UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA):
Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de
fármacos**

Juliana Mazza Reis

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA):
Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de
fármacos**

Juliana Mazza Reis

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Reis, Juliana Mazza

R375e Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
(PAMPA) : investigação das variáveis do ensaio para o estudo da
permeabilidade de fármacos / Juliana Mazza Reis. -- São Paulo,
2013.

157p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Serra, Cristina Helena dos Reis

1. Biodisponibilidade : Farmacocinética 2. Fármaco : Dissolução :
Química farmacêutica I. T. II. Serra, Cristina Helena dos Reis,
orientador.

615.7f CDD

Juliana Mazza Reis

**Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA):
Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de
fármacos**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra - Orientadora

1o examinador

2o examinador

3o examinador

4o examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____

Agradecimentos

À Deus, pela alegria de viver;

Aos meus pais, pelo amor infinito e incansável presença ao meu lado;

Ao meu amado marido Diego, pela amizade, carinho, alegria, colo, deliciosos momentos e apoio dos últimos 7 anos;

Ao meu irmão João Victor, que deposita em mim orgulho e confiança extremos, sempre me dando força para continuar;

Aos meus avós, tios e primos, pelo amor e admiração de sempre;

À minha orientadora prof^a Cristina Helena dos Reis Serra, por confiar em mim e me dar a liberdade de experimentar, estando ativamente presente em todos os momentos da execução deste trabalho;

Às minhas queridas amigas Ângela, Bruna, Daniela, Debora, Deborah, Ellen, Maria Fernanda, Flavia, Marina, Maria Angélica e Milena, pela amizade há mais de 15 anos, sempre deixando a vida mais fácil e divertida;

Às minhas amigas Daniella, Fer Tizzot, Ju Collonelli, Kalima e Letícia, por fazerem parte do meu dia a dia de forma intensa e completa;

Aos meus colegas de trabalho Aline, Andressa, Anna Paula, Carlos Vitor, Douglas, Ediliz, Eugênio, Hatylas, Katia, Lisandra, Patrícia, Paula, Renato e Tiago, pela compreensão, ajuda e momentos de alegria, tornando a rotina de trabalho muito mais agradável;

Aos colegas de laboratório André, Caio, Juliana Marino, Marina e Thaísa, pelo auxílio substancial nos experimentos e discussões;

Aos secretários Jorge, Bete, David e Elaine pela dedicação e paciência;

Às professoras Valentina Porta, Clarice Rolim, Renata Fonseca Vianna e Telma Kaneko, pelas significativas contribuições no exame de qualificação;

À FAPESP, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Absorção de fármacos	8
3.1.1 Mecanismos de transporte de fármacos	10
3.1.2 Propriedades físico-químicas que interferem na absorção de fármacos.....	13
3.1.2.1 Lipofilicidade (logP)	15
3.1.2.2 Constante de dissociação (pKa).....	16
3.1.2.3 Peso Molecular (PM).....	17
3.1.2.4 Área de Superfície Polar (PSA).....	17
3.1.2.5 Número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD).....	18
3.2 Modelos para avaliar a absorção intestinal de fármacos	18
3.2.1 Modelos artificiais.....	20
3.2.1.1 <i>Membrana Negra Lipídica (Black Lipid Membrane – BLM)</i> ...	20
3.2.1.2 <i>Membrana Artificial Imobilizada (Immobilized Artificial Membrane - IAM)</i>	21
3.3 Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA).....	21
3.3.1 Condições gerais dos ensaios de PAMPA	26
3.3.1.1 <i>Composição das membranas artificiais</i>	26
3.3.1.2 <i>pH e composição dos meios dos compartimentos doador e receptor</i>	31
3.3.1.3 <i>Agitação das placas e o efeito da Camada de Água Estacionária (CAE)</i>	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Materiais.....	37
4.1.1 Substâncias químicas de referência.....	37
4.1.2 Reagentes e solventes.....	38
4.1.3 Equipamentos e materiais.....	39
4.1.4 Infra-estrutura.....	39

4.2 MÉTODOS	40
4.2.1 Seleção dos fármacos para os estudos de permeabilidade	40
4.2.2 Validação da quantificação dos fármacos por espectrofotometria UV/fluorescência	41
4.2.2.1 <i>Especificidade/Seletividade</i>	41
4.2.2.2 <i>Linearidade</i>	42
4.2.2.3 <i>Precisão (repetibilidade)</i>	42
4.2.2.4 <i>Robustez</i>	43
4.2.3 Ensaio de PAMPA.....	43
4.2.3.1 <i>Preparo das soluções</i>	43
4.2.3.2 <i>Mapeamento das variáveis da técnica</i>	45
4.2.3.3 <i>Execução do ensaio</i>	48
4.2.3.4 <i>Análise dos resultados</i>	49
4.2.4 Estudo da correlação entre os a permeabilidade em PAMPA e dados extraídos da literatura para os fármacos do estudo	50
4.2.5 Estudos com a membrana fosfolipídica artificial	51
4.2.5.1 <i>Avaliação da integridade das membranas artificiais</i>	51
4.2.5.2 <i>Estudo dos solventes usados na solubilização dos fosfolipídeos da membrana artificial</i>	52
4.2.5.3 <i>Avaliação das membranas fosfolipídicas por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)</i>	52
4.2.5.4 <i>Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	53
4.2.5.5 <i>Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Seleção dos fármacos para os estudos de permeabilidade.....	56
5.2 Validação da quantificação dos fármacos por espectrofotometria UV/fluorescência	59
5.2.1 <i>Especificidade/Seletividade</i>	59
5.1.2 <i>Linearidade</i>	61
5.1.3 <i>Precisão (repetibilidade)</i>	62
5.1.4 <i>Exatidão</i>	63
5.1.5 <i>Robustez</i>	64

5.3 Ensaio de PAMPA.....	65
5.3.1 Mapeamento das variáveis da técnica	70
5.3.2 Estudo da correlação entre os a permeabilidade em PAMPA e dados extraídos da literatura para os fármacos do estudo	80
5.4 Estudos com a membrana fosfolipídica artificial.....	90
5.4.1 Avaliação da integridade das membranas artificiais.....	91
5.4.2 Estudo dos solventes usados na solubilização dos fosfolipídeos da membrana artificial.....	92
5.4.3 Avaliação das membranas fosfolipídicas por DSC.....	94
5.4.4 Avaliação das membranas artificiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	99
5.4.5 Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia de Força Atômica (AFM)	100
6. CONCLUSÃO	103
7. REFERÊNCIAS.....	105
8. APÊNDICES	119
APÊNDICE A – Valores de permeabilidade em PAMPA obtidos para os 96 experimentos gerados no ensaio de DOE pelo programa Minitab®	119
APÊNDICE B - Valores de retenção de membrana obtidos para os 96 experimentos de PAMPA gerados no ensaio de DOE pelo programa Minitab®	122
APÊNDICE C – Coeficientes de regressão linear, R^2 , obtidos entre a permeabilidade gerada pelos diferentes experimentos de PAMPA e os dados extraídos da literatura: PM, PSA, ASM, logP, HBD, VM, FA%, P_{eff} e permeabilidade em cultura de células Caco-2.....	125
9. ANEXOS	129
ANEXO A – Informações para membros da banca julgadora de mestrado/doutorado	129
ANEXO B – Ficha do aluno	131
ANEXO C – Currículo Lattes	134
ANEXO D – Artigo publicado na revista Mini-Reviews of Medicinal Chemistry	140
ANEXO E – Artigo aceito para publicação na revista European Journal of Pharmaceutical Sciences	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Classificação de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Adaptado de Wu; Benet, 2005).....	9
Figura 3.2 - Diferentes caminhos para a absorção intestinal de um composto	13
Figura 3.3 - Relação do número de publicações sobre a técnica de PAMPA no período de 1999-2012. Levantamento feito no período de Janeiro de 1999 a Julho de 2012 utilizando a expressão “PAMPA permeability”.	22
Figura 3.4 - Desenho esquemático do sanduíche de placas usado em PAMPA	23
Figura 4.1 - Levantamento das principais variáveis existentes no processo de avaliação da permeabilidade de fármacos usando a técnica de PAMPA.....	45
Figura 5.1 - Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta para: A) tampão fosfato pH 7,4 na ausência de fármacos; B) famotidina; C) furosemida; D) metoprolol; E) montelukaste; F) propranolol; G) ranitidina; I) verapamil; e J) zidovudina em solução tampão fosfato pH 7,4. H) Espectro de absorção obtido na região de fluorescência para sotalol em solução tampão fosfoato pH 7,4 ..	60
Figura 5.2 - Curva analítica obtida a partir da análise de: A) famotidina; B) furosemida; C) metoprolol; D) montelukaste; E) propranolol; F) ranitidina; H) verapamil; I) zidovudina em tampão fosfato pH 7,4, por meio do método espectrofotométrico UV. G) Curva analítica obtida a partir da análise de sotalol em tampão fosfato pH 7,4, por meio do método de fluorescência. Cada ponto representa a média de três repetições	61
Figura 5.3 - Gráfico de probabilidade normal (direita) e Gráfico de Pareto (esquerda) para o efeito das condições de PAMPA (eixo y): composição da membrana, agitação das placas, pH do meio do compartimento doador, composição do meio do compartimento receptor e tempo de incubação. Os fármacos estudados foram: A) famotidina; B) furosemida; C) metoprolol; D)	

montelukaste; E) propranolol; F) ranitidina; G) sotalol; H) verapamil; e I) zidovudina 68

Figura 5.4 - Gráfico dos efeitos principais para pH do meio do compartimento doador gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE. Variação de pH no meio do compartimento doador, em valores de 4,5, 6,0, 7,4 e 9,0 74

Figura 5.5 - Gráfico dos efeitos principais para tempo de incubação gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE. Incubação das placas por um período de 5 ou 15 horas 75

Figura 5.6 - Gráfico dos efeitos principais para presença ou ausência de agitação das placas gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE 76

Figura 5.7 - Gráfico dos efeitos principais para variação da composição lipídica gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE 76

Figura 5.8 - Valores de permeabilidade dos fármacos em PAMPA obtidos a partir da variação da composição do meio do compartimento receptor, dividido em tampão fosfato pH 7,4 na presença ou ausência de ácido glicocólico a 0,5% (p/v). Gráfico dos efeitos principais gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE 77

Figura 5.9 - Correlação entre os valores de permeabilidade em PAMPA obtidos nos experimentos 4, 69, 28, 28, 69, 71, 28, 71 do DOE e os valores de: A) P_{eff} ; B) Caco-2; C) PM; D) logP; E) PSA; F) FA%; G) VM; H) HBD; e I) pKa, respectivamente 81

Figura 5.10 - Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de permeabilidade em células Caco-2 e permeabilidade em jejuno humano (P_{eff}) para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, propranolol, ranitidina e verapamil. Valores de permeabilidade em PAMPA e em células Caco-2 expressos em 10^{-6} cm/s. Valores de P_{eff} expressos em 10^{-4} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA 86

Figura 5.11 - Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de PM e logP para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA..... 87

Figura 5.12 - Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de logP e PSA para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA..... 87

Figura 5.13 - Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de PM e pKa para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA..... 88

Figura 5.14 - Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de VM e FA% para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA..... 89

Figura 5.15 - Fotografia dos poços da placa receptora após ensaio de integridade..... 91

Figura 5.16 - Espectro de fluorescência comparativo de Amarelo Lúcifer (marcador negativo de permeabilidade) nas placas receptora (em vermelho) e doadora (em azul). A detecção está expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF) 92

Figura 5.17 - Perfil comparativo de permeabilidade em PAMPA para ranitidina e verapamil obtidos a partir de filtro de PVDF impregnado com mistura lipídica solubilizada nos solventes hexano, dodecano e octadieno.....	94
Figura 5.18 - Curvas de DSC comparativas entre o solvente (dodecano), as soluções lipídicas isoladas e as misturas lipídicas PC 10% + CHO 0,5% e PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%, em atmosfera dinâmica de N ₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20 °C/min	96
Figura 5.19 - Curvas de DSC comparativas entre o filtro de PVDF isolado e impregnado com as misturas lipídicas PC 10%, PC 10% + CHO 0,5% e PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%, em atmosfera dinâmica de N ₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20°C/min).....	96
Figura 5.20 - Curvas de DSC comparativas entre o filtro de PVDF isolado, o solvente (dodecano) isolado e o filtro de PVDF impregnado com o solvente (dodecano), em atmosfera dinâmica de N ₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20°C/min.....	97
Figura 5.21 - Imagem de MEV para membrana de PVDF na ausência de solução fosfolipídica (membrana A). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,0 mm	99
Figura 5.22 - Imagem de MEV para membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) em dodecano (membrana B). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,0 mm	100
Figura 5.23 - Imagem de MEV para membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) + CHO 0,5% (p/v) em dodecano (membrana C). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,2 mm	100
Figura 5.24 - Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF. Área de varredura de 20 µm e taxa de varredura de 1,001 Hz.....	101
Figura 5.25 - Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF impregnado com 5 µL de PC 2% (p/v) dissolvido em dodecano. Área de varredura de 20 µm e taxa de varredura de 1,001 Hz.....	102

Figura 5.26 - Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF impregnado com 5 μ L de PC 20% (p/v) dissolvido em dodecano. Área de varredura de 20 μ M e taxa de varredura de 1,001 Hz..... 102

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Composição das soluções empregadas nos experimentos de PAMPA..... 44

Quadro 4.2 – Relação das membranas fosfolipídicas analisadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Relação dos experimentos gerados pelo programa Minitab® com base nos fatores: A) pH do compartimento doador; B) tempo de incubação das placas; C) agitação a 100 rpm das placas; D) Composição da membrana lipídica; e E) Composição do meio do compartimento receptor	47
Tabela 5.1 - Relação de fármacos selecionados para o estudo de permeabilidade e sua caracterização em termos de: Peso Molecular (PM), Classificação Biofarmacêutica (SCB), Número doadores de ligação de hidrogênio (HBD), lipofilicidade (logP), Volume Molar (VM), Área de Superfície Polar (PSA), Fração Absorvida em Humanos (FA%), permeabilidade em intestino humano (P_{eff}) e permeabilidade em células Caco-2.....	58
Tabela 5.2 - Relação de fármacos selecionados para o estudo de permeabilidade e sua caracterização em termos de pKa e estado de carga, sendo este expresso em porcentagem (%) de fármaco ionizado, em diferentes condições de pH.....	58
Tabela 5.3 -Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes às seis determinações da precisão intra-ensaio do método para a quantificação dos fármacos em solução tampão fosfato pH 7,4	62
Tabela 5.4 - Valores de Concentração Teórica (CT), Concentração Média Experimental (CME) e Exatidão, expressa em porcentagem (%), referentes à determinação da exatidão do método espectrofotométrico para a quantificação dos fármacos em tampão fosfato pH 7,4.....	63
Tabela 5.5 - Valores de Concentração Média Experimental inicial (CME) e do Desvio Padrão Relativo (DPR%) após variação da agitação (Concentração Média Experimental após Agitação – CMEA) e variação da temperatura (Concentração Média Experimental após variação da Temperatura – CMET), caracterizando ensaio de robustez do método de quantificação dos fármacos em tampão fosfato pH 7,4	64

Tabela 5.6 - Resumo dos resultados de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, expressos em comprimento de onda (nm), coeficiente de correlação linear (R^2), Desvio Padrão Relativo (DPR%) e Exatidão (%), respectivamente, para os fármacos do estudo..... 65

Tabela 5.7 – Valores de significância expressos em p-valor e com base em um valor de alfa de 0,05, para o impacto das diferentes condições do ensaio de PAMPA na permeabilidade dos fármacos do estudo. Os valores em negrito representam os fatores que atingiram significância 71

Tabela 5.8 - Resumo das condições do ensaio de PAMPA capazes de gerar, proporcionalmente dentre os diferentes experimentos do DOE, os mais altos valores de permeabilidade para os fármacos do estudo. Em paralelo, relação dos valores médios de P_e obtidos nos 96 experimentos do DOE e respectivos Desvios Padrão (DP%) 73

Tabela 5.9 - Relação dos ensaios de PAMPA, expressos em experimentos do DOE, que geraram os maiores coeficientes de correlação (R^2) com os parâmetros de P_{eff} , FA%, permeabilidade em células Caco-2, PM, logP, PSA, VM e HBD 80

Tabela 5.10 – Relação das faixas de valor dos parâmetros de P_{eff} , permeabilidade em células Caco-2, FA%, PSA, PM, logP e VM capazes de gerar os maiores valores de permeabilidade em PAMPA para os fármacos selecionados no estudo..... 89

Tabela 5.11 - Resultados comparativos da permeabilidade usando PAMPA (P_e PAMPA) e respectivos valores de desvio padrão (DP) para os fármacos ranitidina e verapamil, utilizando diferentes solventes para a solubilização dos fosfolípidos a serem impregnados na membrana artificial 93

Tabela 5.12 - Valores de temperatura inicial de fusão (T_{onset}) e entalpia, obtidos através de calorimetria diferencial exploratória (DSC) para as misturas lipídicas isoladas e impregnadas em filtro de PVDF 95

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADMET:** Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
- AFM:** Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*)
- BBB:** Barreira Hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*)
- Caco-2:** Células de Adenocarcinoma de Cólon humano
- CAE:** Camada de Água Estacionária
- CHO:** colesterol
- DSC:** Calorimetria Diferencial Exploratória (*Differential Scanning Calorimetry*)
- FA%:** Fração de Absorção em humanos
- HBD:** Número doadores de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donnor*)
- IAM:** Membrana Artificial Imobilizada (*Immobilized Artificial Membrane*)
- logP:** grau de lipofilicidade
- MDCK:** Células renais de cães Madin-Darby (*Madin-Darby Canine Kidney cells*)
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- PA:** ácido fosfatídico
- PAMPA:** Ensaio de Permeabilidade Artificial em Membrana Paralela (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*)
- PC:** fosfatidilcolina
- PE:** fosfatidiletanolamina
- P_{eff}:** Permeabilidade efetiva em jejuno humano
- P_e PAMPA:** Permeabilidade aparente em PAMPA
- PI:** fosfatidilinositol
- PM:** Peso Molecular
- PSA:** Área de Superfície Polar (*Polar Surface Area*)
- PVDF:** Polivinildifluorideno
- SCB:** Classificação Biofarmacêutica (*Biopharmaceutic Classification System-BCS*)
- VM:** Volume Molecular

REIS, J.M. **Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA): Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O acesso à permeabilidade é uma etapa crucial na definição da via de administração de um fármaco, além de ser um dos parâmetros utilizados para a avaliação e seleção de moléculas durante as fases iniciais da pesquisa por novos fármacos. Diversos modelos *in vitro* têm sido descritos para a realização dos estudos de permeabilidade, mas ainda é evidente a carência de padronização de seus protocolos. O modelo de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA) é rápido e simples, podendo ser facilmente incorporado à rotina de um laboratório. Não obstante, tem apresentado excelente correlação com modelos *in vitro* quando na avaliação da permeabilidade de fármacos transportados pela via passiva transcelular. O principal objetivo deste trabalho foi investigar a influência das principais variáveis do método de PAMPA e seu impacto na permeabilidade de fármacos. Para tanto, foram selecionados 9 fármacos com características físico-químicas distintas, em função dos seguintes critérios: lipofilicidade ($\log P$); Área de Superfície Polar (PSA); Volume Molecular (VM); pK_a ; Peso Molecular (PM); Número doadores de ligação de hidrogênio (HBD) e Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Os fármacos selecionados foram listados quanto à sua permeabilidade em jejuno humano (P_{eff}) e em cultura de células Caco-2, além de Fração de Absorção (FA%) em humanos. Para o estudo das variáveis da técnica de PAMPA, a ferramenta de Desenho de Experimentos (DOE) foi utilizada e as seguintes condições de ensaio foram exploradas: gradiente de pH do meio do compartimento doador, presença ou ausência de ácido glicocólico no meio do compartimento receptor, variação do tempo de incubação, presença ou ausência de agitação das placas durante a incubação e variação da composição lipídica da membrana artificial. A combinação fatorial completa das condições de ensaio a serem exploradas resultou em 96 experimentos, os quais foram executados em triplicata. Os resultados obtidos apontaram que as variações do pH do meio do compartimento doador, do tempo de incubação e da composição do meio do compartimento receptor

foram as condições do ensaio de PAMPA que mais impactaram a permeabilidade dos fármacos. Os resultados obtidos nos 96 experimentos do DOE foram relacionados, a partir de regressão linear, com os parâmetros físico-químicos e dados de permeabilidade dos fármacos do estudo. O experimento de DOE que apresentou melhor correlação com os dados de permeabilidade em jejuno humano para os fármacos contemplados neste estudo teve um $R^2=0,858$. As condições de ensaio consideradas para este experimento foram: pH 4,5 no compartimento doador, incubação de 15 horas, ausência de agitação das placas, membrana composta por fosfatidilcolina 10% (p/v) e colesterol 0,5% (p/v) e presença de ácido glicocólico 0,5% (p/v) no compartimento receptor. Dentre as propriedades físico-químicas, o PM, PSA e VM foram propriedades comuns a grupos de fármacos cuja permeabilidade foi favorecida pelas mesmas condições de ensaio de PAMPA. Os maiores valores de permeabilidade em PAMPA foram obtidos para fármacos com P_{eff} entre 1 e $2 \cdot 10^{-4}$ cm/s, permeabilidade em células Caco-2 entre 20 e $27 \cdot 10^{-6}$ cm/s, faixa de logP entre 0 e 3 além de PM abaixo de 300 Da e PSA abaixo de $90\text{\AA}^2$.

Palavras chave: permeabilidade, PAMPA, membrana artificial, fosfolipídeos, propriedades físico-químicas

ABSTRACT

REIS, J.M. **Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA): Investigation of the assay variables in drug permeability study**. School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2013.

The permeability access is a critical step when defining the route of administration of a drug, besides from being one of the parameters considered for selecting the best candidates during the initial stages of new molecules discovery. For this reason, there is a need to implement high capacity and low cost models, which have a high correlation with *in vivo* permeability. Several *in vitro* models have been described for the studies of permeability, but the lack of standardization of protocols is still evident. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) is fast and simple and can be easily incorporated into the routine of a laboratory. Nevertheless, it has shown excellent correlation with *in vitro* models when evaluating the permeability of drugs that are transported primarily by passive transcellular route. The aim of this project was to investigate the influence of key variables of PAMPA on the permeability of drugs. Therefore, nine drugs with different physicochemical characteristics were selected based on the following criteria: lipophilicity (logP), Polar Surface Area (PSA), Molecular Volume (MV), pKa, Molecular Weight (MW), number of Hydrogen Bond Donors (HBD) and Biopharmaceutical Classification System (BCS). In addition, the drugs were listed for their permeability in human jejunum, Caco-2 and Fraction of Absorption (FA%) in humans. Design of Experiments (DOE) was considered to plan the PAMPA experiments, and the following assay conditions were explored: pH gradient in the donor compartment, glycocholic acid presence or absence in the acceptor compartment, variations in the incubation time, presence or absence of plate agitation and variations in the lipid composition of the artificial membranes. Full factorial combination of the assay variables resulted in 96 experiments, which were performed in triplicate. The results showed that the pH of the donor compartment, the incubation time and acceptor compartment composition were the assay conditions which most impacted the PAMPA results of drugs. The 96 DOE experiments results were then correlated, by linear regression, with both the physic-chemical and permeability data of the selected drugs. The DOE experiment that showed the best correlation with the permeability in human

jejunum ($R^2 = 0.858$) for the drugs included in this study had the following test conditions: pH 4.0 in the donor compartment, incubation of 15 hours, without plate agitation, artificial membrane composed of phosphatidylcholine 10% (w/v) and cholesterol 0.5% (w/v) in dodecane and presence of glycocholic acid 0.5% (w/v) in the receptor compartment. Among the studied physicochemical properties, the molecular weight (MW), polar surface area (PSA) and molecular volume (VM) were the best drivers for determining PAMPA most suitable assay conditions. The highest PAMPA values were obtained for drugs with P_{eff} between 1 and $2 \cdot 10^{-4}$ cm/s and Caco-2 permeability between 20 and $27 \cdot 10^{-6}$ cm/s, besides from logP between 0 and 3 , MW below 300 Da and PSA below $90 \text{ \AA}^2$.

Keywords: permeability, PAMPA, artificial membrane, phospholipids, physicochemical properties

1. INTRODUÇÃO

As primeiras pesquisas com novas moléculas inicialmente selecionavam os fármacos potenciais com base na sua atividade farmacológica, seguida por demais ensaios sobre seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico, visando acessar suas características de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET). Esta estratégia deixava margem para erros, além de necessitar de uma grande quantidade de tempo e recursos (PRAVEEN; CHONG, 2005).

Atualmente, as pesquisas para obtenção de novos fármacos têm sido direcionadas para estudos da eficácia farmacológica juntamente com a determinação do perfil ADMET dos compostos. Um grande desafio para a expansão deste setor de desenvolvimento é a etapa de seleção de compostos com base nas suas propriedades biofarmacêuticas (ex.: solubilidade, permeabilidade intestinal e estabilidade metabólica).

O transporte de fármacos através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico, que inclui a passagem dos compostos por diferentes vias. Além disso, existem diferentes mecanismos de influxo e efluxo - via carreadores e transportadores - que comandam a permeabilidade dos compostos (PROULX, 1991).

O transporte passivo transcelular é o mais comum de todas as vias e pode ser descrito pela difusão de moléculas através dos enterócitos presentes na membrana intestinal. É um processo normalmente rápido, sendo a passagem através da membrana o fator limitante da taxa de absorção (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Para que a difusão na membrana seja eficiente, a molécula deve ser suficientemente lipofílica e com moderado peso molecular, propriedades as quais fazem parte da maioria dos fármacos (LANDE *et al.* 1995; LENNERNAS, 1998; AVDEEF, 2012; SKOLD *et al.* 2006).

A permeabilidade é governada principalmente pela lei de Fick de difusão, onde a força motriz vem do gradiente de concentração através da membrana (AVDEEF *et al.*, 2001). A taxa de permeação de fármacos através de membranas lipídicas é influenciada, portanto, por suas características físico-químicas. Dentre os parâmetros mais significativos, pode-se citar a lipofilicidade, pKa, peso molecular e área de superfície polar (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento de novas moléculas, os pesquisadores se utilizam de diversas técnicas para avaliar sua permeabilidade intestinal e, desta forma, selecionar as que potencialmente se tornarão medicamentos.

Os métodos mais difundidos para o estudo da permeabilidade de fármacos são: 1) Métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares, tais como segmentos de tecidos de animais, cultura de células de adeno carcinoma (Caco-2) ou de rim canino (MDCK); 2) Métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídios, exemplificados pelo ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA); 3) Métodos *in vivo* que contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; 4) Métodos *in situ* que consistem na perfusão do fármaco em determinados trechos do epitélio intestinal e 5) Métodos *in silico* que empregam descritores moleculares em programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos. Assim, a utilização de um destes métodos e mesmo a combinação dos mesmos, tem sido o objeto da publicação de recentes pesquisas na área da biofarmácia (STENBERG *et al*, 2001; SUGANO *et al*, 2003; AVDEEF *et al*, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; OBATA *et al*, 2005; MASAOKA *et al*, 2006; SHAH *et al*, 2006; CHEN *et al*, 2007; VOLPE *et al*, 2007; LI *et al*, 2008; DREASSI *et al*, 2009; CHEN; YU, 2009; MENSCH *et al*, 2010).

O ensaio de PAMPA foi primeiramente proposto por Kansy e colaboradores (1998) com o objetivo de avaliar a permeabilidade transcelular passiva de fármacos de um modo ágil e em larga escala (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). Neste método, o fármaco é inicialmente disposto em um compartimento inferior, denominado de doador. Durante o período de incubação, o fármaco migra, por difusão, para uma placa acoplada acima do seu compartimento de origem, também chamada de receptora. O sistema doador-receptor forma uma espécie de “sanduíche”, sendo que a base da placa receptora contém uma membrana composta por um polímero sintético e impregnada com uma solução lipídica. Desta forma, o fármaco que é quantificado na placa receptora ao final do tempo de incubação, deve ter afinidade tanto com a membrana lipídica, quanto com a solução hidrofílica da placa superior.

O PAMPA é uma técnica de grande valia para diferenciar e, até mesmo, selecionar fármacos com base na sua taxa de permeação passiva transcelular. Por ser uma técnica simples, rápida e reprodutível, têm sido objeto de

crescentes publicações na literatura. Existem diversas condições de ensaio que afetam os resultados de permeabilidade obtidos através desta técnica, dentre eles destacam-se, o pH do compartimento doador; a composição do meio receptor; o efeito da camada de água estacionária (CAE); e a composição lipídica da membrana. Os protocolos para a realização deste ensaio diferem consideravelmente entre laboratórios, o que acarreta variações significativas nos resultados (AVDEEF; TESTA, 2002; FUGIKAWA *et al.*, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; CAO *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; DAHAN; HOFFMAN, 2007; FISCHER *et al.*, 2007; REIS; SINKO; SERRA, 2010).

Dado o exposto, evidencia-se a necessidade iminente de uma técnica de PAMPA que apresente uma padronização das condições do ensaio, em busca dos parâmetros ideais de acordo com as características físico-químicas dos fármacos. Além disso, faz-se necessária uma maior aproximação dos valores de permeabilidade obtidos através da técnica de PAMPA com os dados de permeabilidade *in vivo*. Desta forma, o presente trabalho tem como principais objetivos investigar as condições de ensaio de PAMPA que gerem os maiores valores de permeabilidade de fármacos estruturalmente diferentes e sua correlação com dados de permeabilidade em jejuno humano e em cultura de células Caco-2.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo investigar as principais variáveis do ensaio de PAMPA e seu impacto na permeabilidade de fármacos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Definir as propriedades físico-químicas utilizadas como critério na seleção de fármacos para os estudos de PAMPA;
- ii. Validar a metodologia de quantificação dos fármacos selecionados;
- iii. Realizar um mapeamento das principais variáveis da técnica de PAMPA;
- iv. Estudar o impacto das variáveis do ensaio de PAMPA sobre o resultado de permeabilidade dos fármacos selecionados;
- v. Investigar a correlação entre os resultados de PAMPA obtidos e os parâmetros físico-químicos dos fármacos selecionados;
- vi. Investigar a correlação entre os resultados de PAMPA obtidos e os dados de FA%, P_{eff} em jejuno humano e permeabilidade em células Caco-2 extraídos da literatura para os fármacos selecionados;
- vii. Realizar estudos com a membrana fosfolipídica utilizando técnicas de microscopia e calorimetria.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Absorção de fármacos

A absorção do fármaco no trato gastrointestinal é complexa e pode ser influenciada por vários fatores, os quais têm impacto sobre a dissolução/solubilidade e permeabilidade do fármaco. Estes podem ser resumidos em fatores fisiológicos, físico-químicos e farmacêuticos (SHARGEL *et al.*, 2005). Fatores fisiológicos estão relacionados às características anatômicas e fisiológicas do local de administração como, por exemplo, tempo de esvaziamento gástrico, motilidade intestinal, pH intestinal, mecanismos envolvidos no transporte de fármacos através das membranas dos enterócitos, metabolismo pré-sistêmico, fluxo de sangue no intestino, conteúdo luminal, composição dos fluidos intestinais e estados patológicos do paciente (YU *et al.*, 1996; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A via oral é a principal via de administração de medicamentos em função da melhor aceitação pelos pacientes, conveniência, baixo custo e por permitir a fácil adesão ao tratamento, principalmente nos casos de terapias crônicas (LENNERNAS; ABRAHAMSSON, 2005; DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

A absorção de fármacos tem um papel essencial na determinação da sua biodisponibilidade (F), uma vez que contribui ativamente com o tempo e extensão em que um fármaco é exposto ao seu sítio de ação farmacológico *in vivo*. A biodisponibilidade pode ser matematicamente expressa pela equação 1 abaixo.

$$F = F_a \times F_g \times F_h \quad (1)$$

Onde F_a é fração absorvida do fármaco, F_g é a fração que não sofre metabolização pré-sistêmica no intestino e F_h é a fração que não passa pelo metabolismo de primeira passagem hepático (KWAN, 1997; SUN *et al.*, 2004).

A F_a , apresentada na equação 1, é determinada por dois parâmetros fundamentais e intrinsecamente relacionados ao fármaco: sua solubilidade e permeabilidade gastrointestinal (CAO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a extensão e a taxa de absorção são também influenciadas por outros fatores físico-químicos, tais como o pK_a , estabilidade, difusividade, lipofilicidade, tipo de sal, tamanho de partícula e forma cristalina do fármaco.

O aumento da absorção do fármaco por via oral e a minimização do seu

metabolismo resulta num aumento da biodisponibilidade e, por consequência, do efeito terapêutico do medicamento (CAO *et al.*, 2006).

Para fármacos pouco solúveis em água, a solubilidade no trato gastrointestinal pode limitar sua concentração intraluminal, desfavorecendo a absorção intestinal. A presença de fármaco na região intraluminal intestinal é o resultado da interação de vários fatores, incluindo pH, presença de sais biliares, lipídeos e seus produtos de degradação (ANNAERT *et al.*, 2010).

Com base nos conceitos de permeabilidade intestinal e solubilidade, e sua importância na determinação do potencial de absorção de fármacos, foi criado o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (YU *et al.*, 2002).

O SCB foi proposto como ferramenta para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, com o objetivo de auxiliar na predição da disponibilidade *in vivo* dos fármacos, uma vez que existem limitações técnicas, econômicas e éticas relacionadas aos ensaios de biodisponibilidade que empregam seres humanos (AMIDON *et al.*, 1995). Assim, a avaliação das propriedades de permeabilidade e solubilidade dos fármacos, embora indiretamente, oferece objetivas indicações sobre a eficácia dos medicamentos. Além disso, permite a utilização de modelos *in vitro* mais facilmente reprodutíveis, sem oferecer risco a voluntários sadios.

O SCB é fundamentado no princípio de que o controle da extensão e a velocidade de absorção de um fármaco, quando administrado por via oral, dependem basicamente de dois aspectos: da solubilidade do próprio fármaco e de sua permeabilidade através das membranas biológicas. Fundamentado nessas propriedades, o SCB divide os fármacos em quatro classes de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade, conforme demonstrado na Figura 3.1 (WU; BENET, 2005).

Classe I Alta Solubilidade Alta Permeabilidade	Classe II Baixa Solubilidade Alta Permeabilidade
Classe III Alta Solubilidade Baixa Permeabilidade	Classe IV Baixa Solubilidade Baixa Permeabilidade

Figura 3.1 - Classificação de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (Adaptado de WU; BENET, 2005)

Os fármacos Classe I são rápida e completamente absorvidos, com extensão de absorção maior que 90%. Os fatores limitantes para a absorção de um fármaco classe I são a dissolução ou esvaziamento gástrico (no caso da dissolução ser muito rápida) (AMIDON *et al.*, 1995; BONAMICI, 2009).

Para os fármacos Classe II, a etapa limitante no processo de absorção é a solubilidade do fármaco no trato gastrointestinal (TGI). A variabilidade na absorção destes fármacos pode se dar pelas diferenças de formulação e variáveis fisiológicas, tais como volume de líquido intestinal, área superficial, pKa da molécula e pH do meio. (AMIDON *et al.*, 1995; BONAMICI, 2009).

Já para os fármacos Classe III, a permeabilidade através da membrana intestinal é a etapa limitante no processo de absorção. A velocidade e extensão da absorção desta classe de fármacos podem ser altamente variáveis devido às diferenças no trânsito gastrointestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana. O perfil de dissolução é geralmente bem definido e a passagem do fármaco para o intestino é controlada pela taxa de esvaziamento gástrico (AMIDON *et al.*, 1995; BONAMICI, 2009).

