardado em comparação com experimentos de ligação com absorventes limitados. As diferenças observadas em velocidade de absorção poderiam resultar do tempo que leva para a matriz de pectinato desintegrar.
- 15 Em equilíbrio de absorção, a quantidade de ciprofloxacina eliminada através de absorção era quantitativamente a mesma que a quantidade absorvida no

carvão não-encapsulado. Isto significa que o carvão ativado foi na verdade liberado das contas quando incubado em SCM contendo pectinases e que sua capacidade de absorção não foi afetada pela encapsulação.

Experimento 2: Contas de Ca-pectinato e Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de cálcio usada para gelação ionotrópica era 6% (p/v) e concentração de zinco usada para gelação ionotrópica era 6% (p/v). Uma lavagem suave foi realizada; as contas foram lavadas apenas uma vez para este experimento. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para esta estudo foi o que segue: solução de HEPES (2,838 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França)(1/20; v/v).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos desejados, amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC. Tipicamente, uma conta foi incubada com 1,5 mL de SCM.

A figura 12 mostra que ambos tipos de contas (Ca e Zn) são capazes de absorver ciprofloxacina. A cinética de absorção é mais longa para contas de Zn-pectinato, provavelmente devido a seu tempo de desintegração mais lento no SCM. A capacidade de absorção de carvão ativado liberado a partir de contas de Ca-pectinato tende a atingir a saturação após 3 horas de incubação, enquanto eliminação de ciprofloxacina através de absorção em carvão ativado liberado de contas de Zn-pectinato ainda aumenta após 4 horas de contato.

Conforme mostrado na figura 13, cerca de 40% da ciprofloxacina inicial são eliminados através de absorção após 4 horas de incubação em SCM.

Experimento 3: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão

ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelificação ionotrópica era 10% (p/v). Para este experimento, as contas foram lavadas três vezes por 1 minuto. A eficiência do adsorvente em reduzir a concentração de ciprofloxacin 5 após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o que segue: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (0,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/5; v/v). Tipicamente, uma ou duas contas foram incubadas com SCM contendo 100 10 µg/ml de ciprofloxacin (2 mg ou 5 mg de contas/mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacin a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por 15 seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 14, a cinética de absorção de ciprofloxacin por contas de Zn-pectinato carregadas com carvão ativado é um processo em duas etapas. Antes das contas serem completamente desintegradas, ciprofloxacin é absorvida lentamente e fracamente (em torno 20 de 10% ou 30% absorvida durante a primeira hora de incubação, para SCM de contas de 2 mg ou 5 mg respectivamente). Após uma hora de incubação, as contas liberaram seu teor de carvão e a absorção é mais rápida e mais forte. Após 4 horas de incubação até 70% da ciprofloxacin inicial são eliminados por uma concentração de carvão de SCM de 2 mg/mL. Um aumento 25 da quantidade de conta para SCM 5 mg/mL leva a um aumento da velocidade de absorção na matriz; processo de absorção tende a um platô após 2 horas de incubação e após 4 horas até 95% da ciprofloxacin inicial ser removida através de absorção.

Experimento 4: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão 30 ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelificação ionotrópica era 10% (p/v). As contas foram formuladas com 10% (p/v) de Tween 80.

As contas foram lavadas três vezes por 1 minuto. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/5; v,v). Tipicamente, uma conta foi incubada com SCM contendo 100 µg/mL de ciprofloxacina (2 mg de contas/1 mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada com seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 15, ciprofloxacina absorveu lentamente e fracamente: apenas 10% da concentração inicial tinham absorvido após 3 horas de incubação mesmo que o carvão ativado tenha sido liberado das contas. Ciprofloxacina pode estar em competição com Tween 80 para absorção em carvão ativado.

Experimento 5: Contas de Zn-pectinato encapsulando carvão ativado foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A concentração de zinco usada para gelação iônica era 10% (p/v). As contas foram formuladas com 5% (p/v) Lutrol® F68. As contas foram lavadas três vezes por 1 minuto. A eficiência do absorvente para reduzir a concentração de ciprofloxacina após liberação a partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas. O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, França) (1/5; v/v). Tipicamente, uma ou duas contas foram incubadas com SCM contendo 100 µg/mL de ciprofloxacina (2 mg ou 5 mg de contas/mL de SCM).