Finalmente, os fármacos Classe IV possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Possuem absorção muito baixa, apresentando problemas quando administrados por via oral (AMIDON *et al.*, 1995; BONAMICI, 2009).

Em 2000, o FDA publicou um guia para isenção dos estudos de biodisponibilidade/bioequivalência com base no SCB (bioisenção) e trata tanto de medicamentos novos, como medicamentos genéricos ou alterações pós-registro (UNITED STATES, 2000). O SCB tem sido implementado pelo FDA (2002), sendo utilizado para reduzir uma quantidade de trabalhos requeridos para validar uma mudança na formulação ou no processo de produção após a aprovação do fármaco, através da concessão de renúncia a determinados ensaios clínicos (MASUNGI *et al.*, 2008).

3.1.1 Mecanismos de transporte de fármacos

O processo de absorção de fármacos ocorre principalmente no intestino delgado, mais particularmente no duodeno e na porção proximal do jejuno através dos enterócitos (HILLGREN *et al.*, 1995; FAGERHOLM; LENNERNAS, 1995; LENNERNAS, 1997; BALIMANE *et al.*, 2000; GRASSI *et al.*, 2007).

Enterócitos são células que apresentam um lado apical voltado para o lúmen do intestino, e um lado basolateral voltado para a circulação sistêmica. As membranas apical e basolateral diferem em relação à morfologia, composição bioquímica, proteínas transportadoras e função. O lado da membrana basolateral tem um menor teor de colesterol e glicolipídeos em relação ao lado da membrana apical, e é mais fluído e permeável. As microvilosidades que formam a camada de borda em escova estão no lado apical do enterócito. Os enterócitos são conectados por complexos intercelulares, chamados junções oclusivas (ou íntimas). A característica lipídica das membranas dos enterócitos e as junções oclusivas constituem as principais barreiras físicas para a permeação de fármacos (FAGERHOLM; LENNERNAS, 1995; GRASSI *et al.*, 2007).

O transporte de fármacos através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico, que inclui a passagem dos compostos por diferentes vias. Além disso, existem diferentes mecanismos de influxo e efluxo - via carreadores e transportadores - que comandam a permeabilidade dos compostos (PROULX, 1991). Normalmente, a rota mais rápida domina a absorção de um composto (BURTON *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2005). Em geral, a difusão passiva é o principal mecanismo para a absorção de muitos compostos lipofílicos, enquanto o processo mediado por transportadores regula a absorção de fármacos substratos a estes (CAO *et al.*, 2006).

O transporte passivo transcelular pode ser descrito pela difusão de moléculas através dos enterócitos presentes na membrana intestinal. É um processo normalmente rápido, sendo a passagem através da membrana o fator limitante da taxa de absorção (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Para que este processo seja eficiente, a molécula deve ser suficientemente lipofílica e com moderado peso molecular (200-400 Da), propriedades estas que a maioria dos fármacos possui (LANDE *et al.* 1995; LENNERNAS 1995; SKOLD *et al.* 2006; AVDEEF, 2012). Por meio da análise de parâmetros farmacocinéticos com 472 fármacos, observou-se que 50% deles tinham um logP superior a 2 e 80% apresentaram um logP superior a zero, confirmando a presença da lipofilicidade em uma gama representativa de fármacos (LENNERNAS, 2007).

No transporte passivo paracelular, mais expressivo nas porções superiores do intestino delgado, ocorre a passagem do fármaco através das junções oclusivas (JUNGINGER; VERHOEF, 1998). Este tipo de transporte

ocorre geralmente para fármacos hidrofílicos e de pequeno tamanho molecular (PROULX, 1991). Vários estudos têm relatado aumento da permeabilidade do fármaco em função da coadministração de um modulador de absorção, incluindo agentes tensoativos, quelantes de cálcio, ciclodextrinas, e quitosanas. Estas substâncias aumentam a permeabilidade principalmente através da abertura das junções oclusivas (GONZALES; MARISCAL; LEGEN; SALOBIR; KERK, 2005; APPARAJU; NALLANI, 2007).

Já no transporte mediado por carreadores, os fármacos podem sofrer influxo, com o auxílio de transportadores específicos, ou efluxo, através dos chamados transportadores de secreção (ex.: Glicoproteína P, ou P-gp) (BOHETS *et al.*, 2001). A absorção do fármaco mediada por transportadores ocorre por meio de processo ativo ou por difusão facilitada e é um processo saturável (BUCKLEY *et al.*, 2012). Enquanto os transportadores de influxo são responsáveis pela entrada do fármaco na célula, os transportadores de efluxo mediam o transporte do fármaco no sentido oposto, isto é, a partir da membrana basolateral da célula para o seu lado apical, resultando na secreção do fármaco (TAKANO *et al.*, 2006).

A glicoproteína-P (P-gp) é o maior representante dos transportadores de efluxo de fármacos. A sua atividade tende a aumentar progressivamente do estômago para o cólon e tal fator deve ser considerado no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada (BENET *et al.*, 1999; MARTINEZ; AMIDON, 2002; DAHAN; AMIDON, 2009). Os excipientes farmacêuticos (GOOLE *et al.*, 2010) e alimentos (DEFERME; AUGUSTIJNS, 2003) podem inibir ou intensificar a ação de glicoproteína-P. Outros transportadores de efluxo, tais como proteína da resistência ao câncer de mama (BCRP), e proteínas de resistência a múltiplos fármacos 2 (MRP-2), são também funcionais nos enterócitos, que pode limitar a absorção do fármacos (BALIMANE; HAN; CHONG, 2006).

Os diferentes caminhos para a absorção intestinal de um composto podem ser visualizados na Figura 3.2.

Figura 3.2 - Diferentes caminhos para a absorção intestinal de um composto

(a) permeabilidade transcelular passiva; (b) transporte mediado por carreador; e (c) permeabilidade paracelular passiva; (d) Efluxo via Glicoproteína P (P-gp); (e) enzimas presentes nas células podem metabolizar os compostos (adaptado de PROULX, 1991).

Além dos mecanismos de transporte classicamente descritos na literatura, o transporte trans-camada têm sido recentemente explorado para fármacos de baixo peso molecular (BALAZ, 2012). Este mecanismo é observado principalmente em modelos experimentais de bicamadas planares, tipicamente presentes nas membranas fosfolipídicas artificiais, e em lipossomas. Basicamente, o transporte de fármacos ocorre através de poros presentes nas membranas. A difusão trans-camada é observada em fármacos que apresentam uma força intermediária de interação com a membrana lipídica. Forças muito fracas de interação desfavorecem esta passagem e forças muito intensas provocam o acúmulo do fármaco nos poros da membrana ao invés de seu transporte através deles (BALAZ, 2012).

3.1.2 Propriedades físico-químicas que interferem na absorção de fármacos

A dissolução do fármaco nos líquidos do TGI e a sua permeabilidade através da membrana plasmática são os requisitos para que este atinja a circulação sistêmica e esteja biodisponível. As propriedades moleculares do fármaco são determinantes tanto para a solubilidade aquosa do mesmo, quanto para a permeabilidade através da bicamada fosfolipídica da membrana biológica (SHARGEL *et al.*, 2005).

Assim, um fármaco deverá apresentar características hidrofílicas suficientes que permitam sua dissolução nos líquidos corporais, já que estes

têm a água como principal componente. Por outro lado, as moléculas devem ter características hidrofóbicas que as possibilite atravessar a bicamada fosfolipídica da membrana da célula. É importante ressaltar que a maioria dessas propriedades são dependentes umas das outras (AVDEEF, 2012).

De acordo com a lei de Fick, a permeação passiva é um processo de difusão, cuja força motriz vem do gradiente de concentração através da membrana (AVDEEF *et al.*, 2001). Quando em condição de equilíbrio, ou seja, na presença de um gradiente linear de concentração do fármaco na membrana, e em condição *sink* (delimitada aqui como sendo a ausência de fármaco no compartimento receptor) a Lei de Fick pode ser demonstrada conforme apresentado pela equação 2:

$$J = P_e C_D \quad (2)$$

Onde J é expresso como o fluxo ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) do fármaco através da membrana, C_D (mol cm^{-3}) é a concentração do fármaco no compartimento doador, e P_e (cm s^{-1}) é a permeabilidade efetiva (em função da difusividade, coeficiente de partição água/membrana e espessura da membrana (AVDEEF, 2012)).

Via de regra, a taxa de transporte de um fármaco de um compartimento apical para um basolateral, atravessando uma membrana semi-permeável depende principalmente dos seguintes fatores: concentração inicial e final de fármaco nos compartimentos doador e receptor, volume de meio presente nos compartimentos doador e receptor, tempo de permeação e área da membrana (AVDEEF, 2012).

A permeabilidade calculada é efetiva quando a quantidade de fármaco retida membrana, além da sua concentração nos compartimentos doador e receptor, é considerada. Nos casos de ensaios de permeabilidade empregando cultura de células (ex.: Caco-2 e MDCK), onde a retenção na membrana celular é geralmente negligenciada, a permeabilidade é considerada aparente (AVDEEF, 2012).

A difusividade e o coeficiente de partição água/membrana de um fármaco são influenciados, sobretudo, por suas características físico-químicas. Dentre os parâmetros mais significativos, pode-se citar a lipofilicidade, pK_a , peso molecular (PM), volume molecular (VM), Número doadores de ligação de

hidrogênio (HBD) e área de superfície polar (LIPINKSI *et al.*, 2001; REYNOLDS *et al.*, 2009).

A regra dos 5 introduzida por Lipinski ainda é o modelo mais usado na aplicação de propriedades físico-químicas para a predição da permeabilidade de fármacos. O modelo, baseado em um estudo de aproximadamente 2290 fármacos, prevê valores altos de absorção para fármacos que se enquadrem em ao menos duas das seguintes características: grau de lipofilicidade ($\log P$) de até de 5, PM de até 500 e HBD inferior a 5 (LIPINKSI *et al.*, 2001).

3.1.2.1 Lipofilicidade ($\log P$)

O grau de lipofilicidade de um fármaco é comumente avaliado através da técnica de partição em octanol/água, onde os compostos mais lipofílicos tendem a apresentar uma razão octanol/água superior a 1, razão que é comumente expressa de forma logarítmica, denominada de $\log P$ (SANGSTER, 1997). A definição deste coeficiente é fundamentada num estudo detalhado da distribuição ou partição do fármaco entre uma fase aquosa polar e uma fase apolar. O $\log P$ é calculado pela razão entre a solubilidade do fármaco em um solvente apolar (por exemplo, octanol) e sua solubilidade em um solvente polar, a água. Quanto maior o valor de $\log P$, maior a afinidade pela estrutura lipídica da membrana plasmática e consequentemente maior taxa de partição e absorção. Entretanto, vários estudos têm indicado que fármacos muito hidrofílicos ($\log P < -3$) e muito hidrofóbicos ($\log P > 6$) estão sempre associados a uma absorção *in vivo* incompleta (UNGELL; ABRAHAMSSON, 2009).

Numa correlação entre a permeabilidade e o $\log P$ geralmente uma relação sigmoidal é obtida. À medida que o $\log P$ de uma molécula aumenta, também o faz a sua capacidade de penetrar na membrana celular, resultando no aumento da permeabilidade até que um platô, referente à limitação gerada pela CAE adjacente à membrana, seja atingido (AMIDON; LEE; TOPP, 2000). Buscando entender a relação entre a permeabilidade intestinal e o $\log P$, Kansy e colaboradores (2001) utilizaram um grupo de 120 fármacos estruturalmente diversos. Os autores verificaram que, para o conjunto de fármacos com $\log P$ abaixo de 0,5, a fração permeada foi de 20%. Por sua vez, os fármacos com

logP entre 1 e 2,5 tiveram quase 100% da sua concentração inicial quantificada no compartimento receptor. No entanto, fármacos cujo logP era superior a 2,5 novamente tiveram sua permeabilidade reduzida (KANSY *et al.*, 2001).

Apesar de altamente informativa, a característica de partição água/octanol não pode ser considerada de forma isolada quando na predição da permeabilidade de fármacos. De acordo com os estudos de partição, uma molécula ionizada precisa estar acompanhada de um contra-íon para que, na forma de par iônico, penetre em uma fase lipídica. No entanto, uma molécula que atravessa uma barreira de octanol não necessariamente penetra através de uma camada fosfolipídica, dado o fato da estrutura peculiar do octanol facilitar a passagem de íons (AVDEEF *et al.*, 2001).

Isto se deve, principalmente, ao fato de as membranas e macromoléculas suportarem cargas elétricas e apresentarem afinidade a diversos componentes iônicos, devido à presença de grupos fosfato e/ou aminoácidos na sua estrutura. Por outro lado, este mesmo efeito não é observado com o octanol, o qual não carrega qualquer tipo de carga eletrostática e, desta forma, a partição por par iônico através deste solvente é desfavorável (REYNOLDS *et al.*, 2009). Desta forma, é necessário o estudo de propriedades físico-químicas adicionais para um maior entendimento dos fatores que influenciam a permeabilidade passiva de fármacos.

3.1.2.2 Constante de dissociação (pKa)

A constante de dissociação, também denominada pKa, inter-relaciona o pH do meio e o estado de carga. Conceitualmente, o valor de pKa é aquele onde uma molécula está 50% ionizada e 50% na forma não-ionizada. Conforme a teoria da partição em pH, os fármacos são transportados através de barreiras biológicas primariamente quando estão na forma não-ionizada, sendo que seu pKa é responsável por direcionar seu local de absorção no trato gastrointestinal (HOG BEN *et al.*, 1959). Por esta razão, esta teoria prevê que condições de pH que favoreçam a forma não-ionizada de um fármaco possibilitem maiores valores de permeabilidade.

Uma vez que os compostos são geralmente ácidos fracos ou bases fracas, a teoria da partição em pH se torna significativa no desenho de estudos de permeabilidade (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998). De acordo com

esta teoria, moléculas polares e ionizadas são mais solúveis em água, porém, mais lentamente absorvidas do que as não ionizadas. Neste sentido, é provável que um fármaco fracamente ácido seja melhor absorvido no estômago, onde se encontra na forma não ionizada, enquanto que um fármaco fracamente básico seja absorvido no intestino, onde prepondera a forma não ionizada (AMIDON; LEE; TOPP, 2000; AVDEEF *et al.*, 2005)

3.1.2.3 Peso Molecular (PM)

O PM pode atuar como uma limitação física ao transporte de alguns fármacos, principalmente quando a via passiva paracelular é considerada. Atribui-se o valor de 200 Da para o peso molecular de um fármaco, para que este possa atravessar as junções coesas presentes entre as células endoteliais e, assim, permear pela via passiva (FUGIKAWA *et al.*, 2005). A partir de uma projeção gráfica entre PM e logP, Ritchie e colaboradores (2011) demonstraram que, numa seleção de 178 fármacos, o máximo valor de permeabilidade é apresentado por fármacos com PM entre 150-350 Da e logP entre 0 e 3,5 (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011).

3.1.2.4 Área de Superfície Polar (PSA)

A Área de Superfície Polar, ou “Polar Surface Area” (PSA) é definida como a soma da área de superfície de todos os átomos polares de uma molécula, usualmente oxigênio, nitrogênio e hidrogênio (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000). De maneira geral, os parâmetros de PSA são calculados de forma mais fidedigna quando o número de ligações de hidrogênio é avaliado a partir da estrutura 3D da molécula (BOHETS *et al.*, 2001).

Conforme descrito na literatura, valores de PSA abaixo de 120 ângstrons quadrados ($\text{\AA}^2$) são indicados para garantir boa absorção de fármacos administrados por via oral e transportados passivamente (FLATEN *et al.*, 2006; BOHETS *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2002). Por outro lado, para que os fármacos atravessem a barreira hematoencefálica, o valor de PSA não deve exceder 60 $\text{\AA}^2$ (ERTL; Rohde; Selzer, 2000).

Estudos que avaliaram a correlação entre as propriedades de PSA e o logP, demonstraram que os fármacos que apresentam valores de PSA fora da faixa de 10 a 125 $\text{\AA}^2$ e logP entre -1 e 6 demonstraram problemas de

biodisponibilidade (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011).

3.1.2.5 Número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD)

Camadas lipídicas ordenadas apresentam uma quantidade finita de grupamentos com ligação de hidrogênio. Estes grupamentos estão localizados exclusivamente nas cabeças polares dos fosfolípídeos. Para que tenham afinidade às cadeias de hidrocarbonetos da camada lipídica, os fármacos devem ser suficientemente lipofílicos para superarem a perda de energia gerada na quebra das ligações de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolípídeos. Este fator representa, portanto, uma barreira energética considerável para fármacos que possuam tendências a fortes ligações doadoras de hidrogênio (MALKIA *et al.*, 2004). A capacidade de um fármaco formar ligações de hidrogênio tem sido reportada na literatura como marcadamente interferente na sua permeabilidade (TAYAR *et al.*, 1991; CONRADI *et al.*, 1991). Além disso, as diferenças existentes entre a partição lipossoma/água e a partição octanol/água de fármacos têm sido fundamentada com base nas ligações de hidrogênio (VAES *et al.*, 1998).

3.2 Modelos para avaliar a absorção intestinal de fármacos

A permeabilidade intestinal é a capacidade que o composto tem de atravessar a barreira biológica e pode variar conforme sua localização no trato gastrointestinal (GRASS, 1997). Considera-se um fármaco altamente permeável aquele cuja extensão de absorção em seres humanos for igual ou superior a 85% ou a 90%, dependendo da agência regulatória (UNITED STATES, 2000; YU *et al.*, 2002; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; CHEN; YU, 2009).

O conhecimento da permeabilidade de um fármaco e dos mecanismos relacionados a este processo constitui etapa crucial no desenvolvimento das moléculas candidatas a fármacos, na determinação do local de administração de um fármaco e no desenvolvimento de formulação farmacêutica. Por este motivo, há uma grande necessidade da implementação de modelos de alta capacidade, baixo custo e que tenham uma grande correlação com as características de permeabilidade e absorção *in vivo* (AVDEEF; TESTA, 2002;

FUGIKAWA *et al.*, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; CAO *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; DAHAN; HOFFMAN, 2007; FISCHER *et al.*, 2007).

Com a finalidade de avaliar a permeabilidade de fármacos, diferentes métodos foram desenvolvidos. Atualmente, os métodos mais amplamente utilizados para a caracterização da permeabilidade dos fármacos são: 1) Métodos *in vitro* baseados em sistemas artificiais compostos por lipídeos, exemplificados pelo ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA); 2) Métodos *in vitro* baseados em sistemas celulares, tais como cultura de células de adenocarcinoma (Caco-2) ou de rim canino (MDCK); 3) Métodos *ex vivo*, que empregam tecido animal em câmaras de difusão horizontal, do tipo Ussing, ou verticais, do tipo células de Franz, e vesículas de membrana; 4) Métodos *in situ* que consistem na perfusão do fármaco em determinados trechos do epitélio intestinal animal; 5) Métodos *in vivo* que contemplam os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; e 6) Métodos *in silico* que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos. Assim, a utilização de um destes métodos e mesmo a combinação entre eles têm sido o objeto de publicações recentes na área da biofarmácia (STENBERG, 2001; SUGANO, 2003; AVDEEF, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; OBATA, 2005; MASAOKA *et al.*, 2006; SHAH, 2006; CHEN, 2007; VOLPE, 2007).

No intestino, uma única camada de células epiteliais cobre a parede interior intestinal e forma a barreira limitante da velocidade para a absorção de medicamentos dissolvidos. Como consequência, a adequada reconstituição *in vitro* de uma célula epitelial diferenciada humana permite a previsão *in vivo* da absorção do fármaco por via oral (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001). Ademais, em virtude da complexidade e alto custo dos experimentos *in vivo*, há uma crescente utilização dos modelos de cultura de células das linhagens Caco-2 e MDCK para substituí-los (AVDEEF; TAM, 2010).

De maneira geral, as células Caco-2 expressam diversas enzimas presentes na borda em escova do intestino, algumas isoenzimas do Citocromo P (CYP) e enzimas metabolizadoras de fase II, tais como glutathione S-transferase e sulfotransferase. (BOHETS *et al.*, 2001, CHAN *et al.*, 2005, SUGANO *et al.*, 2010). Entretanto, do ponto de vista experimental, as células Caco-2 demandam uma cultura celular de 20 dias para a diferenciação da

monocamada, formação das junções coesas, polarização da célula e expressão dos mecanismos de efluxo. (BOHETS *et al.*, 2001).

MDCK são uma linhagem de células renais de cães que levou o nome dos primeiros autores (Madin e Darby) a citarem a técnica. Esta linhagem de células, quando cultivada sobre suportes de permeação (ex. Placas Transwell®), se diferencia em células colunares epiteliais e formam junções coesas com uma maior rapidez que a cultura de células Caco-2 (TANG; HORIE; BORCHARDT, 2002). A partir da transfecção do gene humano MDR1, as células MDCK-MDR1 são capazes de expressar a proteína de efluxo P-gp de forma significativa, aproximando-se das características de expressão da Caco-2 (TANG; HORIE; BORCHARDT, 2002). No entanto, assim como em Caco-2, este método é laborioso e depende do crescimento celular, além de estar suscetível à contaminação microbiológica.

3.2.1 Modelos artificiais

O universo dos sistemas artificiais para avaliar a permeabilidade de fármacos compreende principalmente a Membrana Artificial Imobilizada (IAM), a Membrana Negra Lipídica (*Black Lipid Membrane* – BLM) e o modelo de Membrana Artificial Paralela (“Parallel Artificial Membrane Permeability Assay” - PAMPA).

3.2.1.1 Membrana Negra Lipídica (*Black Lipid Membrane* – BLM)

Mueller *et al.* descobriram em 1962 que, quando uma pequena quantidade de um fosfolípideo (2% (p/v) de solução de alceno) era cuidadosamente colocada sobre um orifício presente em uma folha fina de plástico, uma película fina gradualmente se formava no centro do orifício, com o excesso de lipídeos fluindo pelo perímetro. Eventualmente, o filme formado no centro do orifício apresentava uma coloração negra, detectada pela reflexão da luz na sua superfície (AVDEEF; TESTA, 2002;. CHEN *et al.*, 2007). Dados na literatura apontam que o transporte de fármacos no sistema BLM ocorre através dos poros presentes do filme formado (BALAZ, 2012).

Devido à extrema fragilidade da membrana, além de seu processo laborioso de preparo, o modelo BLM tem sido substituído por técnicas artificiais

mais robustas, tais como PAMPA (AVDEEF; TESTA, 2002;. CHEN *et al*, 2007).

3.2.1.2 Membrana Artificial Imobilizada (*Immobilized Artificial Membrane - IAM*)

A IAM foi introduzida como ferramenta cromatográfica para estudar a interação entre fármacos membranas biológicas, tendo inicialmente a lecitina como fase estacionária de uma coluna de sílica octadecílica (PIDGEON; VENKATARAM, 1989). De maneira geral, a IAM consiste de uma superfície fosfolipídica capaz de fornecer informações da partição fármaco/membrana baseadas na lipofilicidade e interações eletrostáticas. É constituída por uma monocamada de fosfolípidos ligados covalentemente a um suporte de sílica-propilamina inerte. Assim, esta superfície simula uma das metades da bicamada de membrana (CHAN *et al.*, 2005).

Na tentativa de utilizar a IAM como ferramenta para avaliar a permeabilidade, pesquisadores da Janssen selecionaram 32 fármacos com valores de permeabilidade em Caco-2 conhecidos e observaram um coeficiente de correlação (R^2) entre permeabilidade em células Caco-2 e IAM igual a 0,31. Além disso, 2 compostos avaliados como altamente permeáveis em cultura de células Caco-2, mostraram permeabilidade negligenciável em IAM, apresentando uma retenção na membrana artificial de aproximadamente 90% (BOHETS *et al.*, 2001).

No entanto, a técnica de IAM pode superestimar os valores de logP de alguns fármacos com alto PM, principalmente devido ao aprisionamento estérico da molécula do fármaco na coluna de IAM (AVDEEF, 2001). Desta forma, sistemas artificiais mais complexos e que melhor mimetizem o ambiente de permeação passiva de fármacos *in vivo* se fazem necessários.

3.3 Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

O ensaio de permeabilidade por meio do modelo de Membrana Artificial Paralela (“Parallel Artificial Membrane Permeability Assay” - PAMPA), proposto inicialmente por KANSY e colaboradores (1998), tem atraído grande atenção de diversos pesquisadores que estudam a absorção passiva transcelular de fármacos pela via oral (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; LIPINKSI,

2002; VEBER *et al.*, 2002; DI *et al.*, 2003; RUELL; TSINMAN; AVDEEF, 2003; AVDEEF *et al.*, 2005; CARRARA *et al.*, 2007; AVDEEF *et al.*, 2007, MASUNGI *et al.*, 2008, MENSCH *et al.*, 2010; NIRASAY *et al.*, 2011; VELICKY *et al.*, 2011; HALLIFAX *et al.*, 2012). A técnica de PAMPA é capaz de prever não apenas a partição água/membrana de fármacos, mas também sua solubilidade e estado de carga em diferentes valores de pH. Desta forma, apresenta vantagens competitivas importantes quando em comparação à IAM (BOHETS *et al.*, 2001; AVDEEF *et al.*, 2007).

Desde sua primeira citação na literatura, crescentes publicações contemplando a técnica de PAMPA vêm sendo divulgadas a cada ano, conforme apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Relação do número de publicações sobre a técnica de PAMPA no período de 1999-2012. Levantamento feito no período de Janeiro de 1999 a Julho de 2012 utilizando a expressão “PAMPA permeability”.

Fonte: Science Direct. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 5 de Agosto de 2012.

No ensaio de PAMPA, um “sanduíche” é formado por duas placas de 96 poços, sendo que a placa inferior é denominada compartimento doador, onde os fármacos a serem avaliados estão diluídos em uma solução tampão. A placa superior compõe o compartimento receptor, e apresenta membranas sintéticas de PVDF impregnadas com solução lipídica, formando uma barreira através da qual os fármacos migram por difusão. A Figura 3.4 apresenta um desenho esquemático do experimento de PAMPA.

Figura 3.4 - Desenho esquemático do sanduíche de placas usado em PAMPA

A) placas receptora e doadora vazias; B) placa doadora preenchida com solução de fármacos e placa receptora apresentando solução tampão; C) Aspecto do sanduíche após encaixe das placas, com destaque para a direção do transporte do fármaco, da região apical (placa inferior) para basolateral (placa superior). Em seguida, o sanduíche é incubado sob temperatura e umidade controladas, na presença ou ausência de agitação (adaptado de AVDEEF, 2012).

Em 2006, Galinis-Luciani e colaboradores criticaram a técnica de PAMPA, afirmando ser esta apenas uma ferramenta sofisticada para prever a lipofolicidade de moléculas. Em contraposição a esta publicação, Avdeef e colaboradores (2007) apontaram importantes estudos. Dentre eles, o de Corti e colaboradores (2006) onde, com o emprego de membrana artificial composta de lecitina a 1,7% (p/v) e colesterol a 2,1% (p/v) dissolvidos em octanol obtiveram correlação entre os resultados de permeabilidade e a FA% em humanos em nível superior ($R^2 = 0,995$) ao observado entre FA% e os dados obtidos por meio do modelo de cultura de células Caco-2 ($R^2 = 0,813$). Ainda em contraposição à Galinis-Luciani (2006), Avdeef *et al.* (2007) citaram resultados de pesquisadores da Novartis, os quais selecionaram uma série de 84 fármacos anti-diabéticos e comprovaram níveis de correlação superiores entre os resultados de PAMPA e permeabilidade em células Caco-2 ($R^2 = 0,75$) quando comparados aos resultados de permeabilidade em células Caco-2 e logP dos fármacos ($R^2 = 0,21$) (AVDEEF *et al.*, 2007).

Em se tratando do uso conjugado de análises *in silico* e *in vitro*, Fisher e colaboradores (2007) estudaram a permeabilidade de 20 aminas quaternárias com emprego de membranas contendo 10% (p/v) de lecitina e 0,5% (p/v) de colesterol dissolvidos em dodecano. A partir dos resultados obtidos, eles puderam concluir que a técnica PAMPA pode ser usada para prever a permeabilidade de compostos permanentemente ionizados. Além disso, os descritores moleculares utilizados no estudo foram capazes de demonstrar que, para as aminas quaternárias, os altos valores de permeabilidade podem ser explicados pelo fato de as cargas eletrônicas estarem uniformemente distribuídas ao longo dos diversos anéis aromáticos destas moléculas (FISCHER *et al.*, 2007).

Numa tentativa de prever a atividade de 34 fármacos inibidores de protease utilizando ensaios *in vitro*, Li e colaboradores (2008) realizaram estudos comparativos entre atividade e permeabilidade, sendo a primeira expressa pela razão do coeficiente de inibição (K_i) pela concentração inibitória a 90% (IC90), K_i /IC90, e a segunda refere-se à taxa de permeação usando os modelos de permeabilidade em células Caco-2 e PAMPA. Levando em consideração que a absorção de um fármaco é fundamental para que este seja capaz de atingir o receptor alvo a exercer sua ação, estes pesquisadores observaram uma correlação entre K_i /IC90 e PAMPA de $R^2=0,76$, enquanto que a correlação observada entre K_i /IC90 e permeabilidade em células Caco-2 foi de apenas 0,29 (LI *et al.*, 2008). Estes dados são excelentes provas de que, para alguns fármacos permeados por via passiva, a técnica de PAMPA pode ser mais preditiva do que a técnica de permeabilidade em células Caco-2.

A partir da combinação entre ensaio *in vitro* (PAMPA), *in situ* (perfusão de cérebro de rato) e o uso de descritores moleculares *in silico*, Dagenais e colaboradores (2009) deram origem ao *in combo*-PAMPA. Este modelo foi capaz de satisfatoriamente prever a permeabilidade passiva de 19 fármacos através da barreira hematoencefálica, os quais foram agrupados a partir de dados experimentais de área de superfície permeada e de porcentagem de afinidade ao tecido hamatoencefálico retirados da literatura (DAGENAIS *et al.*, 2009).

Um trabalho fruto deste projeto comparou cinco métodos diferentes de PAMPA desenvolvidos por grupos distintos de pesquisadores e contemplando as mesmas 16 moléculas. Os resultados evidenciaram que o método que

utilizou experimentalmente uma mistura de fosfolipídeos e colesterol em proporções semelhantes às *in vivo* e, ainda, incorporou modelos mecânicos contendo descritores tais como difusividade em membrana e raio molecular (SUGANO *et al.*, 2002), foi o método que apresentou maior correlação com os dados de permeabilidade em jejuno humano (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

Novas publicações focando o aprimoramento e/ou entendimento do PAMPA como ensaio de escolha para avaliação da permeabilidade de fármacos vêm sendo disponibilizadas na literatura a cada ano. Recentemente, Nirasay e colaboradores fizeram uma adaptação ao sistema Franz Cells, implementando uma membrana artificial que se assemelha à membrana usada nas placas sanduiche de PAMPA. Esta membrana, impregnada com solução fosfolipídica, é previamente tratada com sílica e uma camada polimérica (ex. polietilenoglicol ou polidopamina). Desta forma, acredita-se que a membrana adquira uma maior fluidez e mantenha uma organização fosfolipídica melhor estruturada, tornando a avaliação da permeabilidade mais reprodutível e discriminativa entre fármacos que possuam propriedades físico-químicas semelhantes (NIRASAY *et al.*, 2011). No mesmo ano, Matej e colaboradores (2011) incrementaram o sistema de incubação do sanduiche de PAMPA através da criação de um sistema rotacional da célula de difusão, com agitação entre 60 e 600 rpm durante o processo de permeação. Com este sistema hidrodinâmico, a manutenção de uma camada de água estacionária (CAE) mais estável e reprodutiva foi obtida, resultando em valores de permeabilidade em PAMPA com correlação superior a FA% para um conjunto de 31 moléculas com características lipofílicas (MATEJ *et al.*, 2011).

Com o objetivo de investigar a baixa taxa de eliminação *in vivo*, tendo como possível causa a limitação imposta pela taxa de permeabilidade, Hallifax e colaboradores (2012) compararam PAMPA e permeabilidade em células Caco-2. Os autores observaram que, num conjunto de 65 fármacos estudados, uma maior correlação pôde ser estimada usando a técnica de PAMPA (HALLIFAX *et al.*, 2012).

Uma nova aplicação para a técnica de PAMPA tem atraído o interesse da indústria cosmética. Trata-se do Skin-PAMPA, tendo como principal variação a utilização de membranas impregnadas com uma composição semelhante à pele humana. O modelo, que foi primeiramente divulgado com o estudo de 7 fármacos e de membranas impregnadas com diferentes

proporções de análogos sintéticos da ceramida, colesterol e ácido esteárico, demonstrou-se robusto e reprodutível, além de apresentar correlação satisfatória com dados *in vivo* (SINKÓ *et al.*, 2012).

3.3.1 Condições gerais dos ensaios de PAMPA

Existem diversos parâmetros que afetam os resultados de permeabilidade obtidos pelo ensaio com a técnica PAMPA. Dentre eles, destacam-se: composição das membranas artificiais; pH e composição do meio dos compartimentos doador e receptor; e presença ou ausência de agitação das placas, relacionada ao efeito da camada de água estacionária (CAE).

3.3.1.1 Composição das membranas artificiais

A membrana artificial usada nos ensaios de PAMPA é composta, em sua vasta maioria, por um filtro de PVDF hidrofóbico impregnado com mistura lipídica dissolvida em um determinado solvente orgânico (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

O fluoreto de polivinilideno (PVDF), empregado como suporte para a impregnação da composição lipídica, é um polímero termoplástico derivado do flúor produzido pela polimerização do difluoreto de vinilideno (CHEN; HONG, 2002). Sua fusão ocorre em torno de 150-160°C e se apresenta cerca de 60% na forma cristalina (MÉNDEZ *et al.*, 2001). É resistente a solventes e insolúvel em água e, quando na forma de filtros para utilização como suporte para a formação de membranas artificiais, apresenta tamanho de poro de 0,45 µm e espessura de aproximadamente 115 µm (Millipore, 2003). Via de regra, o PVDF atua como um suporte inerte, sendo que a composição lipídica a ser impregnada é a responsável pela ação de retenção de fármacos no ensaio de PAMPA (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998).

Com relação à composição lipídica da membrana, um solvente não polar é normalmente utilizado para dissolver o fosfolípídeo antes do revestimento do filtro, dado que os fosfolípídeos são originalmente sólidos que não se dispersam em filtros. A maioria dos pesquisadores utilizam solventes derivados de hidrocarbonetos alcanos, tais como n-dodecano (ZHU *et al.*, 2002; AVDEEF *et al.*, 2005; MASUNGI *et al.*, 2008; MENSCH *et al.*, 2010; NIRASAY *et al.*,

2011; HALLIFAX *et al.*, 2012) ou hexadecano (WOHNSLAND; FALLER, 2001). Porém, o uso de octadieno também é reportado na literatura (SUGANO *et al.*, 2001).

Desde os primeiros estudos sobre permeabilidade em membranas biológicas, sugere-se que a composição lipídica da membrana intestinal seja a grande responsável pela regulação da fluidez da membrana e, desta forma, afete as características de transporte transcelular (BRASITUS, SCHACHTER, 1984; MEDDINGS, THEISEN, 1989).

Estudos de extração e identificação a partir de raspagens da membrana intestinal de ratos indicam que os fosfolipídeos de carga neutra, primariamente PC e PE, totalizam aproximadamente 60% da sua composição total. Já os fosfolipídeos de carga negativa, PS e PI, representam 15% (PROULX, 1991). Além disso, a fluidez é supostamente controlada, em grande extensão, pelo grau de insaturação das cadeias acil e por uma proporção relativa de colesterol (PROULX, 1991). Desta forma, a composição lipídica normalmente empregada nos ensaios de PAMPA constitui 10-20% de lecitina (de ovo ou soja) dissolvida em n-dodecano (AVDEEF, 2012). No entanto, diversas variações em termos de composição lipídica estão reportadas na literatura, sendo apresentadas como um dos fatores para variações nos resultados de permeabilidade de fármacos (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

A primeira variação da técnica original de PAMPA reportada na literatura foi proposta por Wohnsland e Faller (2001). Para o preparo das membranas artificiais, os autores substituíram a solução fosfolipídica pelo solvente hexadecano a 5% dissolvido em hexano e impregnaram filtros de policarbonato com tamanho de poro de 3 µm. Esta variável da técnica foi intitulada de HDM-PAMPA. Os pesquisadores avaliaram neste sistema a permeabilidade de 32 fármacos e os resultados obtidos mostraram uma correlação satisfatória com dados de permeabilidade *in vivo*, apesar de baixa correlação com os valores de logP destes fármacos (WOHNSLAND; FALLER, 2001).

No entanto, críticas posteriores consideráveis foram feitas ao HDM-PAMPA. Dentre elas, a avaliação indevida de fármacos hidrofílicos, já que o n-hexadecano age isoladamente como uma barreira física à permeação, mas que não mimetiza a complexidade da membrana fosfolipídica *in vivo*. A ausência de sítios na membrana para ligações iônicas e de hidrogênio torna-a menos permeável, acarretando na necessidade de um tempo superior de

incubação das placas. Além disso, a camada de n-hexadecano não é muito estável, o que torna difícil sua utilização rotineira (AVDEEF *et al.*, 2006; DEFERME *et al.*, 2008).

Em 2002, Zhu e colaboradores fizeram um estudo comparativo entre PAMPA, permeabilidade em células Caco-2 e FA%, utilizando uma membrana hidrofílica composta de PVDF e um filme de éster de celulose como suporte para a permeação. A solução lipídica para impregnação do filtro foi composta de 1% de lecitina em n-dodecano. Além disso, contemplaram um gradiente de pH entre os compartimentos doador e receptor. A avaliação foi feita para 49 fármacos estruturalmente diferentes e permeados primariamente pela via passiva. Os resultados indicaram que houve uma alta correlação entre os dados de permeabilidade obtidos por meio do PAMPA com aqueles obtidos por meio de ensaios com células Caco-2 ($R^2 = 0,82$) (ZHU *et al.*, 2002).

O modelo de PAMPA-Biomimetizado, desenvolvido por Sugano *et al.* (2002), tem como composição da membrana artificial uma mistura de PC, PE, PS, PI e CHO dissolvidos em 1,7-octadieno, mimetizando a composição da membrana em formato de borda de escova dos enterócitos. Segundo os autores, este modelo permitiu a obtenção de valores de permeabilidade subestimados para fármacos pequenos e catiônicos. A alternativa encontrada, neste caso, foi a de combinar os dados de permeabilidade a uma equação que apresentasse descritores com correção para a via paracelular, levando em consideração valores de difusividade e raio molecular do fármaco, além do tamanho de poro da membrana (SUGANO *et al.*, 2002).

Em 2003, Di e colaboradores adaptaram a técnica de PAMPA com o objetivo de prever a passagem de fármacos através da barreira hematoencefálica, variável da técnica que foi intitulada de BBB-PAMPA (DI *et al.*, 2003). Para tanto, os pesquisadores obtiveram as membranas artificiais por meio da impregnação dos filtros de PVDF com uma solução de lipídica extraída a partir de cérebro suíno (*Porcine Polar Brain Lipid* – PBL) disponível comercialmente e composta de uma mistura de PE/PS/PC/PA/PI numa proporção de 33/18,5/12,6/0,8/4,1% (p/p), respectivamente. Desta forma, os autores conseguiram dividir 30 fármacos estruturalmente diferentes em 2 grupos: permeáveis e não permeáveis (DI *et al.*, 2003).

Ainda em 2003, num estudo combinatório com 50 membranas diferentes e 32 fármacos, Avdeef levantou relevantes informações a respeito da influência

da composição lipídica da membrana na permeabilidade de fármacos. Dentre elas, o estudo comparativo entre lecitina de ovo a 10% e DOPC a 2% mostrou que este gerou valores de permeabilidade cerca de 10 vezes inferiores àquele, quando avaliando fármacos estruturalmente diferentes, como metoprolol e prazosina (AVDEEF, 2012).

Em se tratando especificamente da composição das lecitinas, observou-se que há uma diferença significativa na proporção entre fosfolipídeos de carga neutra e carga negativa nos diferentes fornecedores do reagente, principalmente devido ao método de extração utilizado. Não obstante, a lecitina de soja apresenta cerca de 4 vezes mais fosfatidilinositol do que a lecitina de ovo (AVDEEF, 2012).

A primeira formulação lipídica preparada comercialmente foi uma solução a 2% de um fosfolipídeo sintético altamente purificado, a dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dissolvida em n-dodecano. Esta composição lipídica, no entanto, demonstrou certa deficiência, pois gerou resultados falso-negativos para fármacos altamente permeáveis (RUELL; TSINMAN; AVDEEF, 2003; AVDEEF *et al.*, 2006; AVDEEF, 2012).

Bermejo e colaboradores realizaram estudos de permeabilidade intrínseca (permeabilidade da fração não ionizada de compostos ionizáveis) utilizando 17 fluoroquinolonas. Estes autores impregnaram os filtros de PVDF com 20% de lecitina em n-dodecano e avaliaram a existência de correlação entre os resultados obtidos a partir dos ensaios de PAMPA e aqueles obtidos a partir de modelos de perfusão em intestino de ratos e a partir de cultura de células Caco-2. Os resultados demonstraram que o modelo PAMPA e de cultura de células Caco-2 foram igualmente capazes de mimetizar os resultados obtidos *in vivo* em modelo animal (rato) (BERMEJO *et al.*, 2004).

Outra variação da técnica de PAMPA que tem sido amplamente considerado para a avaliação da permeabilidade de fármacos é denominada de “Double-Sink” PAMPA ou DS-PAMPA. Este modelo emprega na membrana artificial uma mistura similar ao extrato bruto de lecitina de soja, porém rica em fosfatidilinositol, fosfolipídeo de carga negativa. A condição de duplo “sink” é formada a partir de um gradiente de pH na solução doadora e de uma espécie gradiente lipofílico na solução receptora, sendo que neste último compartimento é adicionado um tensoativo (AVDEEF *et al.*, 2005).

Seo *et al.* (2006) investigaram o papel da composição lipídica nos resultados de permeabilidade de cinco compostos e os resultados indicaram que aqueles com uma permeabilidade razoável (no mínimo $0,2 * 10^{-6}$ cm/s) eram potencialmente sensíveis à fluidez da membrana e aos efeitos de pareamento iônico. Estes resultados são compatíveis aos obtidos por Carrara e colaboradores (2007), os quais realizaram estudos com 19 compostos estruturalmente diferentes e demonstraram que a permeabilidade é, na maioria das vezes, dependente da porcentagem de dodecano e que o efeito dos fosfolipídeos é relevante apenas para compostos que apresentam um valor médio de permeabilidade (entre $0,5$ e $1,0 * 10^{-6}$ cm/s) (CARRARA *et al.*, 2007).

Corti *et al.* (2006) estudaram as variações na fase lipídica e seu efeito na permeabilidade de fármacos usando uma mistura ternária descrita como “n-octanol–Lipoid®” e “80-cholesterol”. Estes autores sugeriram que quantidades maiores de fase lipídica impregnada na membrana levava à uma redução dos resultados de permeabilidade aparente de um composto, devido à presença de uma camada mais espessa de difusão, responsável por reduzir a velocidade de permeação (CORTI *et al.*, 2006).

Uma comparação quantitativa entre os métodos de DOPC, DS e HDM PAMPA, previamente descritos neste trabalho, foi realizada por Avdeef e Tsinman (2006). Aqui, foram comparadas as composições da membrana artificial, sendo 2% de DOPC em dodecano, mistura fosfolipídica patenteada em dodecano e 3% de hexadecano em hexano, para DOPC, DS e HDM-PAMPA, respectivamente. Tendo como base a permeabilidade intrínseca de 40 fármacos estruturalmente diferentes, estes pesquisadores observaram que os valores de permeabilidade, expressos em $-\log P_e$, apresentaram variação conforme o tipo de ensaio, seguindo a ordem de grandeza: DS>DOPC>HDM.

Chen *et al.* (2007) desenvolveram um procedimento para preparação das membranas artificiais, resultando em uma barreira lipídica de tri-camada. O procedimento se deu como segue: Num primeiro momento, 1 μ L de uma mistura de hexadecano e hexano (proporção de solventes não divulgada) foram dispersos em um dos lados do filtro. Na sequência, foram adicionados 4 μ L de uma mistura contendo 2% de DOPC em n-dodecano sobre a camada pré-existente de hexadecano, usando o hexano como carreador. Por último, o filtro foi invertido e, novamente, 4 μ L da mistura contendo 2% de DOPC em n-dodecano foi adicionada ao outro lado do filtro. A correlação deste método com

o modelo de permeabilidade em células Caco-2 mostrou-se superior quando comparado às técnicas convencionais de PAMPA (CHEN *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao uso de técnicas analíticas para a avaliação de suportes inertes isolados e suas interações com as misturas lipídicas, alguns destaques podem ser considerados aqui. Dentre eles, a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) (GREGORIO FILHO, 1993; BLICHER *et al.*, 2009; TURKER *et al.*, 2011), a Microscopia Eletrônica de Varredura (WANG *et al.*, 2009; OCHALEK *et al.*, 2012) e a Microscopia de Força Atômica (SPANGENBERG *et al.*, 2004; SEANTIER *et al.*, 2008; BUNSOW; JOHANNSMANN, 2008). No entanto, a elucidação da conformação de filtros de PVDF impregnados com fosfolipídeos ainda não é conclusiva na literatura.

3.3.1.2 pH e composição dos meios dos compartimentos doador e receptor

Visando mimetizar a composição dos fluidos intestinal e sanguíneo, diferentes reagentes são considerados na preparação das soluções que compõem os compartimentos receptor e doador do ensaio de PAMPA. O tampão fosfato é o mais comumente empregado, sendo que os tampões acetato e HEPES também estão descritos na literatura (BOHETS *et al.*, 2001; FISCHER *et al.*, 2007, AVDEEF, 2012).

No compartimento doador, a presença de ácidos biliares ou diferentes co-solventes permite a avaliação de compostos muito pouco solúveis (SUGANO *et al.*, 2001; AVDEEF, 2012). Visando simular o transporte sanguíneo, Avdeef e Testa (2002) sugeriram o uso de alguns compostos tensoativos no compartimento receptor a fim de promover menor predominância de compostos na forma livre (principalmente em casos de formas catiônicas ionizadas) (AVDEEF; TESTA, 2002).

O uso de co-solventes nos compartimentos receptor e doador, tal como o DMSO, tem sido considerado por alguns autores para aumentar a solubilidade de compostos altamente lipofílicos. Esta alternativa, porém, gera valores de permeabilidade inferiores àqueles onde o co-solvente não é utilizado, uma vez que a afinidade do composto lipofílico pelo tampão aumenta na presença de co-solventes (SUGANO *et al.*, 2001; DREASSI *et al.*, 2009).

As proteínas podem ser adicionados às soluções para aumentar a solubilidade de um composto pouco solúvel em água, para reduzir a ligação

não específica a superfícies não celular ou celular, ou para estudar os efeitos da ligação dos fármacos à proteínas. O muco intestinal, a albumina, as outras proteínas do soro, ou soro por si só podem ser utilizados (AMIDON; LEE; TOPP, 2000). No entanto, cuidados devem ser observados principalmente no que diz respeito à remoção das proteínas antes da leitura das placas em UV, uma vez que podem interferir significativamente na quantificação dos fármacos. Dadas as dificuldades deste procedimento de extração proteica, o que torna o método mais laborioso que o intencional, tensoativos tais como o taurocolato e deoxicolato de sódio podem mimetizar a função das proteínas no compartimento receptor (AVDEEF, 2012).

O pH apresenta uma grande importância no caso de compostos ionizáveis, uma vez que é estimado que a forma não-ionizada apresenta uma permeabilidade *in vivo* de 3 a 4 vezes maior, quando comparada à forma ionizada (AVDEEF, 2001).

O pH do compartimento receptor geralmente é igual ao pH fisiológico (7,4) enquanto que o pH do compartimento doador pode variar em ampla faixa, simulando as condições dos diferentes segmentos do trato intestinal. Em específico, o pH do jejuno varia entre 4,5 e 8,5 (PROULX, 1991; LENNERNAS, 1998; AVDEEF, 2012).

De acordo com a teoria de partição em pH previamente mencionada, os compostos ionizáveis têm a capacidade de difundir através das membranas biológicas principalmente nas formas não ionizadas. Por conseguinte, a extensão da absorção de compostos através de membranas lipídicas depende do seu grau de ionização (AMIDON; LEE; TOPP, 2000). O pH e pKa dos compostos controlam a proporção entre taxa ionizada e não-ionizada, sendo esta proporção invertida para ácidos e bases, conforme mostram as equações (3) e (4), respectivamente.

$$pH = pKa + \log_{10} \left(\frac{\text{concentração ionizada}}{\text{concentração não ionizada}} \right) \quad (3)$$

$$pH = pKa + \log_{10} \left(\frac{\text{concentração não ionizada}}{\text{concentração ionizada}} \right) \quad (4)$$

Apesar da correlação entre a taxa de absorção e o pKa ser consistente

com a hipótese de partição em pH, exceções têm sido frequentemente reportadas (GIBALDI, 1991). Tais exceções são fundamentadas pela existência de uma camada de água estacionária (CAE) ou mesmo pelo pH do microclima intestinal (WINNE, 1977).

Ainda de acordo com a teoria da partição em pH, a permeabilidade efetiva (P_{eff}) depende do pH a ser utilizado e, sabendo-se o valor do pK_a , é possível calcular a permeabilidade intrínseca (permeabilidade da forma não-ionizada) (AVDEEF, 2012).

3.3.1.3 Agitação das placas e o efeito da Camada de Água Estacionária (CAE)

A CAE pode ser descrita como uma camada de água, muco e glicocálix mais ou menos estática, que é adjacente à parede intestinal e é criada pela mistura incompleta do conteúdo luminal situado próximo à superfície da mucosa intestinal e pode funcionar como uma barreira à absorção (Thomson *et al.*, 1984). Este mesmo efeito aparece em uma série de modelos de permeabilidade, como na BLM (GUTKNECHT; TOSTESON, 1973; WALTER; GUTKNECHT, 1984), nos modelos de PAMPA (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998), nos modelos celulares *in vitro* (KARLSSON; ARTURSSON, 1991; HO, 2000), em intestino de ratos (WINNE; GORIG; MULLER, 1987; LEVITT *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1988) e no jejuno humano (LENNERNAS, 1998). A espessura da CAE é estimada em 1462 μm em PAMPA (AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004), 1544 μm em Caco-2 (KARLSSON; ARTURSSON, 1991), e 30-100 μm no trato gastrointestinal (LENNERNAS, 1998).

Um estudo comparativo demonstrou que a permeabilidade de propranolol é 40% menor que a de metoprolol, mesmo o propranolol sendo 40 vezes mais lipofílico que o metoprolol (WOHNSLAND; FALLER, 2001). Este fato sugere que, para moléculas altamente lipofílicas, a maior barreira à permeabilidade é a CAE. Na literatura, algumas técnicas vêm sendo usadas para tentar reduzir a espessura da CAE (WOHNSLAND; FALLER, 2001; AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004). Avdeef, Nielsen e Tsinman (2004) apresentaram agitadores magnéticos de placas, os quais são capazes de realizar uma rotação magnética individual nos diferentes poços de uma

microplaca, reduzindo, desta forma, a camada de água estacionária para até 13 μm em alguns casos.

No entanto, aplicando a consideração de Adson (1995), é pertinente ponderar que os agitadores magnéticos individuais não são capazes de provocar agitação do compartimento doador, uma vez que o seu efeito é cancelado pelo espaço limitado presente no interior dos poços.

Três diferentes tipos de cálculos são os mais difundidos para a correção do efeito da CAE. A maneira mais tradicional tem sido a realização de ensaios de Caco-2 em diferentes velocidades de agitação, na faixa de 100-1000 rpm, utilizando uma equação hidrodinâmica para extrair os valores de permeabilidade efetiva a partir dos coeficientes de permeabilidade aparente (KARLSSON; ARTURSSON, 1991; ADSON *et al.*, 1995; PALM *et al.*, 1999; HO *et al.*, 2000). Outra técnica, que é uma extensão do procedimento de Gutknecht (GUTKNECHT; TOSTESON, 1973; WALTER; GUTKNECHT, 1984), e também denominada método de pKa^{flux} , foi descrita primeiramente por Ruell e colaboradores (2003) e aplica a teoria da partição em pH. A terceira técnica aplica os resultados obtidos a partir de experimentos de PAMPA livres de lipídios, sendo estes os valores referência para a presença do efeito da CAE (RUELL; TSINMAN; AVDEEF, 2003).

Apesar da ampla descrição da importância da CAE por diversos autores (AVDEEF, 2012; AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004; NIELSEN; AVDEEF, 2004; WOHNSLAND; FALLER, 2001; SUGANO, 2001), alguns pesquisadores conseguiram obter bons resultados em seus experimentos, mesmo desconsiderando o efeito da CAE (SUGANO *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2002; SCHERRER, 2009). Uma investigação dos parâmetros de incubação mostra que em alguns casos foram empregadas temperaturas mais altas, o que pode afetar a espessura da CAE (SUGANO *et al.*, 2001). Da mesma forma, outros autores utilizaram agitadores orbitais de placas (ZHU *et al.*, 2002) o que pode promover um leve decréscimo na espessura da CAE.

A razão pela qual bons resultados são obtidos nestes casos acima descritos também pode ser atribuída ao pH dos compartimentos doador e receptor. Levando novamente em consideração a teoria da partição, em valores de pH onde uma molécula está predominantemente ionizada e, portanto, sua permeabilidade efetiva é baixa, a permeabilidade através da membrana é a etapa limitante do processo. Uma vez que inúmeros fármacos

são considerados ácidos ou bases fracas, no pH mais comumente utilizado, 6,5, eles são encontrados na forma ionizada, não sendo, portanto, limitados pela barreira da CAE (AVDEEF *et al.*, 2005).

Em 2009, Scherrer publicou um trabalho científico no qual ele presumiu que o fenômeno da CAE descrito anteriormente não se dá (ou, pelo menos, não apenas) pelo fato de existir uma camada espessa de água. Ele sugere uma teoria, na qual o pK_a^{flux} é o pK_a da molécula no seu estado de transição, gerado pela molécula ao longo do seu percurso através da membrana. Este estado de transição pode ser definido por uma tendência do fármaco a continuar em direção ao compartimento receptor ou de retornar ao compartimento doador, sendo que, neste caso, a CAE não existe. Esta sugestão está baseada em fatos comprovados no que diz respeito à partição octanol-água (especialmente a partição em par iônico), mas não em relação à permeabilidade em membrana (SCHERRER, 2009). Uma vez que o efeito da CAE está amplamente descrito em diferentes modelos de permeabilidade, ainda parece que a camada espessa de água é a maior responsável pelo fenômeno da CAE, apesar de que as teorias contrárias a esta constatação mereçam maiores investigações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Substâncias químicas de referência

Todas as substâncias químicas utilizadas neste projeto são padrões primários ou secundários com pureza superior a 99%:

- Tartarato de metoprolol
Fornecedor: Sigma Aldrich
Lote: S20094-8 - Validade: 07/2014
- Cloridrato de ranitidina
Fornecedor: Sigma Aldrich
Lote: 233409-5 - Validade: 11/2013
- Zidovudina
Fornecedor: Cristália Laboratórios Químicos e Farmacêuticos Ltda
Lote: C223/3 - Validade: 12/2012
- Famotidina
Fornecedor: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A
Lote: 009802311 - Validade: 03/2014
- Montelukaste sódico
Fornecedor: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A
Lote: 002333983 - Validade: 03/2013
- Cloridrato de sotalol
Fornecedor: Sigma Aldrich
Lote: S3440-2 - Validade: 01/2013
- Furosemida

Fornecedor: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A
Lote: 0054550912 - Validade: 03/2014

- Cloridrato de verapamil

Fornecedor: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A
Lote: 00733901 - Validade: 09/2013

- Cloridrato de propranolol

Fornecedor: Sigma Aldrich
Lote: S34490-5 - Validade: 10/2014

4.1.2 Reagentes e solventes

- Hidrogenofosfato de potássio dibásico – Sigma Aldrich;
- Hidrogenofosfato de potássio monobásico – Sigma Aldrich;
- Hidróxido de sódio - Sigma Aldrich;
- Tetraborato de sódio - Sigma Aldrich;
- Ácido clorídrico - Sigma Aldrich;
- Albumina Sérica Bovina (ASB) – Sigma Aldrich;
- Ácido glicocólico - Sigma Aldrich;
- Colesterol (CHO) 95% - Sigma Aldrich;
- Fosfatidilcolina (PC) de soja 20% – Avanti Polar Lipids;
- Fosfatidilserina (PS) de cérebro bovino - Sigma Aldrich;
- Fosfatidilinositol (PI) sódico extraído da soja - Sigma Aldrich;
- Fosfatidiletanolamida (PE) – Sigma Aldrich;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99,6% – Sigma Aldrich;
- Dodecano ReagentPlus® $\geq 99\%$ - Sigma Aldrich;
- Hexano ACS - Sigma Aldrich;
- 1,7-octadieno - Sigma Aldrich;
- Clorofórmio - Sigma Aldrich;
- Azul cresil brilhante ALD certificado - Sigma Aldrich;
- Amarelo Lúifer VS -Sigma Aldrich;
- Água purificada Milli-Q

4.1.3 Equipamentos e materiais

- Espectrofotômetro UV/Fluorescência para microplacas de 96 poços - Tecan Infinite M200;
- Equipamento de calorimetria diferencial exploratória (DSC) Mettler – modelo Star SW 11.0;
- Microscópio Eletrônico de varredura – modelo JSM 7401F;
- pH metro;
- Balança Analítica;
- Incubadora de placas com agitação orbital;
- Banho ultrassônico;
- Agitador tipo vórtex;
- Micropipeta automática multicanal – 8 canais – capacidade de 0,2-1mL – Eppendorf;
- Micropipeta manual multicanal – 8 canais – capacidade de 2-20 μ L – Gilson;
- Micropipeta manual multicanal – 8 canais – capacidade de 20-200 μ L – Gilson;
- Ponteiras descartáveis de volume variável - Gilson Easy-Pack[®];
- Microplacas de 96 poços receptoras de permeação contendo filtros de PVDF com tamanho de poro de 0,45 μ M – Millipore;
- Microplacas de 96 poços doadoras de permeação – Millipore;

4.1.4 Infra-estrutura

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Permeabilidade e Biodisponibilidade (LPB) do Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo (FCF-USP), exceto as seguintes etapas:

- Aprendizado da técnica de PAMPA: empresa pION, Boston, EUA;
- Avaliação das membranas fosfolipídicas por MEV: Central Analítica do Departamento de Química da Universidade de São Paulo;

- Avaliação das membranas fosfolipídicas por DSC: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos fármacos para os estudos de permeabilidade

A seleção dos fármacos a serem considerados para os estudos de permeabilidade partiu de um estudo de revisão da literatura, levando em consideração as seguintes características físico-químicas: Peso Molecular (PM), Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), Número doadores de ligação de hidrogênio (HBD); coeficiente de dissociação (pKa), lipofilicidade (logP), Área de Superfície Polar (PSA) e Volume Molecular (VM) (LIPINKSI *et al.*, 2001; Bergstrom *et al.*, 2003; Winiwarter *et al.*, 2003). Para este levantamento, foram empregados periódicos indexados nas bases de dados eletrônicas: Pubmed (Literatura Médica Internacional), Science Direct (Base de dados Científica Internacional) e Lilacs (Literatura Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Para facilitar a busca eletrônica, foram utilizados os seguintes termos: “PAMPA”, “permeability”, “permeability descriptors”, “human Absorption Fraction”, “logP”, “pKa”, “PSA”; “drug HBD” e “drug molecular weight permeability.” O critério definido para a escolha dos fármacos foi baseado na heterogeneidade dos valores, objetivando a captação de fármacos estruturalmente diversos.

Além disso, foram considerados os resultados descritos na literatura de Fração Absorvida (FA%) e de permeabilidade obtidos a partir de estudos com modelos de permeabilidade em células Caco-2, ou obtidos por meio de estudos de permeabilidade em humanos (P_{eff}), com o objetivo de correlacionar com os resultados de permeabilidade obtidos neste trabalho por meio das variações da técnica de PAMPA.

4.2.2 Validação da quantificação dos fármacos por espectrofotometria UV/fluorescência

Para as análises das concentrações dos fármacos do estudo obtidas a partir das amostras dos estudos de permeabilidade, por meio da técnica de PAMPA, foi empregado método espectrofotométrico na região do ultravioleta (UV)/fluorescência. Os métodos foram devidamente validados conforme os procedimentos preconizados pela RE nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003). O ensaio seguiu as exigências de um método de categoria I (testes quantitativos para determinação de princípio ativo em matérias-primas ou produtos farmacêuticos). De acordo com a categoria I, os ensaios necessários para validação do método são: especificidade, linearidade, repetibilidade, exatidão e robustez.

O método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação espectrofotométrica dos fármacos selecionados para o estudo, em solução tampão fosfato pH 7,4. O detalhamento da composição da solução está apresentado no Quadro 1.

4.2.2.1 Especificidade/Seletividade

O ensaio foi conduzido em triplicata, contemplando a concentração usualmente utilizada nos ensaios de permeabilidade em PAMPA, ou seja, de 0,25 mM. Para tanto, 25 µL de uma solução estoque a 10 mM dos fármacos em estudo, em DMSO (dimetilsulfóxido), foram transferidos para cada poço de uma microplaca funda de 96 poços, contendo 1 mL de tampão pH 7,4. Em seguida, o conteúdo dos poços foi homogeneizado com o auxílio de um pipetador multicanal, onde um volume de 200 µL foi aspergido e liberado por 6 vezes. Uma quantia de 150 µL de cada poço foi então transferido para placa de 96 poços transparente para avaliação espectrofotométrica em UV ou fluorescência, dependendo do fármaco. No que diz respeito à detecção em UV, a leitura das placas foi feita em uma faixa de 250-350 nm, com incrementos de 10 em 10 nm. Já a leitura em fluorescência foi feita com emissão em 310 nm e excitação em 235 nm.

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada para os fármacos selecionados neste estudo através da construção de curvas analíticas obtidas a partir de 9 concentrações na faixa de 0,125 mM a 0,325 mM. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) foram obtidos por regressão linear a partir das curvas analíticas, através do método dos mínimos quadrados (ICH, 2005).

Para o preparo das soluções destinadas à obtenção das curvas analíticas, as amostras foram pipetadas a partir de soluções estoque a 10 mM dos fármacos em estudo em DMSO, e o volume foi transferido para poços de placa funda de 96 poços, contendo 1mL de solução tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, o conteúdo dos poços foi homogeneizado com o auxílio de um pipetador multicanal, onde um volume de 200 μ L foi aspergido e liberado por 6 vezes. Finalmente, uma quantia de 150 μ L de cada poço foi transferida para placa de 96 poços transparente para avaliação espectrofotométrica em UV ou fluorescência. A determinação espectrofotométrica dos fármacos na região do UV foi feita numa faixa de 250-350 nm. Já a leitura em fluorescência foi feita para sotalolol, com emissão em 310 nm e excitação em 235 nm.

4.2.2.3 Precisão (repetibilidade)

A precisão do método analítico foi expressa como desvio padrão e desvio padrão relativo (coeficiente de variação). A avaliação da precisão foi realizada por meio da análise espectrofotométrica das soluções dos fármacos em tampão fosfato pH 7,4 nas concentrações de 0,15; 0,25 e 0,325 mM - 60%, 100% e 130% do valor teórico do método, respectivamente. As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada concentração.

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito a partir da adição dos fármacos ao tampão fosfato pH 7,4, em três concentrações diferentes: alta, média e baixa (0,325; 0,25 e 0,15 mM, respectivamente). O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para definir a exatidão, seguindo a equação (5) abaixo.

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{concentração experimental obtida}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (5)$$

4.2.2.5 Robustez

Neste ensaio foram avaliadas a influência da agitação e da temperatura sobre a determinação analítica dos fármacos dissolvidos em solução tampão pH 7,4. A justificativa para consideração de tais parâmetros se dá pelas possíveis interferências de vibração e aquecimento do equipamento e bancada durante a a leitura dos resultados de permeabilidade. Para esta análise foi considerada a concentração nominal do método (0,25 mM). Para a avaliação da agitação, as placas foram primeiramente submetidas à leitura espectrofotométrica sem agitação. Em seguida, as mesmas placas foram agitadas mecanicamente por 30 segundos em amplitude de 1 mm e, então, uma nova leitura foi realizada. Para a avaliação da temperatura, foi estabelecida primeiramente a temperatura de 37°C para a leitura das placas em UV e, sequencialmente, a leitura foi procedida à 39 °C. As amostras foram preparadas em triplicata, sendo que uma quantia de 25 µL foi transferida da solução estoque a 10 mM, para placas fundas de 96 poços contendo tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, o conteúdo dos poços foi homogeneizado com o auxílio de um pipetador multicanal, onde um volume de 200 µL foi aspergido e liberado por 6 vezes. Após a finalização do ensaio, uma quantia de 150 µL de cada poço foi transferida para placa de 96 poços transparente para leitura em UV.

4.2.3 Ensaio de PAMPA

4.2.3.1 Preparo das soluções

As soluções tampão e aquelas destinadas à obtenção das membranas lipídicas utilizadas neste trabalho foram preparadas conforme descrito no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Composição das soluções empregadas nos experimentos de PAMPA

Tipo de solução	Modo de preparo
Tampão pH 4,5 ¹	Foram adicionados 6,8 g de fosfato de potássio monobásico a um balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q
Tampão pH 6,0 ¹	Foram adicionados 250 mL da solução de fosfato de potássio monobásico* em um balão volumétrico de 1 L. Posterior adição de 90 mL de solução de NaOH 0,2 N**, completou-se o volume do balão com água purificada Milli-Q.
Tampão pH 7,4 ¹	Foram adicionados 500 mL da solução de fosfato de potássio monobásico (0,2 N)*. Acrescentaram-se 395 mL de solução de NaOH 0,2 N** e completou-se o volume do balão volumétrico de 2 L com água purificada Milli-Q.
Tampão pH 9,0 ¹	Foram adicionados 46 mL de solução de HCl*** a 500 mL de solução de tetraborato de sódio**** e completou-se o volume do balão volumétrico de 1 L com água purificada Milli-Q.
* solução de fosfato de potássio monobásico 0,2N (1L) ¹	Foram dissolvidos 27,2 g de fosfato de potássio monobásico num balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada.
** solução de NaOH (0,2N) (1L) ¹	Foram dissolvidos 8 g de NaOH em um balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
*** solução de tetraborato de sódio (0,025M) (1L) ¹	Foram dissolvidos 9,5 g de tetraborato de sódio em um balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
****solução de HCl (0,1M) (1L) ¹	Foram dissolvidos 3,6 mL de HCl em um balão volumétrico de 1 L e completou-se o volume com água purificada Milli-Q.
Membrana fosfolipídica de fosfatidilcolina (PC) 10%	A 100 mL de n-dodecano foram adicionados 10 mg de PC.
Membrana fosfolipídica PC 10% + colesterol (CHO) 0,5%	A 100 mL de n-dodecano foram adicionados 10 mg de PC e 0,5 mg de CHO.
Membrana fosfolipídica PC 10% + CHO 0,5% + fosfatidilinositol (PI) 2%	A 100 mL de n-dodecano foram adicionados 8 mg de PC, 0,5 mg de CHO e 2 mg de PI.

¹UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010.

4.2.3.2 Mapeamento das variáveis da técnica

Num primeiro momento, o ensaio de PAMPA teve suas variáveis mapeadas, possibilitando de forma simplificada, a visualização de todos os parâmetros que podem impactar nos resultados de permeabilidade. Aqui, o mapeamento foi iniciado considerando o fármaco dissolvido em solução tampão e adicionado ao compartimento doador como entrada do processo. Como entrega final do processo de avaliação de permeabilidade, considerou-se a obtenção dos valores de permeabilidade (P_e) calculados ao final do ensaio. A Figura 4.1 apresenta a visão esquemática do processo de avaliação da permeabilidade usando PAMPA e das variáveis de cada uma das etapas. Destas, merecem destaque a composição lipídica da membrana, a variação de pH da solução presente no compartimento doador, a utilização de tensoativos no compartimento receptor e as condições de incubação das placas, em especial a temperatura e agitação. Estes fatores estão detalhados no item 3.3.1 e foram selecionados, pois se apresentam amplamente variados nos diferentes experimentos descritos na literatura.

Figura 4.1: Levantamento das principais variáveis existentes no processo de avaliação da permeabilidade de fármacos usando a técnica de PAMPA

Das variáveis descritas na Figura 4.1, as que são maiores fontes de variação do ensaio foram exploradas neste trabalho. Os seguintes fatores prioritários, e seus respectivos níveis, foram selecionados para o estudo de DOE: A) pH do compartimento doador (4,5; 6,0; 7,4; 9,0); B) tempo de incubação das placas (5; 15h); C) agitação a 100 rpm das placas durante incubação (presença; ausência); D) composição da membrana lipídica (fosfatidilcolina (PC) 10%; PC 10% + colesterol (CHO) 0,5%; PC 10% + CHO 0,5% + fosfatidilinositol (PI) 2%); e E) Composição do meio do compartimento receptor, expressa em presença ou ausência de tensoativo. O tensoativo aqui considerado foi o ácido glicocólico a 0,5% (p/v) em água purificada.