As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo ciprofloxacina a 37° C sob agitação tangencial suave. No tempo de ponto desejado as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma mi-

crocentrífuga. O sobrenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada por seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando HPLC.

Conforme mostrado na figura 16, a quantidade de ciprofloxacina eliminada através de absorção em carvão ativado liberado de contas de Zn-pectinato preparadas com Lutrol® F68 aumenta até ela atingir um platô após 2 a 3 horas de incubação, independentemente da quantidade de contas usadas. A ciprofloxacina eliminada é em torno de 30% e 60% da concentração inicial após 3 horas de incubação, para concentração de conta de SCM 2 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente. A capacidade de absorção de carvão ativado parece ser afetada pela presença de Lutrol® F68.

Experimento 6: Controles para absorção de ciprofloxacina em contas carregadas com carvão: eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com "contas nuas"

"Contas nuas" foram usadas para esses experimentos. Contas de Ca-pectinato e Zn-pectinato foram preparadas com uma solução de pectina a 3% (p/v) e com solução de acetato de zinco a 6 e 10% p/v respectivamente, conforme mencionado para contas carregadas com absorvente. Ciprofloxacina (100 µg/ml) foi incubada com "contas nuas" sob as mesmas condições experimentais que testes de ligação com contas carregadas. Com base no fato de que uma conta carregada com carvão incluía em torno de 0,5 mg de pectina, testes de controle foram realizados usando solução de ciprofloxacina em proporção 1 mL/0,5 mg de contas nuas. A concentração de antibiótico residual foi determinada usando HPLC-UV mista, conforme acima descrito. Após 3 horas de incubação, o nível de ciprofloxacina em amostras testadas não difere de controles (Tabelas 14 e 15). A quantidade de antibiótico permaneceu constante, demonstrando que a ciprofloxacina não foi absorvida pela pectina.

Tabela 14: Concentração de ciprofloxacina residual após incubação sem ou com contas de pectinato de cálcio nuas, em SCM (enzimas pectinolítica: 1/20)

Tempo de incubação (min)	Concentração de Ciprofloxacina (µg/mL)		
	15	60	189
Controles (sem contas) (n=3)	95,6±0,1	95,7±0,1	95,9±0,4
Com contas nuas de Ca-pectinato (n=3)	95,50±,1 96,2±0,2	95,9±0,1 96,6±0,25	95,1±0,3 95,3±0,5

Tabela 15: Concentração de ciprofloxacina residual após incubação sem ou com contas de pectinato de zinco nuas, em SCM (enzimas pectinolítica: 1/20)

Tempo de incubação (min)	Concentração de Ciprofloxacina (µg/mL)		
	30	60	180
Controles (sem contas) (n=2)	106±0,1	106±0,1	107±0,1
Com contas nuas de Za-pectinato (n=2)	105±0,1	104±0,1	104±0,1

Exemplo 4: Absorção de toxinas *Clostridium difficile*

Eficiência de absorção em condições colônicas simuladas com absorventes encapsulados

10 Toxinas *Clostridium difficile* (A e B) foram providas pela Sigma-Aldrich (USA). Contas de Ca-pectinato encapsulando carvão ativado, substancialmente conforme acima descrito, foram usadas para este experimento. A razão de carvão ativado para pectina era 5/3 (p/p). A eficiência do absorvente na redução da concentração de toxinas *C. difficile* após liberação a

15 partir da pectina foi determinada sob condições colônicas simuladas.

O SCM usado para este estudo era o seguinte: solução de HEPES (2,383 g/L) e NaCl (8,474 g/L) (pH 6) contendo uma solução de enzima pectinolítica (Pectinex® SPL, Ultra, Sigma, França) (1/20; v/v). As contas foram incubadas no SCM descrito acima contendo toxinas *C. difficile* a 37° C

20 sob agitação tangencial suave. Nos pontos de tempo desejados, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM usando uma microcentrífuga. O so-

brenadante foi filtrado em unidade de filtro acionada foi seringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) e analisado usando um ensaio ELISA (kit Premier Toxins A&B da meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio).

5 Absorção rápida das toxinas incubadas em SCM foi observada, sugerindo que os sistemas de aplicação em partícula colônicos descritos aqui vão absorver toxinas bacterianas e fúngicas no colo e aliviar sintomas causados por essas toxinas.

Referências:

10 1. Leonard, F. e outros, Use of beta-lactamase producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization. J. Infec. Dis., 1989, 160(2): pp. 274-80.