O desenho experimental (DOE) foi conduzido com base em um experimento fatorial completo geral, não aleatorizado e em duplicata, resultando em 96 experimentos para cada fármaco do estudo. A relação detalhada dos experimentos gerados pelo programa estatístico Minitab[®] é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Relação dos experimentos gerados pelo programa Minitab® com base nos fatores: A) pH do compartimento doador; B) tempo de incubação das placas; C) agitação a 100 rpm das placas; D) Composição da membrana lipídica; e E) Composição do meio do compartimento receptor

Exp	A	B	C	D	E	Exp	A	B	C	D	E
1	4,5	15	aus	PC	Tampão	42	7,4	15	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens
2	4,5	15	aus	PC	tampão+tens	43	9	15	pres	PC	Tampão
3	4,5	15	aus	PC+CHO	Tampão	44	9	15	pres	PC	tampão+tens
4	4,5	15	aus	PC+CHO	tampão+tens	45	9	15	pres	PC+CHO	Tampão
5	4,5	15	aus	PC+CHO+PI	Tampão	46	9	15	pres	PC+CHO	tampão+tens
6	4,5	15	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens	47	9	15	pres	PC+CHO+PI	Tampão
7	6	15	aus	PC	Tampão	48	9	15	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens
8	6	15	aus	PC	tampão+tens	49	4,5	5	aus	PC	Tampão
9	6	15	aus	PC+CHO	Tampão	50	4,5	5	aus	PC	tampão+tens
10	6	15	aus	PC+CHO	tampão+tens	51	4,5	5	aus	PC+CHO	Tampão
11	6	15	aus	PC+CHO+PI	Tampão	52	4,5	5	aus	PC+CHO	tampão+tens
12	6	15	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens	53	4,5	5	aus	PC+CHO+PI	Tampão
13	7,4	15	aus	PC	Tampão	54	4,5	5	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens
14	7,4	15	aus	PC	tampão+tens	55	6	5	aus	PC	Tampão
15	7,4	15	aus	PC+CHO	Tampão	56	6	5	aus	PC	tampão+tens
16	7,4	15	aus	PC+CHO	tampão+tens	57	6	5	aus	PC+CHO	Tampão
17	7,4	15	aus	PC+CHO+PI	Tampão	58	6	5	aus	PC+CHO	tampão+tens
18	7,4	15	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens	59	6	5	aus	PC+CHO+PI	Tampão
19	9	15	aus	PC	Tampão	60	6	5	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens
20	9	15	aus	PC	tampão+tens	61	7,4	5	aus	PC	Tampão
21	9	15	aus	PC+CHO	Tampão	62	7,4	5	aus	PC	tampão+tens
22	9	15	aus	PC+CHO	tampão+tens	63	7,4	5	aus	PC+CHO	Tampão
23	9	15	aus	PC+CHO+PI	Tampão	64	7,4	5	aus	PC+CHO	tampão+tens
24	9	15	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens	65	7,4	5	aus	PC+CHO+PI	Tampão
25	4,5	15	pres	PC	Tampão	66	7,4	5	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens
26	4,5	15	pres	PC	tampão+tens	67	9	5	aus	PC	Tampão
27	4,5	15	pres	PC+CHO	Tampão	68	9	5	aus	PC	tampão+tens
28	4,5	15	pres	PC+CHO	tampão+tens	69	9	5	aus	PC+CHO	Tampão
29	4,5	15	pres	PC+CHO+PI	Tampão	70	9	5	aus	PC+CHO	tampão+tens
30	4,5	15	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens	71	9	5	aus	PC+CHO+PI	Tampão
31	6	15	pres	PC	Tampão	72	9	5	aus	PC+CHO+PI	tampão+tens
32	6	15	pres	PC	tampão+tens	73	4,5	5	pres	PC	Tampão
33	6	15	pres	PC+CHO	Tampão	74	4,5	5	pres	PC	tampão+tens
34	6	15	pres	PC+CHO	tampão+tens	75	4,5	5	pres	PC+CHO	Tampão
35	6	15	pres	PC+CHO+PI	Tampão	76	4,5	5	pres	PC+CHO	tampão+tens
36	6	15	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens	77	4,5	5	pres	PC+CHO+PI	Tampão
37	7,4	15	pres	PC	Tampão	78	4,5	5	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens
38	7,4	15	pres	PC	tampão+tens	79	6	5	pres	PC	Tampão
39	7,4	15	pres	PC+CHO	Tampão	80	6	5	pres	PC	tampão+tens
40	7,4	15	pres	PC+CHO	tampão+tens	81	6	5	pres	PC+CHO	Tampão
41	7,4	15	pres	PC+CHO+PI	Tampão	82	6	5	pres	PC+CHO	tampão+tens
83	6	5	pres	PC+CHO+PI	Tampão	90	7,4	5	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens
84	6	5	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens	91	9	5	pres	PC	Tampão
85	7,4	5	pres	PC	Tampão	92	9	5	pres	PC	tampão+tens
86	7,4	5	pres	PC	tampão+tens	93	9	5	pres	PC+CHO	Tampão
87	7,4	5	pres	PC+CHO	Tampão	94	9	5	pres	PC+CHO	tampão+tens
88	7,4	5	pres	PC+CHO	tampão+tens	95	9	5	pres	PC+CHO+PI	Tampão
89	7,4	5	pres	PC+CHO+PI	Tampão	96	9	5	pres	PC+CHO+PI	tampão+tens

Legenda: Exp: experimento do DOE; aus: ausência; pres: presença; PC: fosfatidilcolina a 10% (p/v) em n-dodecano; PC+CHO: fosfatidilcolina a 10% (p/v) + colesterol a 0,5% (p/v) em n-dodecano; PC+CHO+PI: fosfatidilcolina (PC) a 10% (p/v) + colesterol (CHO) a 0,5% (p/v) + fosfatidilinositol (PI) a 2% (p/v) em n-dodecano; tens: tensoativo. O tensoativo usado foi o ácido glicocólico a 0,5% (p/v). Tampão: Tampão fosfato pH 7,4.

Por outro lado, as variáveis passíveis de monitoramento, descritas na Figura 4.1, são as variações inerentes à: a) equipamentos, b) ambiente (laboratório), c) tipo de filtro utilizado na membrana, d) forma de impregnação dos lipídeos na membrana, e) detecção dos fármacos nos compartimentos doador e receptor. Com o intuito de fixar estas variáveis, foram realizadas calibração periódica dos equipamentos utilizados. Dentre eles, as micropipetas, pHmetro, espectrofotômetro e termohigrômetro. Este último foi empregado para o monitoramento contínuo da temperatura e umidade do ensaio.

Não obstante, o tipo de filtro empregado - PVDF hidrofóbico, Millipore - e a forma de impregnação das membranas (descrita no item 4.2.3.3) foram padronizados para todos os ensaios. Por sua vez, a detecção e quantificação dos fármacos por espectrofotometria UV/fluorescência foi assegurada por meio da validação do método de análise que contemplou, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

4.2.3.3 Execução do ensaio

A partir da combinação experimental definida no item 4.2.3.2., os ensaios foram executados, utilizando como compartimento receptor uma placa de 96 poços contendo, em cada poço, 300 μL de solução de tampão fosfato pH 7,4 na presença ou ausência de tensoativo (ácido glicocólico a 0,5% p/v). Como compartimento doador, empregou-se uma placa de 96 poços contendo um filtro hidrofóbico composto por PVDF com 125 μm de espessura e tamanho de poro de 0,45 μm . Os fármacos objetos do presente estudo foram diluídos até uma concentração de 250 μM em solução tampão, a partir de uma solução estoque a 20 mM em DMSO. Tanto as soluções estoque quanto as soluções diluídas dos fármacos foram preparadas no dia do uso. Foram adicionados 300 μL das soluções diluídas dos fármacos em cada um dos 96 poços do compartimento doador. As soluções tampão variaram em pH (4,5; 6,0; 7,4 e 9,0), conforme definido na Tabela 4.1. A composição detalhada de cada solução está descrita no Quadro 4.1.

Os filtros presentes no compartimento receptor foram impregnados com 5 μL /poço. O processo de impregnação se deu a partir de um posicionamento perpendicular da ponteira no centro do filtro de PVDF, sem tocá-lo, com posterior deposição das soluções lipídicas. Logo após, as amostras foram

observadas contra a luz, objetivando avaliar a aparência translúcida e uniforme dos filtros contendo a mistura lipídica. As composições da membrana variaram quanto à presença/ausência de colesterol e presença/ausência de fosfolípido negativamente carregado, aqui representado pelo fosfatidilinositol (PI). O solvente empregado na solubilização de todas as misturas lipídicas avaliadas foi o n-dodecano. A definição da composição lipídica empregada em cada experimento pode ser visualizada na Tabela 4.1. A composição detalhada de cada membrana está descrita no Quadro 4.1.

Antes do acoplamento das placas doadora e receptora, para a formação do sanduíche, foi realizada a leitura da placa doadora em UV/fluorescência, sendo esta considerada, portanto, a placa referência. O sanduíche foi então formado e o tempo de incubação do sistema foi de 5h ou 15h, conforme planejamento dos experimentos descritos na Tabela 4.1. A temperatura de incubação foi fixada em 37°C e a agitação, quando presente, foi a 100 rpm com auxílio de agitador orbital do tipo “shaker”. A umidade foi controlada com o auxílio de folhas de papel filtro levemente umedecidas, situadas no topo da placa receptora e sob a tampa. Além disso, a umidade foi monitorada com o auxílio de termo higrômetros presentes dentro da incubadora de placas. Após período de incubação, cerca de 150 µL das soluções receptoras e doadoras, presentes em cada poço da placa, foram transferidos para diferentes placas de 96 poços transparentes e foram quantificadas sob espectro UV, numa faixa de leitura de 250 a 350 nm, com intervalos de 5 nm. Para o fármaco sotalol, a detecção foi feita em fluorescência, com excitação de 235 nm e emissão de 310 nm.

4.2.3.4 Análise dos resultados

Para o cálculo de permeabilidade efetiva (P_e) obtida dos ensaios de PAMPA (P_e) empregou-se a equação (6), descrita abaixo.

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A \cdot (t - \tau_{SS}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \quad (6)$$

Onde: r_v = Razão do volume dos compartimentos doador e receptor (V_D/V_A), em mL; A = área da membrana (0.3 cm^2); ε_a = porosidade aparente do filtro de

PVDF (0.76) (NIELSEN e AVDEEF, 2004); $C_D(0)$ e $C_A(t)$ = concentrações (mol/mL) das amostras presentes no compartimento doador no tempo $t = 0$ e no receptor no tempo t (s), respectivamente; τ_{SS} = Tempo de equilíbrio necessário para saturar a membrana com o soluto, estimado em $(54 R_M + 1) \cdot 60s$ (AVDEEF, 2012).

Além da P_e , foi também calculada a retenção dos fármacos na membrana (R_M), presente em valores de 0 a 1. A R_M corresponde à fração molar da amostra retida na membrana, e é definida em unidade mols (m) conforme a equação (7).

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}} \right) - \left(\frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}} \right) \quad (7)$$

4.2.4 Estudo da correlação entre a permeabilidade em PAMPA e dados extraídos da literatura para os fármacos do estudo

Após a realização dos experimentos de PAMPA, os resultados foram agrupados de acordo com os experimentos de DOE que geraram os maiores valores de permeabilidade em PAMPA para cada um dos fármacos estudados. Posteriormente, foram exploradas correlações entre os dados de permeabilidade em PAMPA e os parâmetros físico químicos de pKa, LogP, PSA, HBD, PM e VM disponíveis na literatura e usados inicialmente para a seleção dos fármacos deste estudo.

Da mesma forma, os resultados gerados pelos experimentos de DOE foram correlacionados com dados de permeabilidade em jejuno humano e em células Caco-2 disponíveis na literatura.

As correlações foram estudadas a partir de coeficiente de regressão linear, expresso pelo R^2 , obtido pelo método dos mínimos quadrados. Os valores de R^2 superiores a 0,5 foram explorados em maiores detalhes. Para estes estudos, foi utilizada a ferramenta de gráfico de contorno, disponibilizada pelo programa Minitab®. Os gráficos foram plotados entre dois parâmetros apresentando R^2 superior a 0,5, selecionados aleatoriamente, (eixos x e y), e tendo a permeabilidade em PAMPA como resposta (eixo z).

4.2.5 Estudos com a membrana fosfolipídica artificial

No presente trabalho, primeiramente demonstrou-se a avaliação da integridade das membranas realizada após os ensaios de PAMPA (item 4.2.4.1). Na sequência, a composição lipídica das membranas, tanto no que diz respeito à presença ou ausência de PI e CHO (item 4.2.3.2), quanto à variação dos solventes usados na solubilização dos fosfolipídeos (item 4.2.4.2), foram investigadas. Ademais, o estudo da conformação dos filtros de PVDF após a impregnação com as misturas lipídicas foi realizada e está apresentada nos itens 4.2.4.3 a 4.2.4.5. A forma de preparo das membranas fosfolipídicas foi padronizada para todos os experimentos neste trabalho e está detalhada no item 4.2.3.3.

4.2.5.1 Avaliação da integridade das membranas artificiais

A integridade das membranas lipídicas foi avaliada conforme proposto pela empresa Millipore (MILLIPORE, 2005). Primeiramente, as placas doadoras e receptoras foram submetidas ao ensaio de PAMPA, seguindo o protocolo descrito no item 4.2.3.3. Após o término do período de incubação, as amostras da placa receptora foram transferidas para placas de UV e o restante de amostra contido na placa foi descartado, invertendo-se gentilmente a placa sobre um papel absorvente. Da mesma forma, as amostras da placa doadora foram removidas com o auxílio de uma micropipeta multicanal, até que todo o excesso contido nos poços não pudesse ser visualizado.

Em seguida, a solução de marcadores de permeabilidade contendo uma mistura de amarelo lúcifer/azul cresil brilhante a 0,1 mg/mL em tampão PBS contendo 5% de DMSO foi transferida para a placa doadora (150 µL/poço). Na placa receptora foram adicionados 300 µL/poço de tampão PBS contendo 5% de DMSO. O “sanduíche” foi formado e novamente incubado por mais 4h. Após a incubação, a placa receptora foi inspecionada visualmente objetivando observar a presença de corante azul cresil brilhante (controle positivo de permeabilidade). Neste caso, a coloração da solução dos poços deve ser azul escura. Para confirmar a integridade das membranas, ambas as placas receptora e doadora foram submetidas à leitura em fluorescência, numa faixa de emissão de 440-850 nm, com excitação em 425 e emissão em 528 nm. A

baixa emissão de fluorescência da placa receptora em relação à doadora indica a ausência do corante Amarelo Lucifer nos poços e, portanto, comprova a integridade das membranas artificiais utilizadas no ensaio de PAMPA.

4.2.5.2 Estudo dos solventes usados na solubilização dos fosfolípidos da membrana artificial

Para avaliar o impacto dos solventes utilizados na impregnação das membranas de PVDF e seu impacto sobre a permeabilidade, foram empregadas as condições de ensaio e avaliação de resultados conforme mencionado no item 4.2.3.3. Especificamente, o pH da solução doadora foi de 6,0 e o da receptora, 7,4, sem adição de tensoativos ou solventes. O tempo de incubação foi de 15h e não houve agitação das placas. Os fármacos utilizados no ensaio foram o verapamil e a ranitidina, aqui definidos como marcadores de alta e baixa permeabilidade, respectivamente. Ambos os fármacos tiveram concentração de ensaio de 0,25 mM. A membrana lipídica foi composta de PC 10% (p/v) dissolvida nos seguintes solventes: A) n-hexano B) 1,7-octadieno; e C) n-dodecano. Após solubilização da PC nos solventes, as membranas presentes no compartimento receptor foram impregnadas separadamente, com 5µL de cada solução. Foram realizadas 4 replicatas de cada ensaio.

4.2.5.3 Avaliação das membranas fosfolipídicas por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Os ensaios de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizados empregando-se temperatura inicial de 25°C e final de 350°C, a uma taxa de 20°C/min, com fluxo de nitrogênio líquido a 80 mL/min. As membranas analisadas foram preparadas a partir de remoção dos filtros de PVDF presentes nas placas receptoras, com o auxílio de um bisturi, e posterior impregnação em diferentes soluções lipídicas, seguindo procedimento descrito no item 4.2.4.2. A relação das amostras de membranas fosfolipídicas avaliadas podem ser visualizadas no Quadro 4.2.

Os parâmetros calorimétricos considerados no estudo foram a temperatura de fusão (*Onset*) e a entalpia de vaporização, expressas em °C e J/g, respectivamente.

Quadro 4.2 - Relação das membranas fosfolipídicas analisadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Código	Descrição
Dodecano	n-dodecano
PC 10%	Solução de PC a 10% (p/v) em dodecano
PC 10% + CHO 0,5%	Solução de PC a 10% (p/v) + CHO a 0,5% (p/v) em dodecano
PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%	Solução de PC a 10% (p/v) + CHO a 0,5% (p/v) + PI a 2% (p/v) em dodecano
PVDF	Membrana de PVDF
PVDF + dodecano	Membrana de PVDF impregnada com n-dodecano
PVDF + PC 10%	Membrana de PVDF impregnada com solução de PC a 10% (p/v) em dodecano
PVDF + PC 10% + CHO 0,5%	Membrana de PVDF impregnada com solução de PC a 10% (p/v) + CHO a 0,5% (p/v) em dodecano
PVDF + PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%	Membrana de PVDF impregnada com solução de PC a 10% (p/v) + CHO a 0,5% (p/v) + PI a 2% (p/v) em dodecano

4.2.5.4 Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise foi realizada nas instalações do Instituto de Química da USP (IQ-USP), utilizando três amostras diferentes: A) membrana de PVDF isolada; B) membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) em dodecano; e C) membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) + CHO 0,5 % (p/v) em dodecano. A composição detalhada e forma de preparo das membranas podem ser visualizadas no Quadro 1 e item 4.2.4, respectivamente. As condições de ensaio foram: voltagem do feixe de elétrons de 1 kV, ampliação de 5000X e distância de trabalho (*Working Distance* – WD) entre 8 e 8,2 mm.

Após a obtenção das imagens, o tamanho de poro das membranas foi estimado com o auxílio de um paquímetro, respeitando a escala apresentada na micrografia. O tamanho de poro médio foi obtido a partir de 10 medições de cada micrografia.

4.2.5.5 Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia de Força Atômica (AFM)

O AFM foi usado para acessar diretamente o módulo de compressão das camadas lipídicas. Para tanto, foi utilizado o equipamento de AFM Nanoscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) acoplado a um microscópio de inversão óptica Axiomat. Um termômetro infravermelho registrou a temperatura das amostras durante o experimento. O cantilever utilizado foi composto de nitreto de silício com revestimento de ouro, com constante de elasticidade de 6 mN/m. A técnica utilizou o modo contato com área de varredura de 20 μm e taxa de varredura de 1,001 Hz. As amostras, preparadas conforme descrito no item 4.2.4.2, foram: A) filtro de PVDF isolado; B) filtro de PVDF + PC 10% (p/v) dissolvido em dodecano; e C) filtro de PVDF + PC 10% + CHO 0,5% (p/v) dissolvidos em dodecano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos fármacos para os estudos de permeabilidade

O transporte de fármacos através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico, que inclui a passagem dos compostos por diferentes vias. Conforme apresentado no capítulo Revisão da Literatura (item 3.1.2), o transporte de fármaco através das membranas ocorre por meio das seguintes vias: 1) transporte transcelular passivo; 2) transporte paracelular passivo; 3) transporte ativo mediado por carreadores; 4) transporte de efluxo via Glicoproteína P (PROULX, 1991).

O transporte passivo transcelular é o mais comum de todas as vias e pode ser descrito pela difusão de moléculas através dos enterócitos presentes na membrana intestinal. É um processo normalmente rápido, sendo a passagem através da membrana o fator limitante da taxa de absorção (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Para que a difusão na membrana seja eficiente, a molécula deve ser suficientemente lipofílica e com moderado peso molecular, propriedades as quais fazem parte da maioria dos fármacos (LANDE *et al.* 1995; LENNERNAS, 1998; AVDEEF, 2012; SKOLD *et al.* 2006).

A difusão passiva de fármacos é regida primariamente pela lei de difusão de Fick, na qual o transporte de fármacos se dá pela diferença da sua concentração entre os compartimentos doador e receptor e pela espessura da membrana. A concentração do fármaco no compartimento receptor, por sua vez, é determinada pelas suas características físico-químicas. Dentre elas, destacam-se, o Peso Molecular (PM), pKa, solubilidade e logP (AVDEEF, 2012).

O PM oferece um impedimento estérico à permeabilidade, sendo, portanto, inversamente proporcional à ela. O pKa, por sua vez, torna a permeabilidade do fármaco dependente do pH do compartimento doador, seguindo a teoria de partição em pH já abordada no item 3.1.2.2 deste trabalho. A solubilidade permite a maior disponibilização do fármaco, uma vez que impede sua precipitação no compartimento doador e facilita, desta forma, o seu contato com a membrana. Por sua vez, o grau de lipofilicidade, expresso pelo logP, confere ao fármaco a afinidade à membrana lipídica seguindo uma proporção sigmoidal (BERGSTROM *et al.*, 2003).

O parâmetro de PSA, ou Área de Superfície Polar, é comumente

empregado em química farmacêutica como atributo para otimização da permeabilidade. As moléculas com uma maior área de superfície polar apresentam menor capacidade de permear as membranas celulares. O PSA reflete as interações eletrostáticas e de polarização entre o fármaco e o solvente (GHASEMI; SAAIDPOUR, 2007). De maneira geral, os parâmetros de PSA são calculados de forma mais fidedigna quando o número de ligações de hidrogênio é avaliado a partir da estrutura 3D da molécula (BOHETS *et al.*, 2001).

Os efeitos estéricos de uma molécula também podem ser descritos pelo seu volume molecular (VM). Os efeitos estéricos inerentes a uma molécula podem ser caracterizados pelo seu VM, o qual, inclusive, é considerado pela literatura como um dos descritores mais significantes para o logP (GHASEMI; SAAIDPOUR, 2007). Diversos modelos têm sido indicados na literatura como ferramentas para prever a absorção intestinal passiva, tais como o número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD), o PSA e logP, de forma isolada ou combinada. Embora frequentemente utilizado, o parâmetro de HBD não descreve a força da ligação de hidrogênio nem explica a possibilidade de ligações internas de hidrogênio e, desta forma, pode ser pouco preditivo da taxa de absorção quando considerado isoladamente (WINIWARTER *et al.*, 2003).

No presente trabalho, os fármacos avaliados foram: famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, propranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. A razão para a escolha destes fármacos se deu pela sua distribuição majoritariamente heterogênea no que diz respeito às características físico-químicas de logP, PM, PSA, VM, HBD e pKa. Além disso, apresentam, na sua grande maioria, dados de permeabilidade em jejuno humano e em células Caco-2 disponíveis na literatura. Não obstante, são fármacos cuja permeabilidade intestinal ocorre primariamente pela via transcelular passiva, permitindo seu estudo através da técnica de PAMPA.

A Tabela 5.1 mostra a relação dos fármacos selecionados com base nas suas características de PM, HBD, logP, VM e PSA, SCB, além de dados de permeabilidade em jejuno humano (P_{eff}), em células Caco-2 e Fração Absorvida (FA%) retirados da literatura. Em específico, a Tabela 5.2 apresenta os valores de pKa e o estado de ionização nos diferentes valores de pH, retirados da literatura, para os fármacos do estudo.

Tabela 5.1 - Relação de fármacos selecionados para o estudo de permeabilidade e sua caracterização em termos de: Peso Molecular (PM), Classificação Biofarmacêutica (SCB), Número doadores de ligação de hidrogênio (HBD), lipofilicidade (logP), Volume Molar (VM), Área de Superfície Polar (PSA), Fração Absorvida em Humanos (FA%), permeabilidade em intestino humano (P_{eff}) e permeabilidade em células Caco-2

Fármaco	PM ¹	SCB ²	HBD ⁵	logP ³	VM ⁵	PSA ¹	FA (%) ⁴	P_{eff} ⁶	Caco-2 ⁷
Famotidina	337	IV	8	-0,8	183,5	175,8	40	0,58	1,45
Furosemida	330	IV	4	2,6	205,8	122,6	60	0,05	0,12
Metoprolol	267	I	2	1,8	258,7	50,7	95	1,34	23,7
Montelukaste	586	I	2	8,3	460,7	70,4	-	-	-
Propranolol	259	I	2	3,5	237,2	41,5	93	2,9	41,9
Ranitidina	314	III	2	1,3	265,4	86,3	55	0,27	0,49
Sotalol	272	I	3	-0,5	219,7	78,4	95	-	2,91
Verapamil	454	II	0	4,3	429,3	64,0	98	6,8	0,99
Zidovudina	267	III	2	0,1	-	108,3	98	-	6,93

Fonte: ¹ChemAxon. Disponível em: www.chemicalize.org. Acesso em 14 Out. 2011; ²Biopharmaceutical Classification System, TSRL, Inc. Disponível em: <http://69.20.123.154/services/bcs/search.cfm>. Acesso em 18 de Julho de 2012; ³ChEMBL. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>. Acesso em 14 de Julho de 2012; AVDEEF, 2012; ⁴ZHU *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2007; Moda *et al.*, 2007; Paixao *et al.*, 2012; ⁵Chemspider – ACD predictor. Disponível em: www.chemspider.com. Acesso em 18 Ago. 2011; ⁶LENNERNAS *et al.*, 2003; LENNERNAS 2007; YAMASHITA, Takishi, 2008; ⁷ZHU *et al.*, 2002; Alt *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2007; HALLIFAX *et al.*, 2012.

Tabela 5.2 - Relação de fármacos selecionados para o estudo de permeabilidade e sua caracterização em termos de pKa e estado de carga, sendo este expresso em porcentagem (%) de fármaco ionizado, em diferentes condições de pH

Fármaco	pKa BA ¹	pKa AC ¹	% de ionização em pH ¹				
			3	4,5	6	7,4	9
Famotidina	7,9	10,3	100	100	99	77	12
Furosemida		4,2	2	50	97	100	100
Metoprolol	9,5	13,9	100	100	100	99	78
Montelukaste	2,2	4,8	14	35	95	100	100
Propranolol	9,5	13,8	100	100	100	99	78
Ranitidina	8,0		100	100	100	90	19
Sotalol	9,3	8,3	100	100	100	89	34
Verapamil	9,1		100	100	100	97	48
Zidovudina	9,5		0	0	0	1	22

BA = Básico; AC = Ácido

Fonte: ¹ACDLabs, 2012; ChEMBL. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>. Acesso em 14 de julho de 2012.; REYNOLDS *et al.*, 2009; AVDEEF, 2012.

5.2 Validação da quantificação dos fármacos por espectrofotometria UV/fluorescência

Os métodos analíticos empregados na determinação da concentração dos fármacos selecionados para os estudos de permeabilidade foram validados a partir dos procedimentos preconizados na RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, também relatado no ICH (2005) e na United States Pharmacopeia (2010) (item 4.2.2). O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Sendo assim, o método deve atender aos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

5.2.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Por sua vez, um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2003).

Os fármacos, famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, propranolol, ranitidina, verapamil e zidovudina apresentaram seu máximo de absorbância em 275, 270, 270, 285, 295, 310, 270 e 270 nm, respectivamente. Para estes fármacos, a quantificação foi feita por método espectrofotométrico em UV na concentração de 0,25 mM, concentração comumente empregada no estudo de permeabilidade em PAMPA. O sotalol foi quantificado por fluorescência, com emissão em 310 nm e excitação em 235 nm. A Figura 5.1 (A-J) demonstra que não houve interferência significativa dos componentes da solução tampão fosfato pH 7,4 na quantificação dos respectivos fármacos.

Figura 5.1 -Espectro de absorção obtido na região do ultravioleta para: A) tampão fosfato pH 7,4 na ausência de fármacos; B) famotidina; C) furosemida; D) metoprolol; E) montelukaste; F) propranolol; G) ranitidina; I) verapamil; e J) zidovudina em solução tampão fosfato pH 7,4. H) Espectro de absorção obtido na região de fluorescência para sotalol em solução tampão fosfato pH 7,4

5.1.2 Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003).

O método espectrofotométrico, em todas as condições adotadas no estudo, mostrou-se linear para as análises de todos os fármacos estudados, na faixa de 0,125 mM a 0,325 mM, ou seja, dentro de um intervalo de 50 a 130% da concentração usualmente utilizada para todos os fármacos deste estudo. Os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99. A Figura 5.2 (A-I) representa as curvas analíticas, resultantes de uma média de triplicatas, para os fármacos em solução tampão fosfato pH 7,4.

Figura 5.2 -Curvas analíticas obtidas a partir das análisesde: A) famotidina; B) furosemda; C) metoprolol; D) montelukaste; E) propranolol; F) ranitidina; H) verapamil; I) zidovudina em tampão fosfato pH 7,4, por meio do método espectrofotométrico UV. G) Curva analítica obtida a partir da análise de sotalol em tampão fosfato pH 7,4, por meio do método de fluorescência. Cada ponto representa a média de três repetições

5.1.3 Precisão (repetibilidade)

A precisão de um método indica o grau de concordância entre os resultados de uma mesma amostra. A precisão do método analítico foi expressa como desvio padrão e desvio padrão relativo (coeficiente de variação). Os resultados de repetibilidade obtidos para avaliação da precisão do método de quantificação de todos os fármacos do estudo indicaram concordância com o limite de 5,0% preconizado na RE 899/03 (BRASIL, 2003), o que permite afirmar que o método, nas condições adotadas, é preciso. Os valores resultantes deste ensaio estão apresentados na Tabela 5.3. Os valores representam a média de 6 (seis) determinações.

Tabela 5.3 - Valores de concentração teórica (CT), concentração média experimental (CME) e desvio padrão relativo (DPR) referentes às seis determinações da precisão intra-ensaio do método para a quantificação dos fármacos em solução tampão fosfato pH 7,4

	CT (mM)	CME (mM)	DPR (%)
Famotidina	0,150	0,153	0,212
	0,250	0,257	0,504
	0,325	0,320	0,328
Furosemida	0,150	0,145	0,378
	0,250	0,252	0,136
	0,325	0,331	0,400
Metoprolol	0,150	0,091	4,191
	0,250	0,278	1,980
	0,325	0,368	3,041
Montelukaste	0,150	0,165	1,061
	0,250	0,291	2,899
	0,325	0,297	1,980
Propranolol	0,150	0,178	1,980
	0,250	0,212	2,687
	0,325	0,311	0,990
Ranitidina	0,150	0,137	0,945
	0,250	0,240	0,739
	0,325	0,304	1,504
Sotalol	0,150	0,149	0,052
	0,250	0,253	0,201
	0,325	0,331	0,411
Verapamil	0,150	0,147	0,221
	0,250	0,253	0,201
	0,325	0,392	4,732
Zidovudina	0,150	0,147	0,182
	0,250	0,235	1,042
	0,325	0,302	1,610

5.1.4 Exatidão

A exatidão é definida como a proximidade entre os resultados obtidos no método proposto e o valor real, podendo ser expressa em termos de porcentagem de recuperação (USP 30, 2007).

A porcentagem de recuperação do método empregado nas análises se manteve dentro do intervalo de 95% a 105%. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.4. Os dados representam a média de três determinações para cada uma das concentrações do ensaio (0,125, 0,250 e 0,325 mM).

Tabela 5.4 - Valores de Concentração Teórica (CT), Concentração Média Experimental (CME) e Exatidão, expressa em porcentagem (%), referentes à determinação da exatidão do método espectrofotométrico para a quantificação dos fármacos em tampão fosfato pH 7,4

Fármacos	CT	CME	Exatidão
Famotidina	0,150	0,154	103,0
	0,250	0,252	100,9
	0,325	0,319	98,3
Furosemida	0,150	0,144	95,7
	0,250	0,252	100,9
	0,325	0,332	102,1
Metoprolol	0,150	0,154	102,7
	0,250	0,254	101,8
	0,325	0,326	100,2
Montelukaste	0,150	0,154	102,4
	0,250	0,249	99,7
	0,325	0,321	98,8
Propranolol	0,150	0,155	103,3
	0,250	0,251	100,4
	0,325	0,325	100,1
Ranitidina	0,150	0,155	103,0
	0,250	0,257	102,6
	0,325	0,314	96,7
Sotalol	0,150	0,149	99,4
	0,250	0,253	101,4
	0,325	0,332	102,1
Verapamil	0,150	0,146	97,0
	0,250	0,251	100,6
	0,325	0,332	102,3
Zidovudina	0,150	0,148	98,8
	0,250	0,260	104,0
	0,325	0,322	98,9

5.1.5 Robustez

De acordo com a RE 899/2003 (BRASIL, 2003), robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando, desta forma, sua confiança durante o uso normal. Neste ensaio foram avaliadas a influência da agitação e da temperatura sobre os resultados do ensaio.

Os resultados indicaram que as variações dos parâmetros de agitação e temperatura não promoveram alteração significativa das absorbâncias. Esta observação pode ser confirmada pelo baixo valor de desvio padrão (abaixo de 0,5%) obtido entre a leitura inicial e as leituras após as intervenções. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Valores de Concentração Média Experimental inicial (CME) e do Desvio Padrão Relativo (DPR%) após variação da agitação (Concentração Média Experimental após Agitação – CMEA) e variação da temperatura (Concentração Média Experimental após variação da Temperatura – CMET), caracterizando ensaio de robustez do método de quantificação dos fármacos em tampão fosfato pH 7,4

Fármacos	Agitação			Temperatura	
	CME	CMEA	DPR (%)	CMET	DPR (%)
Famotidina	0,257	0,255	0,150	0,256	0,080
Furosemida	0,252	0,251	0,065	0,250	0,136
Metoprolol	0,278	0,278	0,000	0,279	0,071
Montelukaste	0,291	0,290	0,071	0,288	0,212
Propranolol	0,212	0,211	0,071	0,211	0,071
Ranitidina	0,240	0,243	0,244	0,243	0,244
Sotalol	0,253	0,251	0,130	0,254	0,082
Verapamil	0,253	0,254	0,082	0,256	0,223
Zidovudina	0,235	0,231	0,302	0,233	0,160

A Tabela 5.6 resume os principais parâmetros resultantes da validação do método de quantificação dos fármacos do estudo.

Tabela 5.6 - Resumo dos resultados de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, expressos em comprimento de onda (nm), coeficiente de correlação linear (R^2), Desvio Padrão Relativo (DPR%) e Exatidão (%), respectivamente, para os fármacos do estudo

Fármacos	Comprimento de onda (nm)	Linearidade (R^2)	Precisão (DPR%)	Exatidão (%)
Famotidina	275	0,9925	0,212	103,0
			0,504	100,9
			0,328	98,3
			0,378	95,7
Furosemida	270	0,9913	0,136	100,9
			0,400	102,1
			4,191	102,7
			1,980	101,8
Metoprolol	270	0,9971	3,041	100,2
			1,061	102,4
			2,899	99,7
			1,980	98,8
Montelukaste	285	0,9972	1,980	103,3
			2,687	100,4
			0,990	100,1
			0,945	103,0
Propranolol	295	0,9949	0,739	102,6
			1,504	96,7
			0,052	99,4
			0,201	101,4
Ranitidina	310	0,9918	0,411	102,1
			0,221	97,0
			0,201	100,6
			4,732	102,3
Sotalol	310 (emissão) 235 (excitação)	0,9901	0,182	98,8
			1,042	104,0
			1,610	98,9
Verapamil	270	0,9949		
Zidovudina	270	0,9953		

5.3 Ensaio de PAMPA

Na busca por novos fármacos, os pesquisadores utilizam diversas técnicas para avaliar a permeabilidade intestinal destes compostos e, desta forma, utilizá-la como um importante critério na seleção dos candidatos que seguirão para as próximas fases da pesquisa (BOHETS *et al.*, 2001; PRAVEEN; CHONG, 2005).

As metodologias mais difundidas incluem métodos: *in vitro*, baseados em tecidos de animais, cultura de células ou sistemas artificiais; *in vivo*, que

contemplem os estudos farmacocinéticos em animais ou seres humanos; *in situ*, que consistem na perfusão em epitélio intestinal animal; e *in silico*, que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade dos fármacos. Assim, a utilização de um destes métodos ou a combinação dos mesmos têm sido o objeto da publicação de recentes pesquisas na área da biofarmácia (STENBERG, 2001; SUGANO, 2003; AVDEEF, 2005; PRAVEEN; CHONG, 2005; OBATA, 2005; MASAOKA *et al.*, 2006; SHAH *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; VOLPE, 2007; HAYESHI *et al.*, 2008; AVDEEF; TAM, 2010).

O ensaio de permeabilidade por meio do modelo de Membrana Artificial Paralela (“Parallel Artificial Membrane Permeability Assay” - PAMPA), proposto inicialmente por Kansy e colaboradores (1998), tem atraído grande atenção de diversos pesquisadores que estudam a absorção passiva transcelular de fármacos pela via oral (KANSY; SENNER; GUBERNATOR, 1998; LIPINKSI, 2002; VEBER *et al.*, 2002; DI *et al.*, 2003; RUELL; TSINMAN; AVDEEF, 2003; AVDEEF *et al.*, 2005; CARRARA *et al.*, 2007; AVDEEF *et al.*, 2007, MASUNGI *et al.*, 2008, MENSCH *et al.*, 2010; NIRASAY *et al.*, 2011; VELICKY *et al.*, 2011; HALLIFAX *et al.*, 2012).

Existem diversos parâmetros que afetam os resultados de permeabilidade obtidos pelo ensaio de PAMPA. Dentre os parâmetros mais explorados na literatura, destacam-se, o pH do meio do compartimento doador (AVDEEF *et al.*, 2005); a composição do meio do compartimento receptor (AMIDON; LEE; TOPP, 2000; SUGANO *et al.*, 2002; AVDEEF, 2012); a influência da agitação das placas (RUELL; TSINMAN; AVDEEF, 2003; AVDEEF, NIELSEN, TSINMAN, 2004; AVDEEF *et al.*, 2005; SCHERRER, 2009); e a composição lipídica da membrana (AVDEEF *et al.*, 2005; AVDEEF *et al.*, 2005; CARRARA *et al.*, 2007; MASUNGI *et al.*, 2008)

5.3.1 Mapeamento das variáveis da técnica

O ensaio de PAMPA, apesar de relativamente simples pelo fato de se tratar de uma técnica artificial, apresenta variáveis passíveis estudos mais aprofundados. Estas variáveis são consideradas de formas diferentes na

literatura, gerando valores de permeabilidade também divergentes para um mesmo conjunto de fármacos (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

A partir do mapeamento do processo apresentado no item 4.2.3.2, foi possível ter uma visão geral de todos os fatores que impactam na avaliação da permeabilidade dos fármacos avaliados no ensaio de PAMPA. Visando mitigar ao máximo a variabilidade do processo, alguns fatores foram fixados e monitorados ao longo dos experimentos. As variáveis consideradas mais críticas foram então avaliadas quanto ao seu impacto na permeabilidade dos fármacos do estudo. Para tanto, foi utilizada a estratégia de Desenho Experimental (DOE).

O DOE é uma ferramenta que tem como principal função auxiliar na melhoria de processos. Por meio do DOE, é possível selecionar os fatores que oferecem impacto de maior significância sobre determinado processo. Da mesma forma, o uso desta ferramenta permite entender como os fatores interagem entre si e, ainda, qual a combinação ideal de fatores que resulta na melhoria do processo (SHIVHARE; MCCREATH, 2010).

Conforme descrito no item 4.2.3.2, o DOE foi planejado com o auxílio do programa Minitab® (Minitab 15.1, 2010) objetivando apontar quais parâmetros do ensaio de PAMPA apresentam maior impacto sobre a permeabilidade dos fármacos avaliados neste estudo. Para tanto, foi utilizado o mesmo grupo de fármacos selecionados neste projeto, conforme descrito no item 5.1. Estes fármacos apresentam-se heterogeneamente distribuídos em relação aos diferentes parâmetros físico-químicos e, desse modo, formam um conjunto representativo para a avaliação do impacto das variáveis do método de PAMPA.

Os valores de permeabilidade obtidos para cada um dos 96 experimentos, bem como os valores de retenção de membrana, estão demonstrados nos Apêndices A e B, respectivamente.

Os dados de permeabilidade obtidos para cada experimento de DOE, descrito na Tabela 4.1, foram inicialmente avaliados em termos de sua distribuição normal e plotados em gráficos de Pareto. O gráfico de Pareto consiste em uma série de barras cujas extensões refletem a frequência da variável em uma determinada resposta. As barras são dispostas em ordem decrescente de altura a partir da esquerda para a direita. O gráfico de barras é usado para separar os "poucos vitais" dos "muitos triviais", sendo os primeiros

determinados pelas barras que ultrapassam a linha de significância (KENTUCKYGOV, 2011). Esta linha, por sua vez, é calculada com base num grau de liberdade zero e utilizando o desvio padrão de Lenth.

A distribuição normal dos dados foi avaliada a partir de gráfico de probabilidade normal versus resíduo, os qual é capaz de identificar a normalidade dos dados quando estes atingem uma reta no gráfico (MINITAB, 2010). Os gráficos de Pareto que demonstram as condições do ensaio de PAMPA que mais impactam na permeabilidade dos fármacos do estudo podem ser visualizados na Figura 5.3 A-I. Os valores de significância (p-valor) das condições do ensaio estudadas no resultado de permeabilidade estão discriminados na Tabela 5.9.

Figura 5.3 – Gráfico de probabilidade normal (direita) e Gráfico de Pareto (esquerda) para o efeito das condições de PAMPA (eixo y): composição da membrana, agitação das placas, pH do meio do compartimento doador, composição do meio do compartimento receptor e tempo de incubação. Os fármacos estudados foram: A) famotidina; B) furosemida

Figura 5.3 (continuação) – Gráfico de probabilidade normal (direita) e Gráfico de Pareto (esquerda) para o efeito das condições de PAMPA (eixo y): composição da membrana, agitação das placas, pH do meio do compartimento doador, composição do meio do compartimento receptor e tempo de incubação. Os fármacos estudados foram: C) metoprolol; D) montelukaste; E) propranolol

Figura 5.3 (continuação) – Gráfico de probabilidade normal (direita) e Gráfico de Pareto (esquerda) para o efeito das condições de PAMPA (eixo y): composição da membrana, agitação das placas, pH do meio do compartimento doador, composição do meio do compartimento receptor e tempo de

incubação. Os fármacos estudados foram: F) ranitidina; G) sotalol; H) verapamil; e I) zidovudina

Tabela 5.7 – Valores de significância expressos em p-valor e com base em um valor de alfa de 0,05, para o impacto das diferentes condições do ensaio de PAMPA na permeabilidade dos fármacos do estudo. Os valores em negrito representam os fatores que atingiram significância

Fármacos	p-valor				
	A	B	C	D	E
famotidina	0,000	0,095	0,103	0,939	0,121
furosemida	0,000	0,296	0,413	0,809	0,429
metoprolol	0,214	0,473	0,222	0,252	0,631
montelukaste	0,009	0,011	0,012	0,681	0,850
propranolol	0,696	0,536	0,168	0,231	0,713
ranitidina	0,038	0,096	0,618	0,275	0,015
Sotalol	0,160	0,246	0,270	0,715	0,803
verapamil	0,066	0,087	0,078	0,228	0,034
zidovudina	0,019	0,000	0,161	0,619	0,486

A) pH do meio do compartimento doador; B) tempo de incubação; C) agitação das placas; D) Composição da membrana lipídica; e E) Composição do meio do compartimento receptor.

A partir da Figura 5.3 e Tabela 5.7, é possível observar que, nas condições experimentais adotadas neste estudo, o pH do meio do compartimento doador, o tempo de incubação e a composição do meio do compartimento receptor foram os fatores que mais impactaram na permeabilidade dos fármacos do estudo. Por outro lado, as diferentes composições lipídicas das membranas empregadas no estudo, conforme indicado na Tabela 4.1, não promoveram alteração significativa (valores de p superiores a 0,05) nos resultados de permeabilidade dos fármacos avaliados, conforme indicado na Tabela 5.7. Esta observação pode sugerir que a alteração na composição lipídica da membrana, proposta neste trabalho, foi mais discreta que o necessário para provocar impacto na permeabilidade. Dados na literatura descrevem que a composição da membrana artificial em PAMPA pode conter CHO e PI em concentração de até 50% e 12% (p/v) do volume total de lipídeos, respectivamente (AVDEEF, 2012). No presente

trabalho, as concentrações empregadas de CHO e PI foram de 0,5% e 2% (p/v), respectivamente.

Com relação à presença de agitação, os resultados obtidos mostraram que o impacto desta variável sobre os resultados de permeabilidade não foi significativo (valores de *p* superiores a 0,05; Tabela 5.7). Neste estudo, empregou-se a agitação orbital da placa inteira (item 4.2.3.3). Segundo Avdeef e colaboradores (2005), a agitação magnética individual dos 96 poços, ao invés da agitação orbital das placas inteiras tem maior impacto sobre a permeabilidade de fármacos lipofílicos (AVDEEF *et al.*, 2005).

O ácido glicocólico, por se tratar de um ácido biliar, foi usado neste trabalho como tensoativo. Este reagente, quando presente no compartimento receptor, é descrito na literatura como potencial mimetizador do papel das proteínas séricas no que diz respeito a prover a ligação a fármacos lipofílicos e, desta forma, favorecer seu gradiente de concentração em direção ao compartimento receptor (AVDEEF, 2012). Apesar disso, este tensoativo apresentou um impacto discreto na permeabilidade da maioria dos fármacos estudados neste trabalho, conforme apresentado na Tabela 5.7. Esta observação pode ser fundamentada pelo baixo efeito de solubilização deste tensoativo, além de possível formação de complexos fármaco-ácido biliar de baixa absorção (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Curiosamente, os fármacos classificados como BCS I (Tabela 5.1), com exceção do montelukaste, não apresentaram seus valores de permeabilidade significativamente influenciados por qualquer parâmetro do ensaio (Figura 5.3C, E e G, Tabela 5.7), nas condições experimentais adotadas. Esta sugestão merece estudos mais aprofundados, mas é possível que outras variáveis, tais como o tipo de solvente da membrana ou a variação da sua composição lipídica em proporções maiores do que as empregadas neste estudo, possam influenciar sua permeabilidade em maior grau. O montelukaste, por sua vez, é um fármaco recente, de forma que são escassos e insuficientes os dados de permeabilidade e físico-químicos disponíveis na literatura.

Na sequência, foram elaborados gráficos dos Efeitos Principais ("Main Effects Plot"). Estes indicam qual a variável de cada parâmetro que tem maior impacto sobre a permeabilidade dos fármacos, através da inclinação das retas. Embora os gráficos de Pareto tenham demonstrado baixa significância em

algumas condições empregadas no ensaio (Figura 5.3), conforme discutido acima, o gráfico dos Efeitos Principais foi utilizado para permitir um maior entendimento sobre qual nível de cada parâmetro comparativamente favoreça a permeabilidade dos fármacos. Os resultados apresentados nas Figuras 5.4 a 5.8 e resumidos na Tabela 5.8 foram calculados com base na média dos níveis de cada parâmetro estudado, conforme descrito no item 4.2.3.2, e demonstram as condições de ensaio de PAMPA capazes de gerar os maiores valores de permeabilidade para os fármacos do estudo.

Tabela 5.8 - Resumo das condições do ensaio de PAMPA capazes de gerar, proporcionalmente dentre os diferentes experimentos do DOE, os mais altos valores de permeabilidade para os fármacos do estudo. Em paralelo, relação dos valores médios de P_e obtidos nos 96 experimentos do DOE e respectivos Desvios Padrão (DP%)

Fármacos	A	B	C	D	E	P_e	DP (%)
Famotidina	6,0	15	IN	IN	IN	3,75	2,32
Furosemida	4,5	5	IN	IN	tampão + ác.	3,72	4,56
Metoprolol	6	IN	ausência	PC+CHO+PI	IN	12,4	19,33
Montelukaste	4,5	15	ausência	PC+CHO+PI	tampão + ác.	6,94	10,58
Propranolol	6	5	ausência	PC+CHO+PI	tampão	10,1	15,63
Ranitidina	9	15	presença	PC+CHO	tampão	4,57	10,60
Sotalol	9	15	ausência	PC+CHO+PI	tampão	13,7	22,96
Verapamil	4,5	15	ausência	PC+CHO	tampão	7,76	8,94
Zidovudina	IN	15	IN	IN	IN	4,67	1,07

A) pH do meio do compartimento doador; B) tempo de incubação (h); C) Agitação das placas; D) Composição da membrana artificial; E) composição do meio do compartimento receptor. PC: fosfatidilcolina; CHO: colesterol; PI: fosfatidilinositol; ác.: ácido glicocólico a 0,5% (p/v); tampão: tampão fosfato pH 7,4; IN: Indiferente; P_e : média dos valores de permeabilidade em PAMPA, expressa em 10^{-6} cm/s, para os 96 experimentos do DOE.

Figura 5.4 -Gráfico dos efeitos principais para pH do meio do compartimento doador gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE. Variação de pH no meio do compartimento doador, em valores de 4,5, 6,0, 7,4 e 9,0

O trato gastrointestinal apresenta uma ampla faixa de pH, iniciando em 4,6, nas primeiras porções do duodeno, até cerca de 8,0 nas porções finais do cólon (AVDEEF, 2012). O pH influencia diretamente o transporte passivo transcelular de fármacos ionizáveis, estando este intrinsecamente ligado ao pKa dos fármacos e, conseqüentemente, seu grau de ionização (Hogben *et al.*, 1959).

Os resultados de permeabilidade em diferentes valores de pH apresentados na Figura 5.4 mostram que o comportamento da maioria dos fármacos avaliados seguiu-se conforme previsto pela teoria de partição em pH. Conforme apresentado na Tabela 5.2, os fármacos metoprolol (pKa = 9,5), propranolol (pKa = 9,5), ranitidina (pKa = 8,0), sotalol (pKa = 9,3) e verapamil (pKa = 9,1), com caráter básico, foram mais permeáveis em valores de pH acima do seu pKa. Por sua vez, os fármacos de caráter ácido, furosemida (pKa = 4,2) e montelukaste (pKa = 4,8), foram mais permeáveis em valores de pH abaixo do seu pKa. Da mesma forma, a zidovudina, essencialmente neutra, apresentou valores de permeabilidade constantes e independentes do pH.

Apesar de apresentar permeabilidade dependente de pH, a permeabilidade do verapamil, em valores baixos de pH em jejuno humano, apresenta valores maiores que os observados em PAMPA, uma vez que sofre influência de transportadores ativos em meio ácido (YABUUCHI *et al.*, 1999;

AVDEEF *et al.*, 2005). Os fármacos de caráter básico metoprolol e propranolol mostraram valores de permeabilidade superiores em pH 7,4 do que em pH 9,0. É possível, então, que estes fármacos tenham sofrido, no ambiente básico, uma maior limitação devido à presença da camada de água estacionária (CAE) situada entre o compartimento doador e a membrana. Conforme descrito na literatura, a espessura da CAE no modelo de estudo PAMPA (item 3.3.1.3) é estimada em 1462 μm (AVDEEF; NIELSEN; TSINMAN, 2004). Ainda, conforme apresentado na Figura 5.4, os valores de permeabilidade para metoprolol foram superiores aos do propranolol. Esta limitação do propranolol em relação à permeabilidade, quando comparado ao metoprolol, pode ser atribuída à sua lipofilicidade superior, cerca de 2 vezes maior que a do metoprolol ($\log P$ 3,5 e 1,8, respectivamente) conforme descrito na Tabela 5.1.

De toda forma, a permeabilidade de um fármaco não é direcionada apenas pelo seu estado de carga. Outros fatores, tais como a solubilidade no compartimento doador, a composição da membrana artificial, a presença de agitação das placas durante a incubação ou mesmo formação de micelas ou agregados (auto-gregação ou “self-aggregation”) também contribuem para a passagem do fármaco através da membrana (AVDEEF, 2012). Além disso, as propriedades físico-químicas dos fármacos, outras que não apenas seu pK_a , podem direcionar sua permeabilidade (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Figura 5.5 - Gráfico dos efeitos principais para tempo de incubação gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE. Incubação das placas por um período de 5 ou 15 horas

Figura 5.6 -Gráfico dos efeitos principais para presença ou ausência de agitação das placas gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE

Figura 5.7 -Gráfico dos efeitos principais para variação da composição lipídica gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE

PC: fosfatidilcolina 10% (p/v); CHO: colesterol 0,5% (p/v); PI/PS: fosfatidilinositol 2% (p/v). Todos os lipídeos foram dissolvidos em n-dodecano.

Figura 5.8 -Valores de permeabilidade dos fármacos em PAMPA obtidos a partir da variação da composição do meio do compartimento receptor, dividido em tampão fosfato pH 7,4 na presença ou ausência de ácido glicocólico a 0,5% (p/v). Gráfico dos efeitos principais gerado pelo programa Minitab® com base em 96 experimentos do DOE

Buscando investigar a variação obtida entre os valores de permeabilidade advindos dos 96 experimentos do DOE, os desvios padrão foram calculados. A Tabela 5.8 mostra que os fármacos famotidina, furosemida e zidovudina não apresentaram uma alteração representativa da permeabilidade de acordo com a variação das condições de ensaio, fato que pode ser comprovado pelo baixo desvio padrão obtido para estes fármacos. Por outro lado, as maiores variações, expressas em DP%, de permeabilidade foram observadas para o propranolol, metoprolol e sotalol. A classificação BCS corrobora os valores de DP%, sendo que para os fármacos classe I o DP% foi significativamente maior que para os fármacos classe III e IV, sugerindo que quanto maior a permeabilidade de um fármaco, mais susceptível ele estará às condições do ensaio de PAMPA. Maiores investigações devem ser feitas para a ranitidina que, embora pertencente à BCS III, apresentou um desvio padrão considerável, conforme aponta a Tabela 5.8.

A partir dos resultados, é possível observar tendências comuns de comportamento de alguns fármacos, possibilitando o seu agrupamento conforme condições de ensaio capazes de gerar um maior valor de permeabilidade.

O primeiro exemplo pode ser dado pelo grupo composto por famotidina, furosemida e zidovudina. Os resultados de permeabilidade obtidos para estes fármacos não foi influenciado significativamente pela presença de ácido glicocólico no compartimento receptor (com exceção da furosemida) (Figura 5.8), pela agitação das placas (Figura 5.6) ou pela presença de CHO e PI na membrana (Figura 5.7). Estes fármacos apresentam algumas características físico-químicas comuns, apresentando valores relativamente altos de PSA (176 e 108 Å², respectivamente), e PM compreendido entre 265-340 Da (Tabela 5.1).

Apesar de essencialmente neutra, a zidovudina teve sua permeabilidade afetada pelo pH do meio do compartimento doador, conforme nível de significância apresentado na Tabela 5.9 e Figura 5.3l. Esta observação merece estudos mais aprofundados, mas a significância gerada pelo gráfico de Pareto pode ter sido influenciada pelo fato da zidovudina apresentar-se 22% ionizada em pH 9,0, como divulgado na Tabela 5.2.

Outro grupo formado pelos resultados demonstrados foi o da ranitidina e sotalol. Embora tendo apresentado divergências quanto a presença de agitação nas placas (Figura 5.6), ambos apresentaram os maiores valores de permeabilidade nas seguintes condições: pH 9,0 no compartimento doador (Figura 5.4), incubação de 15h (Figura 5.5), presença de colesterol na membrana (Figura 5.7) e ausência de ácido glicocólico no compartimento receptor (Figura 5.8). Tanto o sotalol quanto a ranitidina apresentam valores semelhantes de PM, VM e PSA, embora façam parte de diferentes grupos da classificação biofarmacêutica (BCS), sendo eles classe I e III, respectivamente.

Um terceiro grupo foi formado pelo montelukaste e verapamil, fármacos que tiveram a permeabilidade favorecida pelo pH 4,5 do meio do compartimento doador (Figura 5.4), incubação de 15h (Figura 5.5), ausência de agitação (Figura 5.6) e presença de colesterol na membrana (Figura 5.7). Tanto o montelukaste quanto o verapamil possuem altos valores de logP, VM e PM e baixos valores de PSA. A BCS difere entre os dois fármacos, mas neste caso, ela não pode entrar como critério de discussão, uma vez que a BCS do montelukaste foi obtida a partir de dados calculados (TSRL Inc, 2012). Além disso, o montelukaste apresentou-se susceptível à presença do ácido glicocólico no compartimento receptor, fator o qual favoreceu sua permeabilidade (Figura 5.8). Isto deve estar relacionado à alta lipofilicidade

deste fármaco, expressa por um $\log P$ igual a 8,3 (Tabela 5.1), enaltecendo a importância do tensoativo (aqui exemplificado pelo ácido glicocólico) em reduzir a tensão superficial entre o fármaco e a solução hidrofílica do meio do compartimento receptor.

Por ultimo, o grupo formado pelo metoprolol e propranolol, apresentou valores comparativamente maiores de permeabilidade nas seguintes condições: pH 6,0 do meio do compartimento doador (Figura 5.4), ausência de agitação (Figura 5.6) e presença de PI na membrana (Figura 5.7). Grande parte das características físico-químicas destes dois fármacos – pK_a , PM, VM e PSA – são semelhantes, com exceção do $\log P$, que é cerca de 2 vezes maior para o propranolol.

Em resumo, os resultados obtidos a partir do DOE permitiram o agrupamento dos fármacos do estudo quanto às condições de ensaio de PAMPA que melhor favorecem sua permeabilidade. Os grupos de fármacos gerados possuem características de PM, PSA e VM semelhantes entre si. Assim, diante do exposto, é possível sugerir que estas propriedades físico-químicas, em conjunto com o estado de carga dos fármacos, são bons indicativos para a seleção das condições de ensaio de PAMPA. Não obstante, para que os maiores valores de permeabilidade sejam obtidos, os parâmetros do ensaio devem se adequar às características físico-químicas dos fármacos a serem estudados.

É válido ressaltar que o agrupamento dos fármacos acima se deu pelas condições do ensaio de PAMPA que levaram aos máximos valores de permeabilidade. Entretanto, não refletem necessariamente valores com alta correlação aos dados de permeabilidade em jejuno humano ou em células Caco-2. Desta forma, faz-se necessário tal estudo de correlação, tanto entre os resultados de permeabilidade em PAMPA e os parâmetros físico-químicos dos fármacos quanto entre os valores de permeabilidade obtidos por PAMPA e pelos gerados em jejuno humano e células Caco-2.

5.3.2 Estudo da correlação entre os a permeabilidade em PAMPA e dados extraídos da literatura para os fármacos do estudo

Após obtenção dos resultados de permeabilidade gerados pelos diferentes experimentos do DOE, explorou-se sua correlação com os parâmetros físico-químicos dos fármacos, os quais foram relatados no item 5.1 e demonstrados na Tabela 5.1. A correlação foi estudada a partir de coeficiente de regressão linear, expresso pelo R^2 , conforme descrito no item 4.2.4. Os valores de permeabilidade obtidos no presente estudo por meio do PAMPA foram comparados com os dados da literatura relacionados à permeabilidade, como FA%, P_{eff} e permeabilidade em células Caco-2, e também com os parâmetros físico-químicos de PM, pKa, logP, PSA, VM e HBD. Os coeficientes de correlação obtidos para todos os experimentos do DOE estão detalhados no Apêndice C. Os valores máximos de correlação calculados para cada parâmetro, e o respectivo experimento de DOE que gerou esta correlação, estão resumidos na Tabela 5.9 e apresentados na Figura 5.9 A-I.

Tabela 5.9 - Relação dos ensaios de PAMPA, expressos em experimentos do DOE, que geraram os maiores coeficientes de correlação (R^2) com os parâmetros de P_{eff} , FA%, permeabilidade em células Caco-2, PM, logP, PSA, VM e HBD

Parâmetro	R^2	Experimento do DOE
P_{eff}	0,858	4
Caco-2	0,718	69
pKa	0,652	28
PM	0,633	28
LogP	0,575	28
PSA	0,533	69
FA%	0,491	71
VM	0,364	28
HBD	0,217	71

Figura 5.9 - Correlação entre os valores de permeabilidade em PAMPA obtidos nos experimentos 4, 69, 28, 28, 69, 71, 28 e 71 do DOE e os valores de: A) P_{eff} ; B) Caco-2; C) PM; D) logP; E) PSA; F) FA%; G) VM; e H) HBD, respectivamente

Figura 5.9 - Correlação entre os valores de permeabilidade em PAMPA obtidos no experimento 28 do DOE e os valores de: I) pKa

Dado que os valores de FA% e permeabilidade em células Caco-2 para montelukaste e de P_{eff} para sotalol, montelukaste e zidovudina não estão disponíveis na literatura, a avaliação da correlação entre estes parâmetros e os experimentos de DOE considerou uma amostragem de 6 fármacos ao invés de 9. Os maiores valores foram observados para P_{eff} e permeabilidade em células Caco-2 - R^2 igual a 0,858 e 0,718, respectivamente - comprovando que o ensaio de PAMPA é capaz de prever os valores de permeabilidade em humanos para os fármacos objeto deste estudo (Figuras 5.9 A e B).

Dos parâmetros físico-químicos avaliados, o pKa foi o que apresentou maior correlação com os dados de permeabilidade obtidos a partir dos experimentos em PAMPA.

O experimento 28 foi o que gerou o maior coeficiente de correlação (R^2) entre os resultados de permeabilidade em PAMPA e os parâmetros de PM, pKa, logP e VM (Figura 5.9 C, D e G, respectivamente). Os parâmetros considerados no experimento 28 foram: pH 6,0 no compartimento doador, 15h de incubação, ausência de agitação das placas, membrana artificial composta por PC+CHO, presença de ácido glicocólico no compartimento receptor. Não obstante, os parâmetros de VM e HBD mostraram baixa correlação com os dados de permeabilidade em PAMPA, sugerindo que estas propriedades por si só não podem ser preditivas da permeabilidade de um fármaco. Esta observação pode ser confirmada por dados apresentados na literatura (WINIWARTER *et al.*, 2003).

Embora os fármacos transportados pela via passiva transcelular terem, em teoria, sua permeabilidade altamente influenciada pelas suas

características de lipofilicidade, pôde-se observar uma correlação modesta entre a permeabilidade e o logP. Apesar de alguns dados na literatura apontarem uma correlação considerável entre logP e permeabilidade (KANSY *et al.*, 2001), este, no entanto, não é capaz de isoladamente prevê-la. Isto se dá devido ao fato do sistema octanol/água, usado nos experimentos de determinação de logP, ser deficiente em similaridade estrutural com os fosfolipídeos presentes na estrutura da membrana (CHAN *et al.*, 2005). Não obstante, uma grande variabilidade experimental é relatada na correlação entre a permeabilidade e logP (AMIDON; LEE; TOPP, 2000).

Corroborando, a relação entre o logP e a permeabilidade é descrita na literatura como sendo não-linear, uma vez que ocorre uma diminuição da permeabilidade em valores extremos de logP. Esta não-linearidade pode ser atribuída a: (a) a difusão limitada de moléculas pobremente lipofílicas na membrana fosfolipídica, e (b) a partição preferencial das moléculas altamente lipofílicas na camada fosfolipídica da membrana celular, impedindo sua passagem através da porção aquosa da membrana (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2006).

O experimento 4 apontou a maior correlação com os valores de permeabilidade em jejuno humano (P_{eff}). O coeficiente de correlação, obtido por regressão linear, entre este experimento e os valores de P_{eff} retirados da literatura foi de 0,858. As condições de ensaio para este experimento, conforme apontadas pela Tabela 4.1, foram: pH 4,5 no compartimento doador, incubação de 15 horas, ausência de agitação das placas, membrana composta por PC+CHO e presença de ácido glicocólico no compartimento receptor.

A furosemida, embora tenha apresentado um perfil satisfatório de permeabilidade, dependente do pH – conforme apresentado no ensaio de DOE (Figura 5.4) – resultou num valor comparativamente alto quando no experimento de DOE 4 (Figura 5.9A). Como o experimento 4 favorece, em todos os parâmetros do ensaio, a permeabilidade deste fármaco, justifica-se o resultado maior observado.

O metoprolol, por sua vez, teve um valor significativamente baixo de permeabilidade no experimento 4. De acordo com a teoria de partição em pH já explorada neste trabalho, a permeabilidade deste fármaco é favorecida em regiões mais alcalinas (Figura 5.4). As condições de ensaio fornecidas pelo

experimento 4, no entanto, foram capazes de classificar os demais fármacos do ensaio de forma satisfatória.

O experimento 69, que possibilitou uma maior correlação entre os resultados de permeabilidade obtidos neste estudo por meio de PAMPA e os dados de permeabilidade publicados na literatura e obtidos a partir de estudos em células Caco-2, apresentou condições favoráveis para a permeabilidade do grupo formado pelo metoprolol e propranolol (Figura 5.9B). Em contradição aos dados de baixa significância para o parâmetro de pH do compartimento doador, apontados na Tabela 5.7, aqui ambos os fármacos seguiram a teoria de partição em pH, apresentando alta permeabilidade no pH de 9,0. As demais condições de ensaio do experimento 69 foram: incubação por 5 horas, ausência de agitação das placas, membrana composta por PC+CHO e ausência de ácido glicocólico no compartimento receptor.

Através dos dados apresentados, observa-se que as condições ideais do ensaio de PAMPA capazes de gerar a maior correlação com os dados de P_{eff} são diferentes daquelas que geraram maior correlação com os dados obtidos a partir de permeabilidade em células Caco-2. As principais diferenças se encontram no tempo de incubação (15 e 5 horas), pH do compartimento doador (4,0 e 9,0) e composição do compartimento receptor (presença e ausência de ácido glicocólico) para P_{eff} e permeabilidade em células Caco-2, respectivamente. A exigência de diferentes condições de ensaio para estas duas técnicas corrobora a baixa correlação entre elas, ($R^2 = 0,012$) conforme demonstrado na Tabela 5.11.

O emprego de cultura de células Caco-2 para avaliação da permeabilidade de fármacos, inclusive, tem recebido críticas consideráveis na literatura. Dentre elas, merece destaque o período extensivo de 20 dias, que se faz necessário para a diferenciação da monocamada. Além disso, variações na suplementação de nutrientes, número de passagens (repiques) e tempo de cultivo impactam significativamente na expressão de transportadores (HAYESHI *et al.*, 2008). Pelo mesmo motivo, o custo dos experimentos de permeabilidade empregando células Caco-2 pode ser considerado 10 vezes maior que os de permeabilidade em PAMPA (KERNS *et al.*, 2004).

Outra crítica é inerente à alta variação intra-laboratorial dos resultados de resistência transepitelial (TEER), utilizado como resposta à avaliação da integridade das células. Variações de 10 a 600 $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ para um mesmo repique

de células têm sido reportadas na literatura (WALTER; KISSEL, 1995; HIDALGO, 2001; BOHETS *et al.*, 2001)

Dados na literatura também destacam a característica de ligação não específica das células de Caco-2, chamada de cacofilicidade, um termo frequentemente usado para definir o potencial de um fármaco se ligar reversivelmente à célula de Caco-2, levando, portanto, a uma recuperação incompleta e resultando em valores de permeabilidade subestimados (BALIMANE; CHONG; SHAH, 2006).

Não obstante, a aderência da monocamada no frasco de cultura celular, insuficiente balanço de massas ao final do experimento, possível migração celular para ambos os lados do suporte inerte (devido a variações no tamanho de poro do filtro) ou mesmo a formação de uma multicamada de células ao invés de camada simples, são variações inerentes aos modelos *in vitro* supramencionados, que potencialmente reduzem o potencial de predição dos valores de permeabilidade de fármacos (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

Por todas as razões apresentadas acima, justifica-se o uso da técnica de PAMPA em detrimento à de cultura de células Caco-2 para a avaliação de fármacos cujo transporte se dá primariamente pela via transcelular passiva.

Com base nos dados de DOE obtidos, foi possível plotar gráficos de contorno, conforme descrito no item 4.2.4. As Figuras 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14 apresentam a relação entre: P_{eff} e permeabilidade em células Caco-2; $\log P$ e PM; PSA e $\log P$; pK_a e PM; e VM e FA%, respectivamente. Em todas elas, a intersecção do gráfico onde os valores de permeabilidade em PAMPA são os mais altos está representada por uma região mais escura.

A Figura 5.10 mostra que os maiores valores de permeabilidade em PAMPA foram obtidos para fármacos com P_{eff} entre 0 e $4 \cdot 10^{-4}$ cm/s e permeabilidade em células Caco-2 entre 18 e $40 \cdot 10^{-6}$ cm/s, com destaque para a região de P_{eff} entre 1 e $2 \cdot 10^{-4}$ cm/s e permeabilidade em células Caco-2 entre 20 e $27 \cdot 10^{-6}$ cm/s, onde pôde-se se notar uma área de contorno mais escura. Os dados apresentados pela Figura 5.10, aliados aos dados de correlação entre P_{eff} e permeabilidade em células Caco-2 ($R^2 = 0,012$) sugerem a ineficiência de expressão de transportadores pela cultura de células Caco-2, dados os quais podem ser confirmados por informações previamente

apresentadas na literatura (BALIMANE; CHONG; SHAH, 2006; HAYESHI *et al.*, 2008).

Figura 5.10 – Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de permeabilidade em células Caco-2 e permeabilidade em jejuno humano (P_{eff}) para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, proranolol, ranitidina e verapamil. Valores de permeabilidade em PAMPA e em células Caco-2 expressos em 10^{-6} cm/s. Valores de P_{eff} expressos em 10^{-4} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA

A relação entre permeabilidade, PM e $\log P$ tem sido reportada na literatura. A partir de uma projeção gráfica entre PM e $\log P$, Ritchie e colaboradores (2011) demonstraram que, numa seleção de 178 fármacos, um alto valor de permeabilidade foi apresentado por fármacos com PM entre 150-350 e $\log P$ entre 0 e 3,5 (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011). De forma semelhante, Camenisch e colaboradores utilizaram um modelo sigmoidal para estabelecer uma relação entre PM, $\log P$ e a permeabilidade em Caco-2 de 36 moléculas. Estes autores descobriram uma diminuição sigmoidal dos valores de permeabilidade em células Caco-2 conforme $\log P$ diminuiu de 3,7 para -4,5, sendo o formato da curva sigmoidal dependente do PM dos fármacos estudados (CAMENISCH *et al.*, 1998).

Neste trabalho, os fármacos estudados que apresentaram os maiores valores de permeabilidade em PAMPA estavam situados na faixa de $\log P$ entre 0 e 3 e de PM abaixo de 300, conforme apontado na Figura 5.11.

Figura 5.11 – Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de PM e logP para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, pranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA

Numa tentativa de correlacionar as propriedades de PSA e logP, evidenciou-se que os fármacos que se apresentam fora da faixa de PSA entre 10-125 e logP entre -1 e 6 demonstram problemas na biodisponibilidade (RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011). Aqui, a Figura 5.12 enfatiza que os fármacos com PSA abaixo de 90 e logP entre 0 e 3 obtiveram os maiores valores de P_e por meio do ensaio de PAMPA.

Figura 5.12 – Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de logP e PSA para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, pranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina.

Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA

Figura 5.13 – Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de PM e pKa para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA

A Figura 5.14, por sua vez, demonstra que os maiores valores de permeabilidade em PAMPA são encontrados para fármacos com FA% acima de 80% e VM entre 100 e 300 cm^3 . Propriedades moleculares de fármacos, incluindo HDB, logP, PSA e número de ligações rotativas foram exploradas por Zakeri-Milani e colaboradores (2006). Os resultados indicaram que os compostos que satisfazem área de superfície topológica igual ou inferior a 140 Å² têm uma elevada probabilidade de permeabilidade intestinal e boa fração da dose que é absorvido em humanos (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2006).