2. Stiefel, U. e outros, Oral administration of beta-lactamase preserves colonization resistance of piperacillin-treated mice. J. Infec. Dis., 2003, 188(10): pp. 1605-9.

15 3. Alegakis, A.K. e outros, In vitro study of oxytetracycline adsorption on activated charcoal. J. Environ. Sci. Health. B., 2000. 35(5): pp. 559-69.

4. Browne, J.E. e outros, Characterization and adsorptive properties of pharmaceutical grade clays. J. Pharm. Sci., 1980. 69(7): pp. 816-23.

20 5. Khalil, S.L., Mortada e M. El-Khawas, The uptake of ampicillin and amoxycilin by some adsorbents. Int. J. Pharm., 1984. 18: pp. 157-167.

6. Grant, G. e outros, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. FEBS letter, 1973. 32: pp. 195-198.

25 Cada documento referido aqui é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos.

Tendo pelo presente descrito a matéria objeto da presente invenção, deve ser aparente que muitas modificações, substituições e variações da presente invenção são possíveis à sua luz. Deve ser compreendido que a presente invenção pode ser praticada que não conforme especificamente descrito. Tais modificações, substituições e variações pretendem estar dentro do escopo do presente pedido.

30

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivos de aplicação oral para liberação colônica de absorventes que compreendem:

5 a) um absorvente capaz de absorver um antibiótico, uma toxina bacteriana ou fúngica, ou um agente farmacologicamente ativo conhecido por causar efeitos colaterais adversos quando eles atingem o cólon, e

b) um dispositivo de aplicação de fármaco feito de micropartículas de pectina, onde a pectina é reticulada com um íon metálico polivalente

10 2. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 1, em que a pectina é reticulada com íons de zinco ou cálcio.

3. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 2, em que a pectina reticulada contém um agente de desintegração.

4. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 2, em que a pectina reticulada é reticulada com polietilenoimina.

15 5. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 4, em que a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das micropartículas de pectina passem pelo trato gastrointestinal para o cólon sem liberação do absorvente, e é também suficiente de modo que as micropartículas de pectina são suficientemente degradadas no
20 cólon para liberar uma quantidade eficaz do absorvente.

6. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o absorvente é selecionado do grupo consistindo em carvão ativado, argilas, talco e resinas tal como aquelas usadas em garrafas de cultura de sangue.

25 7. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 6, em que a argila é selecionada do grupo consistindo em bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, haloisita e laponita.

8. Dispositivo de aplicação de acordo com a reivindicação 6, em que a sílica é selecionada do grupo consistindo em sílica coloidal, sílica mesoporosa, sílica fumê e zeólitos.
30

9. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a pectina é pectina amidada.

10. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o dispositivo é preparado a partir de uma solução compreendendo 1-10% (p/v) de pectina e 2-12% (p/v) de acetato de zinco ou cloreto de cálcio.

5 11. Dispositivo de aplicação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, que compreende ainda uma enzima que inativa um antibiótico.

10 12. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um antibiótico sobre flora intestinal, que compreende administração do dispositivo de aplicação como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um paciente ou antes, durante ou após administração do antibiótico.

15 13. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de uma toxina bacteriana ou fúngica sobre flora intestinal, que compreende a administração do dispositivo de aplicação como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

20 14. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um agente farmacologicamente ativo, que apresenta efeitos benéficos quando interage com receptores fora do cólon, mas apresenta efeitos colaterais adversos quando ele interage com receptores dentro do cólon compreendendo administração do dispositivo de aplicação como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, a um paciente ou antes, durante ou após administração do agente farmacologicamente ativo.

25 15. Processo para preparação de um dispositivo de aplicação de fármaco oral para aplicação de um agente ativo que inativa um antibiótico ao cólon que compreende:

30 a) adição de uma solução de pectina aquosa contendo um absorvente dissolvido, disperso ou suspenso, onde o absorvente inativa um antibiótico através de absorção, a uma solução aquosa de um sal catiônico bivalente, de modo a se obter micropartículas de pectina na forma de um sal catiônico incluindo o agente ativo, e

b) opcionalmente reticulação das micropartículas resultantes através da introdução delas em uma solução aquosa de polietilenoimina.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, em que o sal catiônico é um íon de zinco ou cálcio.