Figura 5.14 – Gráfico de contorno para valores de permeabilidade em PAMPA com base nos valores de VM e FA% para os fármacos famotidina, furosemida, metoprolol, montelukaste, proranolol, ranitidina, sotalol, verapamil e zidovudina. Valores de permeabilidade em PAMPA expressos em 10^{-6} cm/s. Quanto mais escura a região apresentada, maiores os valores de permeabilidade em PAMPA

A Tabela 5.10 resume a faixa de valores dos parâmetros físico químicos que geraram os maiores valores de permeabilidade em PAMPA para os fármacos estudados neste trabalho. Estes valores foram obtidos a partir dos gráficos de contorno apresentados nas Figuras 5.10 a 5.14.

Tabela 5.10 – Relação das faixas de valor dos parâmetros de P_{eff} , permeabilidade em células Caco-2, FA%, PSA, PM, logP e VM capazes de gerar os maiores valores de permeabilidade em PAMPA para os fármacos selecionados no estudo

Parâmetro	Faixa de valor
P_{eff}	$0-4 \cdot 10^{-4}$ cm/s
Caco-2	$18-40 \cdot 10^{-6}$ cm/s
pKa	8,5-9,5
FA%	>80%
PSA	$<90 \text{ \AA}^2$
PM	<300 Da
logP	0-3
VM	$100-300 \text{ cm}^3$

É importante salientar que são poucas as publicações na literatura que relatam o estudo das condições do ensaio de PAMPA e sua correlação com parâmetros físico-químicos de fármacos (FISCHER *et al.*, 2007; RITCHIE *et al.*, 2011; AVDEEF, 2012). Desta forma, há uma dificuldade explícita para discutir muitos dos resultados obtidos. A análise exploratória individual de cada variável do ensaio, além do estudo de um conjunto maior de fármacos, se faz significativamente necessária e deverá ser objeto de futuros trabalhos.

Em resumo, é possível afirmar que o ensaio de DOE foi útil para a exploração das diferentes condições do ensaio de PAMPA. Ainda, o presente trabalho foi capaz de prever uma condição experimental de PAMPA que apresentou alta correlação com dados de permeabilidade em jejuno humano para os fármacos objetos do estudo. O referido experimento contempla as seguintes variações: pH 4,0 no compartimento doador, incubação de 15 horas, ausência de agitação das placas, membrana composta por PC+CHO e presença de tensoativo (ácido glicocólico 0,5%) no compartimento receptor.

5.4 Estudos com a membrana fosfolipídica artificial

A membrana artificial usada nos ensaios de PAMPA é composta, em sua vasta maioria, por um filtro de PVDF hidrofóbico impregnado com mistura lipídica dissolvida em solvente orgânico.

Desde os primeiros estudos, sugere-se que a composição lipídica da membrana intestinal seja a grande responsável pela regulação da fluidez da membrana e, desta forma, afete as características de transporte transcelular (MEDDINGS, THEISEN, 1989; BRASITUS, SCHACHTER, 1984).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para avaliar suportes inertes isolados e suas interações com as misturas lipídicas. Dentre elas, a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) (GREGÓRIO FILHO, 1993; BLICHER *et al.*, 2009; TURKER *et al.*, 2011;), a Microscopia Eletrônica de Varredura (WANG *et al.*, 2009; OCHALEK *et al.*, 2012) e a Microscopia de Força Atômica (SPANGENBERG *et al.*, 2004; SEANTIER *et al.*, 2008; BUNSOW; JOHANNSMANN, 2008).

5.4.1 Avaliação da integridade das membranas artificiais

O protocolo utilizado para a avaliação da integridade das membranas se deu conforme descrito no item 4.2.3.6. Após a incubação do “sanduiche” contendo a mistura de marcadores de permeabilidade, foi possível constatar a integridade das membranas. Conforme demonstrado na Figura 5.15, a passagem do marcador positivo de permeabilidade, Azul Cresil Brilhante, da placa doadora para a placa receptora, evidenciado pela coloração azulada dos poços desta após incubação, demonstra a ausência de obstrução das membranas presentes na placa.

Para confirmar o resultado observado, a placa receptora foi submetida à leitura em fluorescência, com excitação em 425 e emissão em 528 nm. A Figura 5.16 compara a emissão de fluorescência do corante Amarelo Lúcer (controle negativo de permeabilidade) nos poços da placa receptora, em comparação à emissão do mesmo corante antes da incubação, na placa doadora. Este procedimento foi capaz de demonstrar conclusivamente a integridade das membranas artificiais, uma vez que os valores de Unidades Relativas de Fluorescência (URF) da placa receptora (após incubação) foram consideravelmente menores que os valores apresentados na placa doadora antes da incubação, em todos os poços da placa.

Perante as informações acima citadas, foi adotado como procedimento interno a repetição do ensaio de integridade ao final de cada ensaio de PAMPA. As amostras foram descartadas na eventualidade de os resultados de integridade não terem sido satisfatórios.

Figura 5.15 - Fotografia dos poços da placa receptora após ensaio de integridade

Figura 5.16 - Espectro de fluorescência comparativo de Amarelo Lucifer (marcador negativo de permeabilidade) nas placas receptora (em vermelho) e doadora (em azul). A detecção está expressa em Unidades Relativas de Fluorescência (URF)

5.4.2 Estudo dos solventes usados na solubilização dos fosfolípidos da membrana artificial

A membrana artificial usada nos ensaios de PAMPA é composta, em sua vasta maioria, por um filtro de PVDF hidrófobo impregnado com mistura lipídica dissolvida em solvente orgânico.

Dado que os fosfolípidos mais puros são sólidos que não se dispersam em filtros, um solvente não polar é normalmente utilizado para dissolver o fosfolípido antes do revestimento do filtro. Isto permite que ao pesquisador flexibilidade na escolha do fosfolípido e do solvente (KANSY; AVDEEF; FISCHER, 2004). A maioria dos pesquisadores utilizam solventes derivados de hidrocarbonetos alcanos, tais como n-dodecano (ZHU *et al.*, 2002; AVDEEF *et al.*, 2005; MASUNGI *et al.*, 2008, MENSCH *et al.*, 2010; NIRASAY *et al.*, 2011; HALLIFAX *et al.*, 2012) ou hexadecano (WOHNSLAND; FALLER, 2001, CHEN *et al.*, 2008). Porém, o uso de octadieno também é reportado na literatura (SUGANO *et al.*, 2001).

Neste trabalho, a variação dos solventes de membrana foi investigada a partir de estudos de permeabilidade com os fármacos ranitidina e verapamil. Os resultados demonstraram que estes fármacos são sensíveis ao tipo de solvente utilizado. Neste sentido, valores superiores de taxa de transporte foram observados nas membranas impregnadas com mistura fosfolipídica

solubilizada com o solvente 1,7-octadieno. Os valores comparativamente superiores observados em alquidienos de cadeia curta, aqui representados pelo 1,7-octadieno, podem ser atribuídos à sua viscosidade inferior (DEFERME; ANNAERT; AUGUSTIJNS, 2008).

Não obstante, dados da literatura sugerem que a presença de duplas ligações na estrutura desses solventes forma uma espécie de dobra entre as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídeos, gerando espaços onde a interação cauda-cauda ocorre com menor intensidade. Desta forma, a membrana se torna mais fluida e, portanto, mais permeável (LENNERNAS, 1998). Do contrário, o solvente n-hexano, embora tenha sido eficiente na solubilização dos fosfolipídeos, promoveu valores consideravelmente inferiores de permeabilidade. Devido à sua rápida volatilidade, é possível sugerir que este solvente tenha tornado a membrana menos fluida e, desta forma, mais resistente à passagem de fármacos. A Tabela 5.9 apresenta os resultados de permeabilidade e respectivos Desvio Padrões (DP) para verapamil e ranitidina, nos diferentes solventes usados para solubilizar a mistura lipídica. A Figura 5.17 ilustra os dados apresentados pela Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Resultados comparativos da permeabilidade usando PAMPA (P_e PAMPA) e respectivos valores de desvio padrão (DP) para os fármacos ranitidina e verapamil, utilizando diferentes solventes para a solubilização dos fosfolipídeos a serem impregnados na membrana artificial

Permeabilidade em PAMPA ($\cdot 10^{-6}$ cm/s) (DP)			
Fármacos	Solventes		
	n-hexano	1,7 - octadieno	n- dodecano
ranitidina	4,49 (0,82)	6,64 (0,14)	4,01 (0,65)
verapamil	18,3 (0,45)	29,0 (1,67)	18,8 (1,42)

Figura 5.17 - Perfil comparativo de permeabilidade em PAMPA para ranitidina e verapamil obtidos a partir de filtro de PVDF impregnado com mistura lipídica solubilizada nos solventes hexano, dodecano e octadieno

Em suma, os valores de permeabilidade dos fármacos verapamil e ranitidina resultantes da solubilização dos fosfolipídeos de membrana em diferentes solventes foram decrescentes, seguindo a ordem: octadieno > dodecano ~ hexano. O dodecano, embora tenha gerado valores inferiores de permeabilidade quando em comparação ao octadieno, é o solvente de escolha dentre os estudos envolvendo PAMPA, conforme previamente mencionado neste trabalho (ZHU *et al.*, 2002; AVDEEF *et al.*, 2005; MASUNGI *et al.*, 2008, MENSCH *et al.*, 2010; NIRASAY *et al.*, 2011; HALLIFAX *et al.*, 2012). Além disso, não apresenta as mesmas dificuldades no manuseio, por não ser tão irritante quando inalado (SUGANO *et al.*, 2001). Por estas razões, o uso do dodecano foi padronizado nos demais experimentos reportados neste trabalho, muito embora sua baixa volatilidade tenha sido objeto de algumas críticas (CHEN *et al.*, 2007).

5.4.3 Avaliação das membranas fosfolipídicas por DSC

O fluoreto de polivinilideno (PVDF) é um polímero termoplástico derivado do flúor produzido pela polimerização do difluoreto de vinilideno (CHEN; HONG, 2002). Sua fusão ocorre em torno de 150-160°C e se apresenta cerca de 60% na forma cristalina (MÉNDEZ *et al.*, 2001).

A técnica de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foi usada neste

trabalho com o objetivo de auxiliar na investigação das possíveis interações entre as misturas lipídicas e o filtro de PVDF usado nos ensaios de PAMPA. Este estudo foi conduzido conforme descrito no item 4.2.4.3. Os termogramas das soluções lipídicas isoladas e impregnadas no filtro de PVDF estão apresentados nas Figuras 5.18, 5.19 e 5.20, respectivamente. Os valores de temperatura inicial de fusão/vaporização e de entalpia de vaporização estão destacados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Valores de temperatura inicial de fusão (T_{onset}) e entalpia, obtidos através de calorimetria diferencial exploratória (DSC) para as misturas lipídicas isoladas e impregnadas em filtro de PVDF

Amostra	Massa (mg)	T_{onset} (°C)	Entalpia integral (mJ)	Massa indiv. (mg)	Entalpia normaliz. (J/g)	T_{onset} (°C)	Entalpia integral (mJ)	Massa indiv. (mg)	Entalpia normaliz. (J/g)
PVDF						dodecano			
1	9,8	-	-	-	-	211,5	-2350	9,8	-239,8
2	8,2	-	-	-	-	210,9	-1596	7,4	-216,3
3	10,6	-	-	-	-	212	-2500,9	10,5	-237,1
4	11,5	-	-	-	-	212	-2705	11,3	-240
5	5,5	-	-	-	-	199,9	-866,4	4,9	-176
6	5,3	-	-	-	-	201	-802	4,6	-172,9
7	1,6	158,2	-62,7	1,6	-39,2	-	-	-	-
8	8,1	162,7	-59,2	1,5	-39,4	215,8	-1538,7	6,6	-229,7
9	3,6	158,1	-63,3	1,7	-37,2	178	-115,2	1,7	-64
10	4,6	155,7	-66	1,5	-44	180,3	-274,3	2,8	-95,8
11	3,8	160,7	-59,3	1,7	-34,9	177,3	-166,1	1,8	-86,3

Amostras: 1) dodecano; 2) PC; 3) CHO; 4) PI; 5) PC + CHO; 6) PC + CHO + PI; 7) PVDF; 8) PVDF+dodecano; 9) PVDF + PC; 10) PVDF + PC + CHO; 11) PVDF + PC + CHO + PI.

Indiv.: individual; Normaliz.: normalizada.

Figura 5.18 - Curvas de DSC comparativas entre o solvente (dodecano) e as soluções lipídicas isoladas e as misturas lipídicas PC 10% + CHO 0,5% e PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%, em atmosfera dinâmica de N₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20°C/min)

Figura 5.19 - Curvas de DSC comparativas entre o filtro de PVDF isolado e impregnado com as misturas lipídicas PC 10%, PC 10% + CHO 0,5% e PC 10% + CHO 0,5% + PI 2%, em atmosfera dinâmica de N₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20°C/min)

Figura 5.20 - Curvas de DSC comparativas entre o filtro de PVDF isolado, o solvente (dodecano) isolado e o filtro de PVDF impregnado com o solvente (dodecano), em atmosfera dinâmica de N₂ (80 ml/min) e taxa de aquecimento de 20°C/min

Algumas informações podem ser levantadas a partir da observação dos dados apresentados pela Tabela 5.12. Primeiramente, é possível afirmar que a adição da mistura fosfolipídica não provocou interações com o filtro de PVDF. Esta afirmação está baseada no fato da temperatura inicial de fusão (T_{onset}) e entalpia caraterísticos do PVDF terem se mantido constantes em 155-160°C e 59-66 mJ, respectivamente, independentemente da impregnação com a mistura lipídica. Outra observação que se fez possível através dos dados obtidos foi a de que os valores de T_{onset} e entalpia foram semelhantes entre as amostras 1 a 4. A semelhança destes valores foi provavelmente definida pelo dodecano, o qual estava em grande concentração em todas as amostras e parece ter, então, dominado o perfil calorimétrico das amostras avaliadas. Não obstante, era de se esperar que a T_{onset} na região de 200-210°C observada não correspondesse aos lipídeos, uma vez que a fusão destes ocorre a cerca de 21°C (WACHTEL; BOROCHOV; BACH, 2000). Por sua vez, dados na literatura de entalpia de vaporização calculada para o dodecano indicam o valor de 236 J/g (ACDLABS, 2012). Desta forma, a Tabela 5.12 foi dividida entre valores correspondentes ao perfil calorimétrico do PVDF e do dodecano.

Por sua vez, a T_{onset} das misturas lipídicas foi cerca de 5% inferior àquelas dos lipídeos isolados, sendo esta 210,96°C para a solução de PC e 199,09°C para PC + CHO, conforme descrito para as amostras 2 e 5 da Tabela 5.12, respectivamente. Estes resultados sugerem uma sutil alteração do comportamento térmico dos lipídeos quando misturados. A alteração parece ter sido causada pela presença do colesterol, uma vez que a adição de PI à mistura de PC + CHO, amostra 6 da Tabela 5.12, não mostrou diferenças na T_{onset} quando comparada à amostra 5.

Dados na literatura indicam que o aumento da concentração de colesterol faz com que os fosfolipídeos interajam com as moléculas deste além de apenas com as cadeias de hidrocarbonetos flexíveis presentes das moléculas adjacentes dos fosfolipídeos. Esta interação progressivamente reduz e eventualmente elimina a transição de fase de ponto de fusão das cadeias carbônicas fosfolipídicas. Alguns dos principais efeitos da incorporação de colesterol incluem: (i) um eventual alargamento ou eliminação e da fase de transição gel-líquido da bicamada fosfolipídica, (ii) uma alteração marcante na orientação das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídeos para acima ou abaixo da sua transição de fase, e (iii) uma diminuição do ângulo de inclinação da cadeia acil dos fosfolipídeos na fase de gel (MCMULLEN; LEWIS; MCELHANEY, 1993). Apesar de influenciar a entalpia da mistura contendo PC e dodecano, a adição de CHO a 0,5% (p/v) não foi capaz de influenciar a permeabilidade dos fármacos estudados neste trabalho, conforme apontam a Tabela 5.7 e Figura 5.8.

Por ultimo, foi possível observar que, quando a mistura fosfolipídica foi impregnada no PVDF, houve uma redução significativa tanto da T_{onset} quanto da entalpia do sistema lipídico do dodecano. A T_{onset} das amostras 9 a 11 foi de aproximadamente 178°C, enquanto que para as amostras 8 foi de 215°C. Aqui, a alteração dos valores foi causada a partir da adição de PC ao filtro de PVDF, e se manteve constante após a incorporação de CHO e PI à mistura lipídica. Entretanto, o perfil calorimétrico do PVDF não foi alterado.

Em resumo, é válido afirmar que a técnica de DSC foi útil para identificar a integridade calorimétrica do PVDF tanto na presença quanto ausência da mistura lipídica. Além disso, foi possível verificar que o perfil calorimétrico da mistura lipídica é influenciado primariamente pela presença do dodecano, um solvente de baixa volatilidade que parece “encharcar” a membrana (CHEN *et*

al., 2007). Ainda, a T_{onset} e entalpia do sistema sofreram influência tanto da adição de colesterol na mistura quanto da presença de PC quando a mistura foi incorporada no PVDF.

5.4.4 Avaliação das membranas artificiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada neste trabalho como ferramenta para auxiliar na visualização da morfologia dos filtros de PVDF na presença e ausência de fosfolipídeos e de colesterol. Este estudo foi conduzido conforme descrito no item 4.2.4.4. As imagens obtidas para as amostras: A) PVDF; B) PVDF + PC 10%; e C) PVDF + PC 10% + CHO 0,5% podem ser visualizadas nas Figuras 5.21 a 5.23, respectivamente. O tamanho de poro médio observado foi de: A) 2,42 μm ; B) 2,40 μm ; e C) 1,82 μm .

O tamanho de poro médio observado na membrana C foi cerca de 30% menor que o tamanho de poro das outras duas membranas, as quais, por sua vez, apresentaram tamanhos de poro médio semelhantes. Este resultado aponta a redução relativa da porosidade da membrana causada pela presença de colesterol (Figura 5.23). Em outros estudos, a adição de colesterol nas membranas artificiais gerou tanto uma diminuição da área ocupada por fosfolipídeos quanto uma redução da permeabilidade da água (Mathai *et al.*, 2008). Porém, a elucidação de tal observação não é conclusiva.

Figura 5.21 - Imagem de MEV para membrana de PVDF na ausência de solução fosfolipídica (membrana A). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,0 mm

Figura 5.22 - Imagem de MEV para membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) em dodecano (membrana B). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,0 mm

Figura 5.23 - Imagem de MEV para membrana de PVDF impregnada com PC 10% (p/v) + CHO 0,5% (p/v) em dodecano (membrana C). Ampliação de 5000 vezes e distância de trabalho de 8,2 mm

5.4.5 Avaliação das membranas fosfolipídicas por Microscopia de Força Atômica (AFM)

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta integrada a um cantilever flexível. À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de "acidentes geográficos" encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (Blanchard, 1996).

No modo contato ("tapping mode"), o cantilever é mantido a poucos ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato (OLIVEIRA, 2007).

A técnica de AFM foi utilizada neste trabalho com objetivo de explorar as propriedades estáticas das flutuações térmicas nas membranas lipídicas e as propriedades elásticas que governam estas flutuações. Este estudo foi conduzido conforme descrito no item 4.2.4.5. As Figuras 5.24, 5.25 e 5.26 ilustram imagens 3D de AFM modo contato geradas para amostras de PVDF na ausência de lipídeos, PVDF impregnado com 2% de PC e com 20% de PC, respectivamente. Com base nos resultados obtidos é possível confirmar que a técnica de AFM não foi útil na avaliação da morfologia das membranas artificiais usadas em PAMPA. Os filtros de PVDF hidrofóbicos, que apresentam espessura de aproximadamente 125 μm e tamanho de poro de 0,45 μm , apresentam-se muito acidentados, impossibilitando a correta avaliação pelo modo contato. Além disso, a presença de significantes vales e picos na superfície da amostra geraram artefatos de ponta, ou seja, imagens triangulares que refletem a própria ponta ao invés da amostra.

Figura 5.24 – Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF. Área de varredura de 20 μm e taxa de varredura de 1,001 Hz

Figura 5.25 – Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF impregnado com 5 μL de PC 2% (p/v) dissolvido em dodecano. Área de varredura de 20 μm e taxa de varredura de 1,001 Hz

Figura 5.26 – Visão 3D de Microscopia de Força Atômica modo contato de PVDF impregnado com 5 μL de PC 20% (p/v) dissolvido em dodecano. Área de varredura de 20 μm e taxa de varredura de 1,001 Hz

Objetivando a elucidação da morfologia da membrana com maior precisão, ensaios de espectroscopia Raman confocal devem ser objeto de futuros trabalhos.

6. CONCLUSÃO

A técnica de PAMPA tem sido objeto de crescentes citações na literatura e, por ser uma técnica simples e economicamente viável, suas aplicações têm ganhado amplitude ao longo dos anos. O presente trabalho foi pioneiro em mapear as principais condições do ensaio e avaliar o seu impacto na permeabilidade de diferentes fármacos. Como fruto desta investigação, foi possível observar que o pH do compartimento doador, o tempo de incubação e a composição do compartimento receptor foram as condições do ensaio de PAMPA que mais impactaram a permeabilidade dos fármacos do estudo. Não obstante, o estudo das variáveis permitiu a combinação de condições de ensaio que resultaram em uma significativa correlação ($r^2 = 0,858$) com dados de permeabilidade em jejuno humano. Estas condições foram: pH 4,5 no compartimento doador, incubação de 15 horas, ausência de agitação das placas, membrana composta por PC+CHO e presença de ácido glicocólico no compartimento receptor.

Algumas constatações oriundas do projeto estão listadas abaixo:

1. O método espectrofotométrico em UV/fluorescência em placas de 96 poços para detecção e quantificação dos fármacos estudados mostrou-se adequado, apresentando linearidade, repetibilidade, exatidão, e robustez;
2. As propriedades físico-químicas de PM, PSA e VM foram as que mais influenciaram a seleção das condições de ensaio de permeabilidade em PAMPA para os fármacos estudados;
3. Os maiores valores de P_e por meio do PAMPA foram obtidos para fármacos com P_{eff} entre 1 e $2 \cdot 10^{-4}$ cm/s e permeabilidade em células Caco-2 entre 20 e $27 \cdot 10^{-6}$ cm/s, na faixa de logP entre 0 e 3 além de PM abaixo de 300 e com PSA abaixo de $90 \text{ \AA}^2$;
4. Os valores de permeabilidade dos fármacos verapamil e ranitidina resultantes da solubilização dos fosfolípidos em diferentes solventes seguiram a seguinte sequência: octadieno > dodecano > hexano;
5. Através das técnicas de MEV e DSC foi possível observar que a adição de CHO a 0,5% (p/v) na membrana artificial apontou uma redução relativa da porosidade da membrana. Além disso, provocou uma redução da entalpia e da temperatura inicial de fusão da mistura contendo PC a 10% (p/v) em dodecano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSON, A.; BURTON, P.S.; RAUB, T.J.; BARSUHN, C.L.; AUDUS, K.L.; HO, N.F.H. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.84, p.1197–1204, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 23 abr. 2010.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

AMIDON, G.L.; LEE, P.I.; TOPP, E.M. Transport processes in pharmaceutical systems. New York: Marcel Dekker, 2000. cap.4, p.103-132.

ANDERSON, B.W.; LEVINE, A.S.; LEVITT, D.G.; KNEIP, J.M.; LEVITT, M.D. Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum. *American Journal of Physiology*, v.254, p.G843–G848, 1988.

Apparaju, S.K. e Nallani, S.C. Pharmacokinetics: basics of drug absorption from a biopharmaceutical perspective. In: Chilukuri, D.M., Sunkara, G., Young, D. Pharmaceutical product development. *In vitro-in vivo* correlation. p. 29-46. Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2007.

AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.1, n.4, p.277-351, 2001.

AVDEEF, A.; TESTA, B. Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques. *Cellular Molecular Life Sciences*, v.59, p.1681–1689, 2002.

AVDEEF, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state*. Englewood Cliffs: Wiley-Interscience, 2012, 698p.

AVDEEF, A.; NIELSEN, P.E.; TSINMAN, O. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 11. Matching the *in vivo* unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, n.5, p.365–374, 2004.

AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; TAVELIN, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.24, p.333–349, 2005.

AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; FALLER, B.; KANSY, M.; SUGANO, K.; YAMAUCHIPAMPA, Y. Critical factors for better predictions of absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, p.2893-2909, 2007.

AVDEEF, A.; NIELSEN, P.E.; DU, C.M. *Method and apparatus for improving in vitro measurement of membrane permeability of chemical compounds*. US Pat. 0302095A, 31 jan. 2002, 7 ago. 2003. 67p.

AVDEEF, A.; TAM, K.Y. How well can the Caco-2/madin-darby canine kidney models predict effective human jejunal permeability? *Journal of Medicinal Chemistry*, v.53, p.3566–3584, 2010.

BALAZ, S. Does transbilayer diffusion have a role in membrane transport of drugs? *Drug Discovery Today*, v.17, p.1079-87, 2012.

BALIMANE, P.V.; HAN, Y.H.; CHONG, S. Current Industrial Practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction. *The AAPS Journal* v.8, p. E1-E13, 2006.

BENET, L.Z. The use of SCBDD in classifying the permeability of marketed drugs. *Pharmaceutical Research*, v.25, p.483-488, 2008.

BERGSTROM, C.A.S.; STRAFFORD, M.; LAZOROVA, L.; AVDEEF, A.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, p.558-570, 2003.

BERMEJO, M.; AVDEEF, A.; RUIZ, A.; NALDA, R.; RUELL, J.A.; TSINMAN, O.; GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ, C.; SÁNCHEZ, G.; GARRIGUES, T.M.; MERINO, V.

PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.21, p.429-441, 2004.

BLANCHARD, C.R. Atomic force microscopy. *Chemical Educator*, v.1, n.5, p.1-8, 1996.

BLICHER, A.; WODZINSKA, K.; FIDORRA, M.; WINTERHALTER, M.; HEIMBURG, T. The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics. *Biophysical Journal*, v.96, p.4581–4591, 2009.

BOHETS, H.; ANNAERT, P.; MANNENS, G.; BEIJSTERVELDT, L.V.; ANCIAUX, K.; VERBOVEN, P.; MEULDERMANS, W.; LAVRIJSEN, K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.1, p.367-383, 2001.

BONAMICI, D. *Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisemções*. São Paulo, 2009. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BRASITUS, T.A.; SCHACHTER, D. Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membranes: regional differences. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.774, p.138–146, 1984.

BUCKLEY, S.T., FISCHER, S.M., FRICKER, G., BRANDL, M. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.45, p.235-250, 2012.

BÜNSOW, J.; JOHANNSMANN, D. Electrochemically produced responsive hydrogel films: influence of added salt on thickness and morphology. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.326, p.61–65, 2008.

CAO, X.; GIBBS, S.T.; FANG, L.; MILLER, H.A.; LANDOWSKI, C.P.; SHIN, H.C.; LENNERNAS, H.; ZHONG, Y.; AMIDON, G.L.; YU, L.X.; SUN, D. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceutical Research*, v.23, p.1675–1686, 2006.

CARRARA, S.; REALI, V.; MISIANO, P.; DONDIO, G.; BIGOGNO, C. Evaluation of *in vitro* brain penetration: optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. *International Journal of Pharmaceutics*, v.345, p.125–133, 2007.

CHAN, E.C.Y.; TAN, W.L.; HO, P.C.; FANG, L.J. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. *Journal of Chromatography, A*, v.1072, p.159–168, 2005.

CHEN, N.; HONG, L. Surface phase morphology and composition of the casting films of PVDF-PVP blend. *Polymer*, v.43, p.1429-1436, 2002.

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharmaceutical Research*, v.25, p.1511-1520, 2007.

CHEN, M.L.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. *Molecular Pharmaceutics*, v.6, p.74-81, 2009.

CORTI, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; ZERROUK, P.M. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the methods suitability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.27, p.354-362, 2006.

DAHAN, A.; HOFFMAN, A. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.67, p.96-105, 2007.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. *In vitro* screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In: EHRHARDT, C.; KIM, K.-J., eds. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico* models. New York: Springer, American Association of Pharmaceutical Scientists, 2008. p.182–205.

DI, L.; KERNS, E.H.; FAN, K.; MCCONNELL, O.J.; CARTER, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, p.223–232, 2003.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction

of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.43, p.3714–3717, 2000.

FAGERHOLM, U.; LENNERNAS, H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.3, p.247-253, 1995.

FISCHER, H.; KANSY, M.; AVDEEF, A.; SENNER, F. Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes—influence of physico-chemical properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.31, p.32–42, 2007.

FLATEN, G.; DHANIKULA, A.B.; LUTHMANN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.27, p.80–90, 2006.

FUJIKAWA, M.; ANO, R.; NAKAO, K.; SHIMIZU, R.; AKAMATSU, M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p.4721-4732, 2005.

GHASEMI, J.; SAAIDPOUR, S. Quantitative structure–property relationship study of *n*-octanol–water partition coefficients of some of diverse drugs using multiple linear regression. *Analytica Chimica Acta*, v.604, p.99–106, 2007.

GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Lea Febiger, 1991. 406p.

GONZALES-MARISCAL, L.; NAVA, P. Tight junctions, from tight intercellular seals to sophisticated protein complexes involved in drug delivery, pathogen interaction and cell proliferation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.811–814, 2005.

GREGÓRIO FILHO, R. Influência das condições de cristalização na morfologia de filmes de polifluoreto de vinilideno (PVDF). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.3, n.2, p.20-27, 1993.

GUTKNECHT, J.; TOSTESON, F. Diffusion of weak acids across lipid membranes: effects of chemical reactions in the unstirred layers. *Science*, v.182, p.1258–1261, 1973.

HALLIFAX, D.; TURLIZZI, E.; ZANELLI, U.; HOUSTON, J.B. Clearance-dependent underprediction of *in vivo* intrinsic clearance from human hepatocytes: comparison with permeabilities from artificial membrane (PAMPA) assay, *in silico* and caco-2 assay, for 65 drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.45, p.570–574, 2012.

HO, N. Quantitative approaches to delineate passive transport mechanisms in cell culture monolayers. In: AMIDON, G.L.; LEE, P.I.; TOPP, E.M., eds. Transport processes in pharmaceutical systems. New York: Marcel Dekker, 2000. p.219–317.

HOGBEN, C.A.; TOCCO, D.J.; BRODIE, B.B.; SCHANKER, L.S. On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, v.125, p.275–282, 1959.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, v.2, p.2111-2119, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 07 Set. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. [S.l.]: INMETRO, 2003. v.1, p.1-36.

Junginger, H. E.; Verhoef, J. C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs action? *Pharmaceutical Science & Technology Today*. v.1, p.370-376, 1998.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, p.1007–1010, 1998.

KARLSSON, J.; ARTURSSON, P. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.71, p.55–64, 1991.

Kentucky.gov. Pareto Chart 2011. Disponível em: <http://personnel.ky.gov/nr/rdonlyres/d04b5458-97eb-4a02-bde199fc31490151/0/paretochart.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2011.

KERNS, E.H.; DI, L. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.8, 316-323, 2003.

KERNS, E.H.; DI, L.; PETUSKEY, S.; FARRIS, M.; LEY, R.; JUPP, P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, p.1440–1453, 2004.

KWAN, K.C. Oral bioavailability and first-pass effects. *Drug Metabolism Disposition*, v.25, p.1329–1336, 1997.

LANDE, M.B.; DONOVAN, J.M.; ZEIDEL, M.L. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of Genetics and Physiology*, v.106, p.67–84, 1995.

LEGEN, I., SALOBIR, M., KERC, J. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v.291, p.183-188, 2005.

LENNERNAS, H. Human intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, n.4, 1998.

LENNERNAS, H. Animal data: the contributions of the ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.1103–1120, 2007.

LEVITT, M.D.; FURNE, J.K.; STROCCHI, A.; ANDERSON, B.W.; LEVITT, D.G. Physiological measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. *Journal of Clinic Investigation*, v.86, p.1540–1547, 1990.

LI, C.; NAIR, L.; LIU, T.; LI, F.; PICHARDO, J.; AGRAWAL, S.; CHASE, R.; TONG, X.; USS, A.S.; BOGEN, S.; NJOROG, F.G.; MORRISON, R.A.; CHENG, K.C. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, v.75, p.1186–1197, 2008.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.46, p.3–26, 2001.

LIPINSKI, C.A. *Observation on current ADMET technology: no uniformity exists*. In: SOCIETY OF BIOMOLECULAR SCREENING. ANNUAL MEETING, Hauge, 2002. *Proceedings*. Hauge, 2002.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.620-643, 2002.

MASAO, Y.; TANAKA, Y.; KATAOKA, M.; SAKUMA, S.; YAMASHITA, S. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, n.3/4, p.240-250, 2006.

MASUNGI, C.; MENSCH, J.; DIJCK, A.V.; BORREMANS, C.; WILLEMS, B. MACKIE, C.; NOPPE, M.; BREWSTER, M.E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie*, v.63, p.194–199, 2008.

MEDDINGS, J.B.; THEISEN, S. Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition. *American Journal of Physiology*, v.256, p.G931–G940, 1989.

MENSCH, J.; MELIS, A.; MACKIE, C.; VERRECK, G.; BREWSTER, M.E.; AUGUSTIJNS, P. Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.74, n.3, p.495-502, 2010.

MILLIPORE. PC1545EN00. *Membrane integrity test for lipid-PAMPA artificial membranes*. 2005. Disponível em:

[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/\\$FILE/PC1545EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/$FILE/PC1545EN00.pdf). Acesso em: 20 jun. 2009.

NIELSEN, P.; AVDEEF, A. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, p.33–41, 2004.

OBATA, K.; SUGANO, K.; SAITOH, R.; HIGASHIDA, A.; NABUCHI, Y.; MACHIDA, N.; ASO, Y. Prediction of oral drug absorption in humans by theoretical passive absorption mode. *International Journal of Pharmaceutics*, v.293, p.183–192, 2005.

OCHALEK, M.; HEISLER, S.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.81, p.113–120, 2012.

OLIVEIRA, C.S. *Caracterização por microscopia de força atômica de camadas lipídicas imobilizadas em superfícies*. Florianópolis, 2007. 1v. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina.

PALM, K.; LUTHMAN, K.; ROS, J.; GRASJO, J.; ARTURSSON, P. Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.291, p.435–443, 1999.

PHARMA-ALGORITHMS. *ADME-Tox Box*. 2010. Disponível em: <http://pharma-algorithms.com/>. Acesso em: 09 mar. 2010.

PIDGEON, C.; VENKATARAM, U.V. Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Analytical Biochemistry*, v.176, n.1, p.36-47, 1989.

PRAVEEN, B.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v.10, p.335-339, 2005.

PROULX, P. Structure-function relationships in intestinal brush border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1071, p.255-271, 1991.

REIS, J.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H.R. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA): is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.10, p.1071-1076, 2010.

RITCHIE, T.J.; ERTL, P.; LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. *Drug Discovery Today*, v.16, n.1/2, p.65-72, 2011.

RUELL, J. TSINMAN, K.L.; AVDEEF, A. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa flux - optimized design (pOD-PAMPA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.20, n.4/5, p.393-402, 2003.

SANTORO, A.L. *Relações estrutura-retenção de flavonóides por cromatografia a líquido em membranas imobilizadas artificialmente*. São Carlos, 2007. 87p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

SHAH, P.; JOGANI, V.; BAGCHI, T.; MISRA, A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnology Progress*, v.22, p.186-198, 2006.