17. Processo de acordo com a reivindicação 15, em que a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das micropartículas de pectina passe através do trato gastrointestinal para o cólon sem liberação do agente ativo, e é também suficiente de modo que as micropartículas de pectina são suficientemente degradadas no cólon para liberar uma quantidade eficaz do absorvente.

18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, em que o absorvente é selecionado do grupo consistindo em carvão ativado, argilas, talco e resinas para testes bacteriológicos.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que a argila é selecionada do grupo consistindo em bentonita, caulim, montmorilonita, atapulgita, haloisita e laponita.

20. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que a sílica é selecionada do grupo consistindo em sílica coloidal e sílica mesoporosa, sílica fumê e zeólitos.

21. Dispositivos de aplicação oral para liberação colônica de absorventes que compreendem:

a) um absorvente, e

b) um dispositivo de aplicação de fármaco compreendendo micropartículas de pectina, onde a pectina é reticulada com um íon metálico polivalente.

22. Dispositivo de aplicação oral de acordo com a reivindicação 21, em que a pectina é reticulada com íons de zinco ou cálcio.

23. Dispositivo de aplicação oral de acordo com a reivindicação 22, em que a pectina reticulada é reticulada com polietilenoimina.

24. Dispositivo de aplicação de fármaco oral de acordo com a reivindicação 23, em que a quantidade de polietilenoimina é suficiente para permitir que uma porção substancial das micropartículas de pectina passe pelo trato gastrointestinal para o cólon sem liberação do absorvente, e é também suficiente de modo que as micropartículas de pectina são suficien-

temente degradadas no cólon para liberar uma quantidade eficaz do absorvente.

25. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um antibiótico sobre flora intestinal que compreende administração de dispositivos de aplicação oral para liberação colônica de absorventes compreendendo:

- a) um absorvente, e
- b) um dispositivo de aplicação de fármaco compreendendo micropartículas de pectina, ou um dispositivo de aplicação como definido em qualquer umas das reivindicações 21 a 24, a um paciente antes, durante ou após administração do antibiótico.

26. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de uma toxina bacteriana ou fúngica sobre a flora intestinal que compreende administração de dispositivo de aplicação oral para liberação colônica de absorventes, compreendendo:

- a) um absorvente, e
- b) um dispositivo de aplicação de fármaco compreendendo micropartículas de pectina, ou um dispositivo de aplicação como definido em qualquer umas das reivindicações 21 a 24, a um paciente.

27. Método para tratamento ou prevenção de efeitos adversos de um agente farmacologicamente ativo que tem efeitos benéficos quando ele interage com receptores fora do cólon, mas tem efeitos colaterais adversos quando ele interage com receptores dentro do cólon, que compreende administração de dispositivo de aplicação oral para liberação colônica de absorventes, compreendendo:

- a) um absorvente, e
- b) um dispositivo de aplicação de fármaco compreendendo micropartículas de pectina, ou um dispositivo de aplicação como definido em qualquer umas das reivindicações 21 a 24, a um paciente, ou antes, durante ou após administração do composto farmacologicamente ativo.

RESUMO

Patente de Invenção: **"APLICAÇÃO COLÔNICA DE ABSORVENTES"**.

Sistemas de aplicação em partículas, específicos de sítio (colônicos), oralmente administráveis, incluindo absorventes são revelados.

- 5 Quando aplicados especificamente ao colo, eles podem remover várias substâncias presentes no, ou conforme elas atingem o colo. Métodos de tratamento usando os sistemas de aplicação, e métodos de preparação dos sistemas de aplicação, são também revelados. Os sistemas de aplicação em partícula são baseados em matrizes absorventes encapsuladas em e/ou sobre
- 10 bre partículas, que seletivamente liberam os absorventes para o colo. Dispositivos de aplicação de fármaco representativos incluem contas de pectina, que podem ser opcionalmente ligadas com cruzamento com íons de metal tal como zinco e/ou cálcio. O sistema de aplicação protege o absorvente e previne seu efeito de absorção no trato gastrointestinal superior (GI). Quando
- 15 as partículas são feitas de pectina, e as contas são administradas ao colo, enzimas pectinolíticas específicas no colo degradam a pectina, permitindo que o absorvente seja liberado e seja completamente ativo. Antibióticos, toxinas e outras substâncias absorvíveis presentes no colo será então inativados através de absorção no ou sobre o absorvente.