SCHERRER, R. The unstirrable water layer is unstirrable because it does not exist. *Chemistry and Biodiversity*, v.6, p.1917-1922, 2009.

SEANTIER, B.; GIOCONDI, M.C.; GRIMELLEC, C.L.; MILHIET, P.E. Probing supported model and native membranes using AFM. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.13, p.326–337, 2008.

SEO, P.R.; TEKSIN, Z.S.; KAO, J.P.; POLLI, J.E. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.29, p.259–268, 2006.

SIMONS, K.; VIRTÁ, H. Growing madin-darby canine kidney cells for studying epithelial cell biology. In: CELIS, J.E., eds. *Cell biology: a laboratory handbook*. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2006. p.127-131.

SKOLD, C.; WINIWARTER, S.; WERNEVIK, J.; BERGSTROM, F.; ENGSTROM, L.; ALLEN, R.; BOX, K.; COMER, J.; MOLE, J.; HALLBERG, A.; LENNERNAS, H.; LUNDSTEDT, T.; UNGELL, A.L.; KARLEN, A.L. Presentation of a structurally

diverse and commercially available drug data set for correlation and benchmarking studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, p.6660–6671, 2006.

SPANGENBERG, T.; MELLO, N.F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PASA, A.A.; NIEHUS, H. AFM *in-situ* characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading. *Physical State Solids*, v.201, n.5, p.857–860, 2004.

STENBERG, P.; NORINDER, U.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.44, p.1927-1937, 2001.

SUGANO, K.; HAMADA, H.; MACHIDA, M.; USHIO, H.; SAITOH, K.; TERADA, K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *International Journal of Pharmaceutics*, v.228, p.181–188, 2001.

SUGANO, K.; TAKATA, N.; MACHIDA, M.; SAITOH, K.; TERADA, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *International Journal of Pharmaceutics*, v.241, p.241–251, 2002.

SUGANO, K.; TAKATA, N.; MACHIDA, M.; ASO, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, v.257, p.245-251, 2003.

SUGANO, K.; KANSY, M.; ARTURSSON, P.; AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; ECKER, G.F.; FALLER, B.G.; FISCHER, H.; GEREBTZOFF, G.; LENNERNAS, H.; SENNER, F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.9, p.597-614, 2010.

SUN, D.; YU, L.X.; HUSSAIN, M.A.; WALL, D.A.; SMITH, R.L.; AMIDON, G.L. *In vitro* testing of drug absorption for drug ‘developability’ assessment: forming an interface between *in vitro* preclinical data and clinical outcome. *Current Opinion on Drug Discovery & Development*, v.7, p.75–85, 2004.

TAKANO, M., YUMOTO, R., MURAKAMI, T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology & Therapeutics*, v.109, p.137–161, 2006.

TURKER, S.; WASSALL, S.; STILLWELL, W.; SEVERCAN, F. Convulsant agent pentylenetetrazol does not alter the structural and dynamical properties of dipalmitoylphosphatidylcholine model membranes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.54, p.379–386, 2011.

UITERT, I.V.; GAC, S.L.; BERG, A.V.D. The influence of different membrane components on the electrical stability of bilayer lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1798, p.21-31, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP30; National Formulary: NF25. Rockville: The United Pharmacopeia Convention, 2007.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. *Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms base on a biopharmaceutics classification system*. Rockville: Food and Drug Administration, 2000. 13p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 12 Mar. 2011.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.-Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, p.2615–2623, 2002.

VERMA, R.P.; HANSCH, C.; SELASSIE, C.D. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. *Journal of Computed Aided Molecular Design*, v.21, p.3-22, 2007.

VOLPE, D.A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97, p.712-725, 2008.

WACHTEL, E.; BOROCHOV, N.; BACH, D. Effect of dehydroepiandrosterone on phosphatidylserine or phosphatidylcholine bilayers: DSC and X-ray diffraction study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1463, p.162-166, 2000.

WALTER, A.; GUTKNECHT, J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology*, v.77, p.255–264. 1984.

WALTER, E.; KISSEL, T. Transepithelial transport properties of peptidomimetic thrombin inhibitors in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2) and their correlation to *in vivo* data. *Pharmaceutical Research*, v.12, p.360–365, 1995.

WANG, X.; ZHANG, L.; SUN, D.; AN, Q.; CHEN, H. Formation mechanism and crystallization of poly(vinylidene fluoride) membrane via immersion precipitation method. *Desalination*, v.236, p.170–178, 2009.

WINNE, D. Shift of pH-absorption curves. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v.5, p.53–94, 1977.

WINNE, D.; GORIG, H.; MULLER, U. Closed rat jejunal segment *in situ*: role of pre-epithelial diffusion resistance (unstirred layer) in the absorption process and model analysis. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.335, p.204–215, 1987.

WINIWARTER, S.; FREDRIK, A.X.; LENNERNÄS, H.; HALLBERG, A.; PETTERSSON, C.; KARLÉN, A. Hydrogen bonding descriptors in the prediction of human *in vivo* intestinal permeability. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v.21 p.273–287, 2003.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.44, p.923–993, 2001.

WU, C.Y.; BENET, L.Z. Using the SCBDD to predict when metabolism and drug transport influence the disposition of a drug. *Pharmaceutical Research*, v.22, p.11–23, 2005.

ZHU, C.; JIANG, L.; CHEN, T.M.; HWANG, K.K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.37, n.5, p.399–407, 2002.

APÊNDICE A

Valores de permeabilidade em PAMPA obtidos para os 96 experimentos gerados no ensaio de DOE pelo programa Minitab®.

Exp.	Famot.	Furos.	Metop.	Montel.	Propran.	Ranit.	Sotal.	Verap.	Zidov.
1	5,72	0,00	31,18	25,40	8,42	2,53	62,07	7,31	5,65
2	3,97	14,20	12,50	10,47	9,19	2,21	26,34	8,85	5,95
3	5,27	0,00	26,46	19,55	6,79	2,81	47,71	8,44	5,44
4	5,10	16,84	1,11	13,93	24,10	1,72	53,92	61,40	4,55
5	4,93	0,00	42,66	15,58	21,27	2,65	52,55	42,70	5,42
6	3,57	11,19	23,07	27,15	7,58	2,31	45,81	8,60	4,60
7	5,71	3,01	56,71	22,28	34,40	2,75	0,00	27,30	7,43
8	3,89	1,60	109,76	1,64	4,27	1,87	0,00	7,98	6,79
9	4,50	3,38	23,31	23,43	33,00	2,99	0,00	31,90	5,82
10	16,68	1,83	7,88	46,99	8,91	2,52	0,00	8,14	4,79
11	4,90	4,21	20,75	32,62	29,43	4,53	64,48	32,43	7,07
12	4,40	2,06	7,13	24,03	8,06	2,59	40,80	8,45	6,02
13	4,15	2,22	22,97	20,00	7,82	3,47	0,00	7,29	5,74
14	4,21	2,00	0,77	24,99	5,81	2,29	16,23	6,92	5,59
15	4,34	2,15	20,35	26,14	7,63	3,37	80,45	8,17	5,52
16	4,75	2,11	1,21	23,17	5,80	2,31	33,78	6,18	4,86
17	3,84	2,40	15,29	14,07	8,41	3,54	84,52	7,82	5,48
18	3,28	1,94	1,24	65,71	7,68	2,34	61,35	8,85	4,71
19	2,82	1,79	1,33	4,71	8,27	14,79	67,95	11,41	5,18
20	2,21	1,69	0,50	5,33	5,31	2,75	31,56	8,40	4,85
21	2,85	1,18	1,13	4,72	9,13	16,87	42,94	15,94	5,76
22	2,64	1,64	0,44	4,69	4,42	2,86	30,54	6,45	5,00
23	4,33	2,91	0,92	5,81	8,71	18,33	28,25	17,20	5,59
24	2,89	1,91	0,42	5,39	5,41	3,62	25,09	7,81	4,74
25	3,55	0,00	0,51	4,70	7,06	12,59	0,20	8,28	5,06
26	3,28	14,51	1,37	3,30	7,21	1,44	0,11	7,42	4,89
27	3,66	0,00	0,29	5,14	7,70	2,63	0,26	7,56	6,25
28	3,32	15,31	1,44	25,13	7,80	1,62	0,14	8,32	4,71
29	2,71	0,00	0,33	5,29	8,02	2,73	0,22	8,64	5,65
30	3,36	15,62	1,28	4,29	7,85	2,22	0,37	9,07	4,93
31	19,16	3,74	1,48	1,85	21,61	1,82	0,47	8,30	9,00
32	3,90	1,18	56,18	1,43	51,08	2,72	0,16	0,00	4,23
33	3,99	3,98	1,14	1,92	5,11	2,99	0,52	7,78	5,64
34	3,64	1,80	0,00	1,64	0,00	1,75	0,16	0,00	5,00
35	5,01	4,64	1,05	1,96	7,75	2,17	0,44	7,22	5,79
36	3,78	1,81	41,33	1,55	0,00	2,48	0,15	0,00	5,30
37	9,77	1,60	11,68	1,85	7,82	5,45	4,15	9,14	4,62
38	2,86	1,60	0,00	1,66	0,00	1,75	0,67	0,00	5,21
39	3,12	1,84	25,99	1,73	8,32	3,93	3,88	9,54	5,48
40	2,74	1,62	0,00	1,41	0,00	1,93	0,70	0,00	5,07
41	3,22	1,72	12,84	1,77	8,17	4,27	3,88	7,60	6,72
42	3,28	1,57	0,00	1,58	0,00	2,18	23,33	0,00	5,11
43	2,89	2,00	0,00	2,53	5,70	32,27	2,44	10,61	6,80
44	1,54	1,92	0,00	2,14	0,00	2,92	11,15	0,00	5,03
45	2,47	1,60	0,00	2,75	12,23	98,87	0,00	15,29	4,64
46	2,41	1,77	0,00	2,20	0,00	3,54	9,71	0,00	5,05
47	3,32	2,07	33,08	2,51	9,64	0,00	0,00	7,31	5,55
48	2,56	1,69	0,00	2,23	0,00	3,73	13,88	0,00	4,94
49	4,10	9,82	0,28	3,76	5,11	2,11	0,16	5,96	3,27
50	3,44	5,66	0,64	3,99	9,53	2,39	0,12	10,93	3,89

51	2,96	11,94	0,27	3,66	5,69	2,09	0,18	7,16	3,37
52	3,22	7,55	0,55	3,65	8,74	2,24	0,12	12,19	3,47
53	2,99	12,31	0,21	4,15	6,01	2,20	0,16	6,01	2,65
54	3,28	6,26	0,59	4,00	7,70	2,16	0,17	10,57	3,76
55	3,24	1,60	1,18	1,52	48,13	2,34	0,20	6,85	3,66
56	3,07	1,30	10,16	1,90	22,65	2,50	0,15	0,00	4,01
57	3,37	1,63	1,82	1,62	9,56	2,33	0,19	7,29	3,98
58	3,77	1,69	9,43	1,58	0,00	1,57	0,12	0,00	3,62
59	3,24	1,78	1,50	1,75	6,70	2,52	0,19	6,37	3,64
60	3,55	1,80	11,18	1,72	0,00	2,64	0,13	0,00	4,21
61	3,71	1,38	21,09	1,50	7,16	2,16	0,44	8,14	3,38
62	2,58	1,55	0,00	1,63	0,00	2,46	3,53	0,00	4,01
63	3,04	1,47	11,30	1,54	6,25	2,23	0,44	6,68	3,29
64	2,94	1,47	44,35	1,39	0,00	2,06	2,46	0,00	3,76
65	2,80	1,52	9,81	1,60	6,88	2,25	0,40	6,47	3,79
66	3,31	1,58	5,63	1,56	106,46	2,21	0,46	7,25	3,72
67	2,10	1,72	16,51	2,31	7,30	4,31	10,05	7,67	3,81
68	2,53	1,68	18,59	3,29	0,00	2,11	0,91	0,00	3,76
69	2,40	1,41	18,38	2,27	18,89	4,37	9,19	10,20	3,75
70	2,46	1,52	34,40	2,25	0,00	2,38	1,04	0,00	4,47
71	2,12	1,60	17,29	2,34	9,49	5,02	11,64	11,21	4,03
72	2,58	1,91	100,80	2,33	84,90	2,74	1,03	0,00	4,16
73	3,31	16,65	0,29	3,31	4,41	2,02	0,15	5,58	3,38
74	3,41	7,11	0,70	3,48	8,41	2,06	0,11	9,56	3,48
75	3,23	18,03	0,21	3,70	5,30	2,08	0,16	6,73	3,50
76	3,05	8,04	0,66	3,83	7,94	2,08	0,11	10,38	3,44
77	3,25	20,35	0,22	4,41	3,66	2,08	0,16	6,79	3,47
78	3,40	7,94	0,71	4,56	7,79	2,14	0,11	9,88	3,59
79	3,86	2,22	1,03	1,70	7,39	1,44	0,20	6,90	3,45
80	4,18	1,81	22,55	1,76	23,44	2,37	0,14	0,00	4,36
81	3,51	1,66	1,13	1,64	7,31	1,34	0,20	7,61	3,68
82	3,34	1,59	20,66	1,88	0,00	1,46	0,12	0,00	3,57
83	3,52	1,77	1,14	1,15	7,13	2,45	0,25	6,61	4,18
84	3,60	1,78	25,97	1,76	0,00	2,46	0,13	0,00	4,10
85	3,36	1,40	24,84	1,79	7,50	2,48	1,48	6,54	3,90
86	3,05	1,40	4,01	1,37	0,00	2,25	0,74	0,00	4,03
87	3,02	1,63	20,78	1,67	6,18	2,28	1,28	6,60	3,66
88	3,07	1,44	6,25	1,47	0,00	2,23	0,26	0,00	4,04
89	3,30	1,77	19,55	1,72	6,59	2,65	1,71	6,00	3,91
90	3,43	1,54	4,10	1,81	0,00	2,28	0,23	0,00	4,27
91	2,77	2,13	36,59	2,79	8,97	9,35	0,00	7,22	4,80
92	3,04	1,76	1,65	2,39	0,00	1,70	48,81	0,00	4,61
93	2,56	1,78	3,93	3,04	7,40	8,46	66,24	11,19	4,40
94	2,31	1,73	1,05	2,18	0,00	2,70	47,03	0,00	4,55
95	2,51	1,71	40,35	2,55	8,15	7,98	68,41	7,98	4,42
96	2,59	1,74	0,82	2,60	0,00	2,78	64,49	0,00	5,31

Os valores são resultados de uma média de triplicata e estão expressos em 10^{-6} cm/s.

Famot.: famotidina; Furos.: furosemida; Metop.: metoprolol; Montel.: montelukast; Propran.: propranolol; Ranit.: ranitidina; Sotal.: sotalol; Verap.: verapamil; Zidov.: zidovudina.

APÊNDICE B

**Valores de retenção de membrana obtidos para os 96 experimentos de
PAMPA gerados no ensaio de DOE pelo programa Minitab®**

Exp.	Famot.	Furos.	Metop.	Montel.	Propran.	Ranit.	Sotal.	Verap.	Zidov.
1	-0,10	0,00	-0,06	0,72	0,03	-0,06	0,27	-0,02	-0,10
2	-0,52	0,23	0,30	0,75	-0,02	-0,04	0,06	0,00	-0,13
3	-0,09	0,00	0,33	0,69	-0,09	-0,08	0,30	-0,11	-0,14
4	-0,09	0,24	0,31	0,74	-0,02	-0,04	0,30	-0,05	-0,11
5	-0,27	-0,05	0,32	0,70	0,20	-0,13	0,26	-0,05	-0,11
6	-0,08	0,22	0,27	0,68	-0,09	-0,06	0,30	-0,09	-0,12
7	-0,16	0,15	0,10	-0,12	-0,05	-0,07	0,27	-0,03	-0,09
8	-0,14	0,35	0,25	-0,03	-0,04	-0,08	0,26	-0,05	-0,13
9	-0,17	0,01	0,33	0,04	-0,11	-0,12	0,28	-0,13	-0,15
10	-0,08	0,14	0,21	0,02	-0,01	-0,06	0,28	-0,11	-0,15
11	-0,10	-0,03	0,24	0,07	0,10	-0,13	0,29	-0,09	-0,10
12	-0,13	0,22	0,28	-0,06	-0,07	-0,13	0,29	-0,14	-0,13
13	0,03	-0,48	0,11	0,70	0,02	-0,21	0,38	0,04	0,02
14	0,07	0,33	0,29	0,78	0,12	0,12	0,37	0,13	0,02
15	0,07	-0,25	0,50	0,69	0,03	0,09	0,28	0,03	0,04
16	0,04	0,35	0,49	0,38	0,30	0,15	0,30	0,14	0,04
17	0,08	-0,31	0,50	0,71	0,37	0,12	0,25	0,19	0,05
18	0,04	0,30	0,41	0,69	0,09	0,12	0,40	0,04	0,02
19	-0,03	-0,15	0,33	0,34	0,13	0,11	0,40	0,06	0,02
20	-0,01	0,34	0,43	0,54	0,10	0,13	0,32	0,15	0,02
21	0,03	-0,19	0,46	0,39	0,03	0,09	0,41	0,02	0,02
22	0,10	0,36	0,39	0,50	0,31	0,14	0,44	0,14	0,05
23	0,04	-0,14	0,47	0,44	0,42	0,13	0,41	0,20	0,01
24	0,03	0,35	0,42	0,33	0,09	0,08	0,42	0,05	-0,02
25	-0,07	-0,02	0,15	0,21	0,21	-0,05	0,26	0,22	-0,11
26	-0,15	0,11	0,03	0,10	0,36	-0,10	0,27	0,05	-0,12
27	-0,09	0,00	0,30	0,08	0,15	-0,05	0,25	-1,13	-0,10
28	-0,11	-0,01	0,21	0,09	-0,03	-0,08	0,29	-0,02	-0,09
29	-0,16	-0,02	0,31	0,25	0,19	-0,09	0,28	0,30	-0,17
30	-0,14	-0,02	0,19	0,05	-0,08	-0,09	0,13	0,07	-0,16
31	-0,19	-0,05	0,29	0,08	0,17	-0,17	0,20	0,16	-0,21
32	-0,14	0,11	0,19	-0,03	0,31	-0,08	0,28	-0,01	-0,16
33	-0,21	-0,05	0,23	0,04	-0,08	-0,09	0,26	0,17	-0,14
34	-0,20	-0,08	0,12	-0,05	-0,01	-0,50	0,07	-0,03	-0,16
35	-0,24	-0,03	0,32	0,02	0,13	-0,10	0,23	0,22	-0,15
36	-0,16	-0,04	0,22	-0,03	0,02	-0,10	0,28	0,03	-0,27
37	0,02	0,14	0,23	0,70	0,33	0,21	0,30	0,25	0,02
38	0,00	0,29	0,23	0,61	0,28	0,09	0,24	0,03	0,03
39	0,09	0,12	0,46	0,61	0,32	0,05	0,35	0,21	0,00
40	-0,01	0,15	0,13	0,65	-0,44	0,08	0,40	-0,10	0,02
41	-0,01	0,07	0,52	0,64	0,36	0,09	0,40	0,35	-0,01
42	0,01	0,15	-0,09	0,66	0,04	0,13	0,41	0,10	-0,01
43	-0,01	0,16	0,41	0,46	0,22	0,11	0,37	0,24	-0,20
44	-0,01	0,25	0,14	0,31	0,31	0,11	0,39	0,02	0,00
45	0,08	0,12	0,44	0,44	0,18	0,08	0,26	0,19	-0,02
46	-0,01	0,16	0,00	0,36	-0,07	0,09	0,36	-0,03	-0,01
47	-0,05	0,08	0,14	0,38	0,23	-0,02	0,40	0,23	-0,07
48	0,00	0,14	-0,04	0,44	0,03	0,11	0,43	0,10	-0,02
49	-0,08	-0,08	0,24	0,70	0,50	-0,02	0,21	0,55	-0,08
50	-0,08	-0,05	-0,01	0,76	-0,21	0,00	-0,08	0,09	-0,08

51	-0,14	-0,03	0,21	0,72	0,52	-0,08	0,04	0,51	-0,09
52	-0,12	-0,06	0,16	0,65	0,07	-0,02	0,28	0,06	-0,08
53	-0,08	-0,06	0,65	0,26	0,60	-0,09	-0,10	0,53	-0,12
54	-0,10	-0,05	-0,23	0,66	0,07	-0,01	0,27	0,08	-0,11
55	-0,17	-0,10	0,04	0,21	0,47	-0,04	0,21	0,46	-0,10
56	-0,10	-0,11	0,05	0,12	0,08	-0,05	0,22	0,06	-0,12
57	-0,18	-0,07	0,22	0,20	0,52	-0,11	0,25	0,48	-0,13
58	-0,09	-0,13	0,09	0,05	-0,05	-0,04	0,26	0,07	-0,09
59	-0,12	-0,06	0,19	0,11	0,46	-0,10	0,20	0,48	-0,15
60	-0,11	-0,09	0,02	0,05	0,45	-0,16	0,23	0,46	-0,11
61	0,12	0,10	0,36	0,85	0,51	0,05	0,30	0,49	0,02
62	0,08	0,10	0,06	0,67	0,11	0,19	0,36	-0,03	0,01
63	0,09	0,14	0,16	0,61	0,53	0,17	0,31	0,45	0,04
64	0,08	0,16	0,05	0,60	0,18	0,18	0,44	-0,01	0,01
65	0,09	0,13	0,43	0,81	0,71	0,12	0,20	0,58	0,05
66	0,05	0,09	0,00	0,85	-0,02	0,18	0,36	0,00	0,06
67	0,03	0,13	0,18	0,49	0,51	0,12	0,30	0,50	0,06
68	-0,03	0,04	-0,33	0,44	0,10	0,16	0,38	0,04	0,01
69	0,06	0,15	0,19	0,43	0,58	0,17	0,34	0,49	0,02
70	0,05	0,14	-0,31	0,47	0,23	0,14	0,45	0,01	0,05
71	0,03	0,13	0,30	0,57	0,59	0,12	0,30	0,57	-0,01
72	0,05	0,13	-0,10	0,34	0,03	0,16	0,35	-0,01	0,01
73	-0,18	-0,07	0,31	0,74	0,60	-0,03	-1,94	0,57	-0,14
74	-0,06	-0,04	0,20	0,77	0,10	0,26	0,31	0,13	-0,09
75	-0,13	-0,02	0,26	0,68	0,64	-0,01	-0,58	0,50	-0,09
76	-0,07	-0,07	0,19	0,71	0,17	0,16	0,25	0,08	-0,10
77	-0,10	-0,06	0,34	0,75	0,59	0,01	-0,50	0,58	-0,10
78	-0,25	-0,06	0,19	0,70	0,14	0,17	0,28	0,11	-0,14
79	-0,16	-0,09	0,24	0,52	0,61	-0,01	-0,07	0,55	-0,16
80	-0,07	-0,05	0,16	0,54	0,10	0,10	0,24	0,13	-0,15
81	-0,13	-0,07	0,02	0,64	0,39	0,00	-0,18	0,49	-0,15
82	-0,10	-0,09	0,03	0,66	0,17	0,04	0,05	0,15	-0,13
83	-0,10	-0,08	0,22	0,57	0,45	0,02	-0,06	0,54	-0,19
84	-0,16	-0,06	0,11	0,63	0,15	0,08	0,06	0,13	-0,19
85	0,08	0,20	0,05	0,77	0,64	0,03	-1,01	0,53	0,04
86	0,12	0,09	-0,18	0,76	-0,23	0,30	0,09	-0,05	0,00
87	0,35	0,15	0,24	0,75	0,58	-0,06	-1,15	0,43	0,02
88	0,11	0,07	0,12	0,77	0,07	0,34	0,33	-0,06	0,02
89	0,05	0,08	0,31	0,76	0,52	-0,06	-1,71	0,55	-0,01
90	0,07	0,08	-0,33	0,75	-0,07	0,38	0,15	0,09	0,01
91	0,11	0,13	0,15	0,74	0,59	0,11	-0,69	0,51	0,04
92	0,12	0,12	0,13	0,73	0,11	0,31	0,42	-0,06	0,05
93	0,34	0,18	0,26	0,74	0,55	0,04	-0,46	0,45	-0,02
94	0,08	0,12	0,01	0,75	0,18	0,37	0,40	-0,01	-0,03
95	0,01	0,07	0,26	0,70	0,53	0,04	-0,44	0,45	-0,01
96	0,06	0,08	0,00	0,72	0,19	0,35	0,47	0,01	0,03

Os valores são resultados de uma média de triplicata.

Famot.: famotidina; Furos.: furosemida; Metop.: metoprolol; Montel.: montelukast; Propan.: propranolol; Ranit.: ranitidina; Sotal.: sotalol; Verap.: verapamil; Zidov.: zidovudina; Exp.: Experimento do DOE.

APÊNDICE C

Coeficientes de regressão linear, R^2 , obtidos entre a permeabilidade gerada pelos diferentes experimentos de PAMPA e os dados extraídos da literatura: PM, PSA, ASM, logP, HBD, VM, FA%, P_{eff} e permeabilidade em cultura de células Caco-2

Experimento DOE	Coeficiente de regressão linear (R^2)								
	PM	PSA	ASM	logP	HBD	VM	FA%	P _{eff}	Caco-2
1	0,003	0,114	0,005	0,004	0,009	0,000	0,309	0,005	0,236
2	0,016	0,075	0,003	0,002	0,009	0,018	0,266	0,009	0,081
3	0,003	0,127	0,007	0,005	0,015	0,000	0,340	0,021	0,191
4	0,034	0,102	0,133	0,094	0,133	0,092	0,302	0,858	0,006
5	0,002	0,351	0,073	0,051	0,174	0,046	0,776	0,532	0,139
6	0,011	0,115	0,032	0,050	0,015	0,010	0,341	0,001	0,131
7	0,001	0,420	0,079	0,146	0,166	0,084	0,704	0,146	0,488
8	0,066	0,119	0,005	0,002	0,023	0,005	0,208	0,005	0,120
9	0,122	0,463	0,330	0,456	0,295	0,354	0,861	0,647	0,437
10	0,679	0,001	0,477	0,464	0,002	0,414	0,017	0,024	0,021
11	0,015	0,280	0,098	0,113	0,110	0,064	0,851	0,747	0,333
12	0,035	0,073	0,056	0,057	0,013	0,033	0,712	0,631	0,367
13	0,148	0,221	0,231	0,312	0,090	0,252	0,386	0,013	0,255
14	0,440	0,045	0,358	0,388	0,024	0,335	0,090	0,626	0,013
15	0,003	0,063	0,001	0,001	0,004	0,001	0,443	0,039	0,251
16	0,083	0,031	0,080	0,077	0,003	0,050	0,053	0,512	0,027
17	0,033	0,042	0,007	0,010	0,001	0,023	0,593	0,097	0,378
18	0,245	0,053	0,213	0,232	0,014	0,168	0,285	0,769	0,073
19	0,048	0,026	0,012	0,027	0,005	0,030	0,012	0,157	0,016
20	0,014	0,031	0,000	0,003	0,010	0,004	0,230	0,825	0,001
21	0,028	0,055	0,000	0,008	0,041	0,004	0,035	0,275	0,025
22	0,023	0,018	0,005	0,012	0,003	0,012	0,118	0,710	0,000
23	0,004	0,058	0,012	0,000	0,081	0,003	0,009	0,238	0,076
24	0,008	0,029	0,000	0,002	0,011	0,001	0,128	0,699	0,000
25	0,031	0,036	0,081	0,041	0,137	0,121	0,000	0,094	0,008
26	0,006	0,025	0,004	0,012	0,000	0,002	0,001	0,009	0,015
27	0,093	0,046	0,134	0,151	0,117	0,290	0,164	0,591	0,100
28	0,633	0,005	0,372	0,575	0,017	0,364	0,003	0,017	0,014
29	0,120	0,107	0,203	0,233	0,207	0,356	0,252	0,694	0,095
30	0,021	0,014	0,001	0,034	0,003	0,001	0,003	0,025	0,025
31	0,046	0,061	0,065	0,071	0,146	0,077	0,004	0,034	0,185
32	0,186	0,292	0,050	0,002	0,028	0,050	0,364	0,000	0,850
33	0,009	0,008	0,014	0,008	0,046	0,066	0,068	0,641	0,023
34	0,003	0,549	0,128	0,174	0,214	0,066	0,945	0,374	0,343
35	0,001	0,008	0,001	0,000	0,003	0,003	0,059	0,387	0,041
36	0,080	0,063	0,018	0,013	0,005	0,015	0,117	0,036	0,087

37	0,094	0,012	0,005	0,059	0,004	0,022	0,159	0,139	0,123
38	0,007	0,414	0,133	0,152	0,117	0,056	0,984	0,421	0,383
39	0,094	0,247	0,001	0,000	0,099	0,000	0,458	0,036	0,231
40	0,016	0,418	0,159	0,182	0,114	0,086	0,994	0,444	0,401
41	0,178	0,312	0,012	0,003	0,185	0,000	0,664	0,153	0,412
42	0,074	0,005	0,070	0,099	0,017	0,084	0,976	0,405	0,370
43	0,002	0,005	0,002	0,003	0,075	0,006	0,055	0,002	0,106
44	0,061	0,014	0,086	0,097	0,006	0,062	0,719	0,462	0,399
45	0,005	0,007	0,000	0,006	0,045	0,000	0,077	0,035	0,074
46	0,061	0,045	0,103	0,136	0,023	0,078	0,812	0,437	0,388
47	0,069	0,184	0,002	0,000	0,048	0,001	0,384	0,008	0,281
48	0,063	0,016	0,080	0,112	0,017	0,076	0,803	0,420	0,375
49	0,062	0,079	0,005	0,029	0,011	0,002	0,019	0,012	0,073
50	0,073	0,044	0,116	0,166	0,106	0,133	0,208	0,607	0,027
51	0,045	0,026	0,006	0,043	0,001	0,004	0,000	0,025	0,055
52	0,082	0,023	0,117	0,157	0,097	0,121	0,172	0,567	0,000
53	0,046	0,028	0,003	0,043	0,001	0,000	0,005	0,002	0,036
54	0,113	0,019	0,142	0,183	0,097	0,158	0,162	0,587	0,000
55	0,064	0,172	0,018	0,005	0,026	0,015	0,173	0,073	0,675
56	0,171	0,210	0,077	0,002	0,012	0,060	0,212	0,001	0,965
57	0,004	0,095	0,009	0,027	0,084	0,025	0,304	0,521	0,304
58	0,072	0,004	0,060	0,072	0,030	0,044	0,003	0,145	0,018
59	0,001	0,046	0,025	0,033	0,080	0,054	0,242	0,631	0,142
60	0,082	0,000	0,056	0,061	0,008	0,035	0,009	0,144	0,021
61	0,055	0,193	0,000	0,001	0,064	0,000	0,453	0,047	0,244
62	0,039	0,313	0,174	0,242	0,132	0,124	0,961	0,454	0,408
63	0,046	0,227	0,003	0,007	0,106	0,007	0,637	0,169	0,338
64	0,082	0,082	0,015	0,011	0,008	0,016	0,133	0,030	0,095
65	0,054	0,257	0,002	0,009	0,135	0,009	0,733	0,232	0,453
66	0,081	0,193	0,027	0,003	0,023	0,024	0,179	0,047	0,742
67	0,146	0,388	0,002	0,001	0,145	0,004	0,569	0,074	0,289
68	0,044	0,050	0,009	0,005	0,004	0,005	0,081	0,060	0,066
69	0,160	0,533	0,004	0,004	0,164	0,006	0,726	0,162	0,774
70	0,072	0,076	0,014	0,008	0,009	0,011	0,123	0,035	0,089
71	0,112	0,463	0,001	0,002	0,217	0,000	0,738	0,221	0,299
72	0,174	0,315	0,041	0,000	0,036	0,042	0,388	0,000	0,817
73	0,012	0,091	0,008	0,002	0,018	0,014	0,040	0,017	0,103
74	0,057	0,012	0,068	0,121	0,056	0,072	0,133	0,439	0,008

75	0,016	0,066	0,003	0,007	0,008	0,007	0,022	0,006	0,088
76	0,085	0,011	0,094	0,152	0,072	0,098	0,127	0,433	0,000
77	0,027	0,088	0,001	0,008	0,013	0,004	0,039	0,016	0,143
78	0,120	0,007	0,113	0,178	0,058	0,117	0,104	0,403	0,000
79	0,003	0,018	0,021	0,029	0,031	0,034	0,189	0,577	0,126
80	0,205	0,229	0,076	0,007	0,012	0,068	0,294	0,002	0,896
81	0,005	0,039	0,040	0,045	0,067	0,066	0,257	0,694	0,114
82	0,066	0,035	0,019	0,016	0,000	0,016	0,081	0,053	0,070
83	0,003	0,023	0,004	0,007	0,056	0,023	0,193	0,585	0,130
84	0,075	0,043	0,021	0,018	0,001	0,018	0,087	0,052	0,071
85	0,082	0,196	0,002	0,000	0,052	0,002	0,373	0,009	0,257
86	0,098	0,151	0,179	0,232	0,099	0,110	0,142	0,414	0,023
87	0,070	0,195	0,000	0,000	0,062	0,000	0,400	0,019	0,228
88	0,088	0,031	0,104	0,123	0,035	0,054	0,010	0,248	0,001
89	0,090	0,195	0,003	0,000	0,055	0,002	0,390	0,013	0,261
90	0,045	0,178	0,123	0,167	0,113	0,063	0,177	0,427	0,031
91	0,079	0,201	0,002	0,000	0,068	0,001	0,281	0,001	0,192
92	0,063	0,001	0,042	0,059	0,006	0,066	0,695	0,601	0,225
93	0,056	0,029	0,014	0,028	0,004	0,035	0,263	0,581	0,003
94	0,063	0,002	0,042	0,058	0,004	0,065	0,804	0,651	0,347
95	0,146	0,108	0,035	0,042	0,010	0,066	0,290	0,000	0,174
96	0,061	0,003	0,039	0,054	0,003	0,062	0,877	0,601	0,370
MÁX	0,679	0,549	0,477	0,575	0,295	0,414	0,994	0,858	0,965

ANEXO A
Informações para membros da
banca julgadora de mestrado/doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B

Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6725778/1 - Juliana Mazza Reis

Email: ju_gene@hotmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 21/02/1984
Cédula de Identidade: RG - 7.925.797-4 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico Industrial - Universidade Federal do Paraná - Paraná - Brasil - 2007

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 06/02/2009
Início da Contagem de Prazo: 06/02/2009
Data Limite: 06/02/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Cristina Helena dos Reis Serra - 06/02/2009 até o presente.
 E.Mail: chserra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/02/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 02/05/2011
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado Direto em 06/02/2009
 Mudança de Norma em 10/11/2010
 Mudança de Regulamento em 10/11/2010
 Matrícula Regular em 23/07/2012

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula Regular em 23/07/2012

Impresso em: 29/01/13 19:43:53

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6725778/1 - Juliana Mazza Reis

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
PGF5205 - 1/1	Microscopia de Força Atômica e Tunelamento (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	02/03/2009	26/06/2009	150	10	93	A	N	Concluída
FBF5777 - 2/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	16/03/2009	28/06/2009	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5786 - 2/1	Metodologias de Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	15/09/2009	16/11/2009	90	6	86	A	N	Concluída
PSA5866 - 4/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	16/03/2010	26/04/2010	30	0	0	-	N	Pré - matrícula indeferida
FBF5778 - 1/3	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos	20/05/2010	30/06/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5794 - 1/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	15/03/2011	23/05/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5705 - 5/1	Planejamento de Fármacos (1)	20/08/2012	28/10/2012	90	0	0	-	S	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 23/07/2012

Impresso em: 29/01/13 19:43:53

ANEXO C

Currículo Lattes

Juliana Mazza Reis

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/4205679445626321>
 Última atualização do currículo em 27/01/2013

Doutoranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), onde desenvolve estudos de permeabilidade intestinal de fármacos utilizando o método de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA). Atualmente exerce a função de Coordenadora de P&D no Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, sendo responsável pela prospecção de novos candidatos a fármacos; seleção/interpretação de ensaios de screening e tomada de decisão hi-to-lead de moléculas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Juliana Mazza Reis
Nome em citações bibliográficas	REIS, Juliana Mazza; REIS, J.M.
Sexo	Feminino

Endereço

Endereço Profissional	Aché Laboratórios Farmacêuticos, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Rod. Presidente Dutra, km 222,2 Porto da Igreja 07034-904 - Guarulhos, SP - Brasil Telefone: (11) 26088661 URL da Homepage: www.ache.com.br
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2009	Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo. Título: Utilização da Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay - PAMPA) como ferramenta para predizer a fração de absorção in vivo de fármacos e sua correlação com a taxa de metabolização in vitro, Orientador: Cristina Helena dos Reis Serra. Palavras-chave: membrana artificial; PAMPA; permeabilidade intestinal; BDDCS; estabilidade metabólica. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO.
2002 - 2006	Graduação em Farmácia Industrial. Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.

Formação Complementar

2009 - 2009	PAMPA Advanced Training Course. (Carga horária: 30h). pION INC.
--------------------	--

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo.

Vínculo institucional

2009 - Atual

Vínculo: Aluna não-bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna não-bolsista, Carga horária: 12

Aché Laboratórios Farmacêuticos, ACHÉ, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Coordenadora de P&D, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2010 - 2012

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Analista Senior de P&D, Carga horária: 40

Outras informações

Atuação significativa no processo de patenteamento da primeira molécula análoga da companhia; prospecção de novos candidatos a fármacos; seleção/interpretação de ensaios de screening e tomada de decisão hi-to-lead de moléculas.

Vínculo institucional

2008 - 2010

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Analista Pleno de Processos de Produção, Carga horária: 40

Outras informações

Certificação Seis Sigma Green Belt com o aumento em 30% da robustez dos processos de fabricação de comprimidos; Certificação Seis Sigma White Belt com a redução em 45% da incidência de desvios de qualidade no processo produtivo; utilização cotidiana das ferramentas Seis Sigma: evento Kaizen, 5S e PDCA; supervisão de área e gestão de equipe; desenvolvimento e implantação de método de avaliação operacional por competências.

Vínculo institucional

2007 - 2008

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Trainee, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

job rotation pelas áreas estratégicas da companhia; acompanhamento e aprimoramento de competências com auxílio de consultoria especializada.

Medinfar Analítica Ltda.

Vínculo institucional

2006 - 2007

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Analista de desenvolvimento analítico, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Desenvolvimento de métodos para quantificação de fármacos utilizando técnicas de cromatografia (HPLC e CG) e espectrofotometria UV; definição de protocolos e realização de ensaios de equivalência farmacêutica de medicamentos genéricos

Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2006

Vínculo: monitoria voluntária, Enquadramento Funcional: monitor/pesquisador, Carga horária: 8

Outras informações

Laboratório de Farmacotécnica

Vínculo institucional

2003 - 2005

Vínculo: iniciação científica, Enquadramento Funcional: bolsista Cnpq, Carga horária: 20

Outras informações

Laboratório de Biologia Molecular

Atividades**3/2005 - 08/2006**

Estágios , Departamento de Farmacotécnica, Laboratório de Farmacotécnica I.

Estágio realizado
monitoria voluntária em Farmacotécnica.**Projetos de pesquisa****2009 - Atual**

Utilização da Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay - PAMPA) como ferramenta para prever a fração de absorção in vivo de fármacos

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Juliana Mazza Reis / - Coordenador.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

2005 - 2006Desenvolvimento de formulação fitoterápica a partir de extratos de *Dicksonia selowianus*

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Juliana Mazza Reis / - Integrante / Marilis Dallarmi Miguel - Coordenador.

2003 - 2006Isolamento e sequenciamento parcial do replicon de 630kpb de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissionalizante: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: Juliana Mazza Reis / - Integrante / Leda Satie Chubatsu - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Revisor de periódico**2012 - Atual**

Periódico: European Journal of Pharmaceutical Sciences

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Produção de medicamentos.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacotecnica.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmacotecnica/Especialidade: Desenvolvimento de formas farmacêuticas.

Idiomas**Inglês**

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Francês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. ★ **REIS, J.M.** ; DEZANI, A.B. ; PEREIRA, T.M. ; AVDEEF, A. ; SERRA, C.H.R. . Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutical Sciences JCR*, v. 00, p. 00, 2013.
2. DEZANI, ANDRÉ BERSANI ; PEREIRA, THAISA MARINHO ; CAFFARO, ARTHUR MASSABKI ; **REIS, Juliana Mazza** ; SERRA, CRISTINA HELENA DOS REIS . Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 00, p. 00, 2013.
3. ★ **REIS, Juliana Mazza** ; SINKO, B. ; SERRA, CH . Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is it Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction?. *Mini-Reviews in Medical Chemistry JCR*, v. 10, p. 1071-1076, 2010.

Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 1 | **SCOPUS** 2

Resumos publicados em anais de congressos

1. Silva, Marina de Freitas ; Paraíso, R.L.M. ; Silva Jr, J.B. ; **REIS, Juliana Mazza** ; Ferraz, H.G. ; Porta, V. ; SERRA, CH . Solubilidade de furosemda e da furosemda complexada a hidroxi-beta-ciclodextrina. In: *International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products*, 2011, Kobe, Japan. *International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products*, 2011.
2. **REIS, Juliana Mazza** ; SERRA, CH . Parallel Membrane Permeability Assay (PAMPA) optimization using Design of Experiments (DOE). In: *9º Physchem Forum*, 2010, Barcelona. *9º Physchem Forum*, 2010.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **REIS, Juliana Mazza** ; SERRA, CH . Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) optimization using Design of Experiments (DOE). 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. **REIS, Juliana Mazza** ; CHUBATSU, Leda Satie ; PEDROSO, F. . Isolamento e sequenciamento parcial do replicon de 630Kpb de *Azospirillum lipoferum* estirpe FP2. 2005. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Demais tipos de produção técnica

1. **REIS, J.M.** . Bases Farmacológicas para o Planejamento de Fármacos. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
2. **REIS, J.M.** . Regulação na Indústria Farmacêutica. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
3. **REIS, J.M.** . Bioequivalência e Equivalência Farmacêutica. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
4. ★ **REIS, Juliana Mazza** . Modelos in vivo e in vitro para predição da absorção intestinal de fármacos. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
5. ★ **REIS, Juliana Mazza** . Diosmin SDU - Aspectos Farmacotécnicos - Simpósio Internacional Diosmin, Mendoza, Argentina. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
6. **REIS, Juliana Mazza** ; CIARAMELLO, H. A. . Curso Seis Sigma White Belt - Ferramentas DMAIC para condução de projetos. 2009. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 8 World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.Membrane solvent screening for PAMPA studies. 2012. (Encontro).
2. 9º Physchem Forum.Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) optimization using Design of Experiments (DOE). 2010. (Simpósio).
3. 4º Encontro Nacional de Inovação em Fármacos e Medicamentos (ENIFARMED). 2010. (Encontro).
4. PAMPA Advanced Training Course. 2009. (Outra).
5. 13 Evento de Iniciação Científica (EVINCI).Sequenciamento parcial do replicon de 630kpb de *Azospirillum lipoferum* estirpe FP2. 2005. (Outra).
6. 12º Evento de iniciação Científica (EVINCI). 2004. (Outra).

ANEXO D

**Artigo publicado na revista
Mini-Reviews of Medicinal Chemistry**

Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) - Is it Better than Caco-2 for Human Passive Permeability Prediction?

J.M. Reis¹, B. Sinkó² and C.H.R. Serra^{*,1}

¹Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, Bl. 13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

²Institute of Pharmaceutical Chemistry, Semmelweis University, Högyes E.u.9., H-1092 Budapest, Hungary

Abstract: This review proposes a statistical and qualitative comparison between the main techniques derived from the original PAMPA method and experimental results obtained from Caco-2 and human jejunum. Among them, PAMPA techniques variations developed by some of the most renowned authors on the subject. The comparison is made from 16 common structurally diverse molecules, taking into account mainly membrane lipid composition and incubation conditions. A BCS classification prediction of the studied molecules was also possible to make. Finally, it was possible to raise and prove important previous hypotheses, aside from pointing out the best PAMPA model to predict human data.

Keywords: PAMPA, UWL, lipid composition, artificial membrane, BCS.

1. INTRODUCTION

The Biopharmaceutical Classification System (BCS), based on permeability and solubility properties of drugs has been proposed as a tool for developing new pharmaceutical formulations, with or without new drug molecules, aiming to assist in predicting its availability *in vivo*. According to the BCS, certain drugs can be considered for biowaivers, i.e. approving the product based on its *in vitro* dissolution rather than requiring bioequivalence studies in human subjects. As a result, unnecessary human experiments can be avoided and the costs of developing generic products can be significantly lowered [1]. To classify a drug according to the BCS, drug solubility, dose and permeability must be known. Therefore, accessing permeability is a crucial step in determining drug's site of administration.

Undoubtedly, there is a great need to implement high throughput and low cost models, which must have a good correlation with the permeability and absorption characteristics *in vivo*. Two of the most popular *in vitro* absorption/permeability models used today involve Caco-2 cells or Parallel Artificial Membrane Permeability Assays (PAMPA). Among the *in vitro* systems employed to predict oral bioavailability in humans, Caco-2 monolayers have been recognized as the best model in terms of throughput and reliability [2-8]. Even though this model expresses some important drug transporters and cell tight junctions, its use as a high throughput tool is limited by a long cell growth cycle and high implementation costs [9-12]. For that reason, artificial membrane has been investigated as an alternative model for GI membrane simulation [13-18].

The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), first introduced by Kansy *et al.* [19] offers a high

throughput approach to measure artificial membrane permeability and to assess drug absorption potential. Since the majority of drugs are absorbed primarily or partially through passive transport, the rate of permeation through a simple artificial membrane, which mimics passive transcellular transport, is likely to provide a good indication of a drug's absorption potential [15].

PAMPA was developed as a rapid, 96-well plate technology-based *in vitro* system for the evaluation of passive transcellular permeability [19]. Phosphatidylcholine (PC) has been used as a membrane constituent in the original Kansy's PAMPA system [12]. PAMPA studies are considered to be easier, faster and much less expensive than those involving Caco-2 cells. Indeed, a reliable numerical comparison between Caco-2 and PAMPA, based on a comparative study of rat *in situ* intestinal permeability of 17 fluoroquinolones resulted in an equally well prediction of *in vivo* data between PAMPA and Caco-2 [21].

One shortcoming of many *in vitro* studies examining drug permeability is that it lacks for standardization of protocols and many of the available literature on these important properties are not reliable or conclusive. In this regard, experimental attention to buffer pH, the use of serum proteins and co-solvents, the influence of the unstirred water layer and lipid composition are sometimes overlooked. This review will comment on the assay details of several PAMPA methods in terms of incubation conditions (pH and unstirred water layer) and it will focus mainly on lipid composition, which will be evaluated using the same molecules and compared with benchmark results using cells of Caco-2 and human jejunum. Furthermore, some suggestions for standardization of future trials will be made.

2. GENERAL ASSAY CONDITIONS

There are several parameters which may affect PAMPA results. In the donor compartment several authors applied different co-solvents, which make very low soluble com-

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, Bl. 13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil; Tel: +55 11 30913623; Fax: + 55 11 38154418; E-mail: chserra@usp.br

pounds measurable [22-25]. For blood transport simulation, surfactant compounds were suggested by Avdeef and co-workers [26] in the acceptor phase, as they are suggested to be able to keep low free compound concentrations (mostly in case of cationic charged forms).

The pH of both phases has a huge importance in case of ionizable compounds, as the uncharged form has 3-4 magnitudes higher permeability compared to charged form. For the reason of pH partition hypothesis, the effective permeability (P_e) depends on the applied pH in case of ionizable molecules. For that reason, once the pK_a value is known, it is possible to correct the results for unstirred water layer (UWL) effect and to calculate the intrinsic permeability (the permeability of the uncharged form) [27]. The acceptor pH is usually physiological blood pH, while the donor phase pH can be varied in wide range. For the UWL correction either multi pH experiments should be done or a well defined single pH measurement can be performed as described by Avdeef *et al.* (pK_a^{flux}) [27].

Although some authors have early considered the porosity ratio to calculate the membrane accessible filter area [28,29], Nielsen and Avdeef [30] incorporated the apparent porosity value, ϵ_a , into the PAMPA models, taking into account the existence of an increase in porosity of the filter due to an excess of lipid impregnation. This amelioration allowed the PAMPA results obtained from different filter porosity and different amounts of lipids to be compared on the same scale [30].

2.1. Unstirred Water Layer - When it is a Real Limit Factor

According to Thomson *et al.* [31], the Unstirred Water Layer (UWL) or Aqueous Boundary Layer (ABL) is a more or less stagnant layer of water, mucus, and glycocalyx adjacent to the intestinal wall that is created by incomplete mixing of the luminal contents near the intestinal mucosal surface and can function as a barrier of absorption. The same effect appears in various permeability measurements like black lipid membrane models [32,33], artificial membrane models [23] *in vitro* cellular models [34,35], rat intestine [36,37], and human jejunum [38]. The thickness of the UWL has been estimated to be 1462 μm in PAMPA [22], 1544 μm in CaCo-2 [34], and 30-100 μm in the gastrointestinal tract [38].

In 2001, Wohnsland and Faller [28] showed that the permeability of propranolol was 40% less than that of metoprolol, even though propranolol being 40 times more lipophilic than metoprolol, which proves that, for highly lipophilic compounds, the rate-limiting barrier to transport is the UWL. In the literature, numerous techniques have been published to lower the effect of UWL [22,28,29,39]. Avdeef *et al.* [22] presented a new type of magnetic plate stirrer, which is able to rotate small orbital stir disk in every single well and reduce the thickness of the UWL till 13 μm in some cases. Applying the consideration of Adson *et al.* [40], they also stated that orbital plate shakers are unable to stir the bottom (donor) phase because the effect is dampened by the confined space over this plate [22]. Three possible calculations have been described for the correction of UWL. The

traditional way has been to perform the Caco-2 assay at several different stirring speeds, in the range of 100-1000 rpm, besides from applying a hydrodynamic equation to extract cellular from apparent permeability coefficients [34,40,41]. Another technique, which is an extension of the Gutknecht procedure [33], called the pK_a^{flux} method, has been described by Ruell *et al.* [29], and applies the pH partition hypothesis. The third applies results obtained from lipid-free PAMPA experiments as UWL limit [23].

Despite the precise description of the importance of UWL by lot of authors [22,27,28,30,42] some authors have obtained acceptable results even disregarding the UWL effect. Investigation of the unstirred assays incubation parameters show that some of them [20] apply higher temperature, which may affect the UWL thickness, while other uses orbital plate shakers [15] which can have a slight UWL thickness decreasing effect. The reason for the good results among unstirred assays also can be explained by the pH of the acceptor and donor compartments. Regarding the pH partition hypothesis, at pHs where the molecules are mostly ionized and the effective permeability is low, the permeability through the membrane is the rate-limiting step of the process [27]. As numerous drugs are weak acids or weak bases, at the most commonly applied pH (around 6.5) they are in their charged form without being rate-limited by the UWL. If these results are compared to data obtained from Caco-2 experiments at the same pH without UWL correction or human jejunum data, the found correlation can be excellent.

In 2009, Scherrer [43] published a paper in which he presumed that the so-called UWL phenomenon described above is not (or not only) because of a sticky water layer. He suggested a theory where the pK_a^{flux} is the pK_a of the molecule in the transition state, which can be described by a state along the molecules path to the membrane, from which it is as likely to continue on, as it is to return to the donor phase. Along this path the UWL is not supposed to exist [43]. The suggestion described above is based on facts proved on the field of octanol-water partitioning (especially ion-pair partitioning), but not on the field of membrane permeability. As the UWL effect is widely described in all kinds of permeability measurements, the sticky water layer still looks to be responsible for the UWL phenomenon, though the above mentioned theory needs further investigations.

It can be concluded that the UWL effect is a phenomenon which can be treated easily using the appropriate experimental parameters (multi pH, stirring) and calculations. Treating the measured data can improve the quality of the results, especially if a differentiation should be made among high permeable drugs. Controversially, a reasonable correlation have been achieved by some authors [20,44,45] without UWL correction, in which cases the above mentioned criteria may give a possible explanation.

2.2. Lipid Composition

Early attempts have suggested that the lipid composition in the intestinal membrane could be a factor to regulate the fluidity of the membrane and thereby affect the transcellular transport characteristics [46,47]. Studies with rodent small

intestine have indicated that phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine account for 60-70% of the total composition of intestinal membrane. Furthermore, fluidity is supposed to be controlled to a great extent by the degree of unsaturation of acyl chains and the relative proportion of cholesterol [48].

During PAMPA experiments, useful considerations on lipid composition impacts could be pointed out. Seo *et al.* [49] investigated the role of PAMPA lipid composition on the permeability of five model compounds and their results indicated that compound permeability across PAMPA differed in their sensitivity to membrane lipid composition, as compounds with appreciable permeability (i.e. at least 0.2×10^{-6} cm/s) were possibly sensitive to membrane fluidity and apparent ion pair effects. These results are compatible with Carrara and co workers [50] findings, who performed studies using a data set of 19 compounds and a validation set of 15 compounds and showed that permeability is mostly dependent on the percentage of dodecane and the effect of phospholipids is relevant only for compounds with a medium permeability value (50–100 nm/s). Furthermore, compound permeability was lowest across the phosphatidylcholines, which is consistent with this phospholipid exhibiting relatively high membrane rigidity. In contrast to results from phosphatidylethanolamines and phosphatidylserines, acyl chain unsaturation had no effect on permeability across phosphatidylcholines [49]. Corti *et al.* [51] studied the variations in the lipidic phase and its effect in drug permeability using a n-octanol–Lipoid® E 80-cholesterol ternary mixture. Likely previous studies, it was hypothesized that higher amounts of lipid phase impregnated into the support corresponded to lower drug Papp values by the presence of a thicker diffusion layer which reduces the drug permeation rate [51].

In order to separate active and passive components of cellular permeability, Dagenais and co-workers developed the in combo PAMPA, where a hybrid combination of in silico and *in vitro* methods was made [52]. Another improvement has recently drawn considerable attention. A novel procedure for preparation of artificial membrane suggested the formation of a lipid/oil/lipid tri-layer and showed to reduce the mass retention of highly retained compounds reported in previous studies. Moreover, the lipid/oil/lipid layer - which can also be called as Tri-layer membrane PAMPA- proved to reduce the amount of compounds retention in the membrane, by replacing long chain solvents by volatile solvents [44]

In the present work a comparison between different variations of the PAMPA original method was made, in an attempt to find the model which best correlates with human results and, thus, to point out the method of choice for future experiments. The choice of methods for comparison in this study was based on the most referenced authors in the subject who used the same molecules in their studies.

3. PAMPA DATA EVALUATION

The following PAMPA methods results were obtained from literature: a) Tri-layer membrane PAMPA [44]; b) Bio-mimetic PAMPA [20]; c) 10% Lecithin PAMPA [53]; d) 1% Lecithin PAMPA [15]; and e) in combo PAMPA [52]. Each assay condition varies mainly on its lipid composition and their detailed description can be found at Table 1. Furthermore, each particular technique was compared with human jejunum and Caco-2 experimental data found in literature and the results are shown at Table 2.

Firstly, the permeability results obtained from the different PAMPA methods (Table 2) were statistically compared to the standard human jejunum effective permeability (P_{eff})

Table 1. PAMPA Methods Descriptions

Method	Lipid composition	Incubation	References
Tri-layer membrane PAMPA	Hexadecane, phospholipids mixture and hexane, in a try-layer configuration	Room temperature; without agitation; 4 to 5h	[44]
Bio-Mimetic PAMPA	PC (0.8%)/PE (0.8%)/PS (0.2%)/PI (0.2%)/CHO (1.0%)/1,7-octadiene (97.0%)	30°C; without agitation; 2 or 15h	[20]
10% Egg Lecithin PAMPA	10% lecithin in 1,9-decadiene	25°C; without agitation; 2, 5 or 24h	[53]
1% Egg Lecithin PAMPA	1% egg lecithin in n-dodecane	Room Temperature; gentle circular shaking; 2h	[15]
in combo PAMPA	20% (w/v) alkane solution of a lecithin mixture containing an excess of negatively charged constituents	Room temperature, individual magnetic stirring, 30 min or 15h	[52]

PC = phosphatidylcholine.
 PE=phosphatidylethanolamine.
 PS = phosphatidylserine.
 PI = phosphatidylinositol.
 CHO = cholesterol.

Table 2. Permeability Results from Different PAMPA Methods (Results are Expressed in 10^{-6} cm/s) Considering 16 Structurally Different Drugs

Compounds	Perm. Class. ^a	logD pH 7.4 ^b	Human jejunum Peff ($\times 10^{-6}$ cm/s) ^c	Caco-2 Peff ($\times 10^{-6}$ cm/s) ^d	Peff ($\times 10^{-6}$ cm/s)				
					In combo PAMPA ^e	Tri-layer membrane PAMPA ^f	10% Egg Lecithin PAMPA ^g	Bio-mimetic PAMPA ^h	1% Egg Lecithin PAMPA ^d
Amiloride	H	-0.86	162.18		4.47	0.08		32.36	0.00
Antipyrine		0.56	446.68	28.2	10.23	7.59	2.88	181.97	20.42
Atenolol	L	-2.01	19.95	0.20	2.75	0.10		2.19	0.10
Carbamazepine	H	2.45	426.58		147.91	9.55		645.65	12.02
Cimetidine	L	0.34	30.20	0.74	3.31			5.50	0.00
Desipramine		1.38	436.52	21.6	239.88	8.71	16.98	295.12	14.45
Furosemide	L	-0.24	5.01	0.12	5.25	0.47	0.34	8.32	0.60
HTZ	L	-0.18	3.98	0.51	1.82	0.09	0.20	3.55	0.10
Ketoprofen	H	-0.11	831.76		177.83	4.17	2.82	588.84	19.05
Metoprolol	H	-0.24	128.82	23.7	4.57	4.27	7.94	67.61	3.47
Naproxen		0.09	831.76	39.5	371.54	6.03	5.01	645.65	24.55
Piroxicam		0.00	724.44	35.6	194.98	5.01	10.96	602.56	8.51
Propranolol	H	1.41	309.03	41.9	72.44		26.30	354.81	2344
Ranitidine	L	-0.53	27.54	0.49	0.87	0.45	0.89	4.27	0.50
Terbutaline		-1.35	30.20	0.38	4.79	0.47		5.25	0.10
Verapamil	H	2.51	676.08		120.23	8.91	22.91	489.78	9.77

^aExtracted from [11].^bExtracted from [55].^cExtracted from [24,54].^dExtracted from [15].^eExtracted from [52].^fExtracted from [44].^gExtracted from [53].^hExtracted from [54].

HTZ = Hydrochlorothiazide.

Perm. Class. = Permeability Classification.

values, and the following logarithmic correlation coefficients (r^2) were obtained: 0.53 (10% Egg Lecithin PAMPA); 0.70 (Tri-layer membrane PAMPA); 0.72 (1% Lecithin PAMPA); 0.77 (in combo PAMPA); and 0.87 (Bio-mimetic PAMPA). Sugano *et al.* considered a prediction for paracellular pathway using Renkin function to construct their Bio-mimetic PAMPA model. The Renkin function is the dimensionless molecular sieving function for cylindrical channels. The aqueous diffusivities of charged permeants are equivalent to those of uncharged species in a medium of sufficiently high ionic strength. The product is the effective diffusion coefficient for the filter pore, which compares the compounds molecular radius with the filter pore radius [54]. This can be a possible explanation for the better correlation when compared with the other methods.

Likewise, it can be concluded that the 1% Lecithin and the Tri-layer membrane PAMPA methods can equally predict the human reference results, which proves that a more complex protocol for preparing a multi-layer system is not

needed. Furthermore, due to the better prediction using the 1% Lecithin when compared to the 10% Lecithin PAMPA method, it can be suggested that an increase in the concentration of phospholipids adversely affects the human permeability prediction. This suggestion confirms the statement that an excess of lecithin can show very high membrane retention, in some cases preventing the assessment of permeability by UV spectrophotometry [27].

Comparing the correlation of the high lipophilic molecules it can be observed that the methods which correct the results for UWL [20,52] has a much better correlation with human jejunum Peff compared to those which do not corrected it. This can be explained by the observation that the uncharged forms of high lipophilic compounds are rate-limited by the aqueous boundary layer and not by their membrane permeability.

A statistical logarithmic correlation between human P_{eff} and Caco-2 resulted in a coefficient of 0.73, which shows that, although Caco-2 is suggested to reliably predict the

human data [2-8] its correlation was lower than those found in in combo [52] and Bio-mimetic PAMPA [54] methods. This finding reinforces the fact that PAMPA methods which consider both phospholipid mixture membrane impregnation and in silico approach is as good as (or better than) Caco-2 for the prediction of passive permeability from structurally diverse compounds.

Except for amiloride, the majority of the methods were able to predict the BCS classification of all compounds included in this study. Christel *et al.* [56] has suggested that amiloride has high permeability and an intermediate solubility, so they suggested that it fits in a BCS classification called V. Its fraction of absorbed dose in humans (FA%) results is also controversial between different authors, where most of them consider that amiloride has a FA% of 50 [15,28,29,44,54] and other mention a value of 80-90% [57]. For that reason, amiloride can be considered a molecule which is not easy to predict.

Finally, a correlation between both PAMPA (i.e. Bio-Mimetic PAMPA) and LogD o/w pH 7.4 and human jejunum and LogD o/w (also in pH 7.4) was calculated. The coefficients obtained were 0.36 and 0.29, respectively. These results are in disagreement with those stated by Galinis-Luciani *et al.* [58] who affirmed that PAMPA effective permeability and measured octanol-water partition coefficients at pH 7.4 correlated well. This concern was previously criticized by Avdeef and co-workers [24], who showed a study based on 237 compounds, where the regression standard deviations in PAMPA versus octanol-water partition coefficients could be as high as 1.6 log units.

CONCLUSION AND OUTLOOK

In more than 10 years past numerous different PAMPA models have been published for the intestinal absorption prediction. In this study we proved that *in vitro* models which consider a phospholipid mixture including the main lipid species from the human jejunum constitution and combined with in silico calculations are able to predict passive human jejunum permeability results better or, sometimes, equally good as Caco-2 measurements do. Because of its much lower cost and high standardization potential, PAMPA is a useful tool for early stages of drug discovery and also can be able to replace difficult and expensive Caco-2 results in passive permeability measurements. A standardization of the PAMPA methods which showed the best correlations in this work could be considered for further studies.

REFERENCES

- [1] Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 58, 265-278.
- [2] Karlsson, J.; Artursson, P. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *Int. J. Pharm.*, 1991, 71, 55-64.
- [3] Adson, A.; Burton, P.S.; Raub, T.J.; Barsuhn, C.L.; Audus, K.L.; Ho, N. F. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *J. Pharm. Sci.*, 1995, 84, 1197-1204.
- [4] Caldwell, G.; Masucci, J.; Evangelisto, M.; White, R. Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine: Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug-membrane interactions. *J. Chromatogr. A.*, 1998, 800, 161-169.
- [5] Stenberg, P.; Norinder, U.; Luthman, K.; Artursson, P. Experimental and Computational Screening Models for the Prediction of Intestinal Drug Absorption. *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 1927-1937.
- [6] Fossati, L.; Dechaume, R.; Hardillier, E.; Chevillon, D.; Prevost, C.; Bolze, S.; Maubon, N. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.*, 2008, 360, 148-155.
- [7] Tian, X.; Yang, X.; Yang, X.; Wang, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int. J. Pharm.*, 2009, 367, 58-64.
- [8] Siissalo, S.; Laine, L.; Tolonen, A.; Kaukonen, A.; Finel, M.; Hirvonen, J. Caco-2 cell monolayers as a tool to study simultaneous phase II metabolism and metabolite efflux of indomethacin, paracetamol and 1-naphthol. *Int. J. Pharm.*, 2010, 383, 24-29.
- [9] Bohets, H.; Annaert, P.; Mannens, G.; Beijsterveldt, L.; Anciaux, K.; Verboven, P.; Meuldermans, W.; Lavrijsen, K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr. Top Med. Chem.*, 2001, 1, 367-383.
- [10] Balimane, P.; Han, Y.; Chong, S. Current Industrial Practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction. *AAPS J.*, 2006, 8, E1-E13.
- [11] Eide, G.; Anand, F.; Dhanikulaa, B.; Luthman, K.; Brandl, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, 27, 80-90.
- [12] Verma, R.; Hansch, C.; Selassie, C. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2007, 21, 3-22.
- [13] Camenisch, G.; Folkers, G.; Waterbeemd, H. Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes. *Int. J. Pharm.*, 1997, 147, 61-70.
- [14] Sugawara, Y.; Umezawa, H.; Sato, H.; Hakamada, Y.; Yamazaki, M.; Uto, M.; Ionophore incorporated bilayer lipid membranes that selectively respond to metal ions and induce membrane permeability changes. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13, 1035-1046.
- [15] Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T.M.; Hwang, K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.*, 2002, 37, 399-407.
- [16] Kotecha, J.; Shah, S.; Rathod, I.; Subbaiah, G. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *Int. J. Pharm.*, 2007, 333, 127-135.
- [17] Sugano, K. Artificial membrane technologies to assess transfer and permeation of drugs in drug discovery. *Compr. Med. Chem.*, 2007, 2, 453-487.
- [18] Sugano, K. Estimation of effective intestinal membrane permeability considering bile micelle solubilisation. *Int. J. Pharm.*, 2009, 368, 116-122.
- [19] Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 1007-1010.
- [20] Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H.; Saitoh, K.; Terada, K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *Int. J. Pharm.*, 2001, 228, 181-188.
- [21] Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J.A.; Tsinman, O.; González, L.; Fernández, C.; Sánchez, G.; Garrigues, T.M.; Merino, V. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *J. Pharm. Sci.*, 2004, 21, 429-441.
- [22] Avdeef, A.; Nielsen, P.; Tsinman, O. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 11. Matching the *in vivo* unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 22, 365-374.
- [23] Kansy, M.; Avdeef, A.; Fischer, H. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discov. Today: Tech.*, 2004, 1, 349-355.
- [24] Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Faller, B.; Kansy, M.; Sugano, K.; Yamauchi, Y. PAMPA- Critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.*, 2007, 96, 2893-2909.

- [25] Dreassi, E.; Zizzari, A.; Falchi, F.; Schenone, S.; Santucci, A.; Maga, G.; Botta, M. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, 44, 3712-3717.
- [26] Avdeef, A.; Artursson, P.; Neuhoﬀ, S.; Lazorova, L.; Grasjo, J.; Tavelin, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24, 333-349.
- [27] Avdeef, A. *Absorption and Drug Development*, Wiley-Interscience: New York, 2003, pp. 116-246.
- [28] Wohnsland, F.; Faller, B. High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water log P with Artificial Membranes. *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 923-993.
- [29] Ruell, J.; Tsinman, K.; Avdeef, A. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa flux - optimized design (pOD-PAMPA). *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, 20, 393-402.
- [30] Nielsen, P.; Avdeef, A. PAMPA—a drug absorption *in vitro* model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 22, 33-41.
- [31] Thomson, A.; Hotke, C.; O'Brien, B.; Weinstein, W. Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animals species and man: Role of unstirred water layer and bile salt micelle. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 1983, 75, 221-232.
- [32] Gutknecht, J.; Tosteson, F. Diffusion of weak acids across lipid membranes: effects of chemical reactions in the unstirred layers. *Sci.*, 1973, 182, 1258-1261.
- [33] Walter, A.; Gutknecht, J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.*, 1984, 77, 255-264.
- [34] Karlsson, J.; Artursson, P. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *Int. J. Pharm.*, 1991, 71, 55-64.
- [35] Ho, N.F.; Raub, T.; Burton, P.; Barsuhn, C.; Adson, A.; Audus, K.; Borchardt, R. *Quantitative approaches to delineate passive transport mechanisms in cell culture monolayers*. Marcel Dekker: New York, 1999, pp. 219-317.
- [36] Levitt, M.; Fume, J.K.; Strocchi, A.; Anderson, B. W.; Levitt, D.G. Physiological measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. *J. Clin. Invest.*, 1990, 86, 1540-1547.
- [37] Anderson, B.W.; Levine, A.S.; Levitt, D.G.; Kneip, J.M.; Levitt, M.D. Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 1988, 254, 843-848.
- [38] Lennernas, H. Human Intestinal Permeability. *J. Pharm. Sci.*, 1998, 87, 403-410.
- [39] Sugano, K. Possible reduction of effective thickness of intestinal unstirred water layer by particle drifting effect. *Int. J. Pharm.*, 2010, 387, 103-109.
- [40] Adson, A.; Burton, P.; Raub, T.; Barsuhn, C.; Audus, K.; Ho, N.F. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *J. Pharm. Sci.*, 1995, 84, 1197-1204.
- [41] Palm, K.; Luthman, K.; Ros, J.; Grasjo, J.; Artursson, P. Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991, 291, 435-443.
- [42] Sugano, K.; Takata, N.; Machida, M.; Saitoh, K.; Terada, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int. J. Pharm.*, 2002, 241, 241-251.
- [43] Scherrer, R. The unstirred water layer is unstirred because it does not exist. *Chem. Biodivers.*, 2009, 6, 1917-1922.
- [44] Chen, X.; Murawski, A.; Patel, K.; Crespi, C.L.; Balimane, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm. Res.*, 2007, 25, 1511-1520.
- [45] Fischer, H.; Kansy, M.; Avdeef, A.; Senner, F. Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes—Influence of physico-chemical properties. *J. Pharm. Sci.*, 2007, 31, 32-42.
- [46] Meddings, J.B.; Theisen, S. Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256, 931-940.
- [47] Brasitus, T.A.; Schachter, D. Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membranes. Regional differences. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 774, 138-146.
- [48] Proulx, P. Structure-function relationships in intestinal brush border Membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1071, 255-271.
- [49] Seo, P.R.; Teksin, Z.S.; Kao, J.P.; Polli, J.E. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *J. Pharm. Sci.*, 2006, 29, 259-268.
- [50] Carrara, S.; Reali, V.; Misiano, P.; Dondio, G.; Bigogno, C. Evaluation of *in vitro* brain penetration: Optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. *Int. J. Pharm.*, 2007, 345, 125-133.
- [51] Corti, G.; Maestrelli, F.; Cirri, M.; Zerrouk, N.; Mura, P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the methods suitability. *J. Pharm. Sci.*, 2006, 27, 354-362.
- [52] Dagenais, C.; Avdeef, A.; Tsinman, O.; Dudley, A.; Beliveau, R. P-glycoprotein deficient mouse *in situ* blood-brain barrier permeability and its prediction using an *in vitro* PAMPA model. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, 38, 121-137.
- [53] Fugikawa, M.; Ano, R.; Nakao, K.; Shimizu, R.; Akamatsu, M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 4721-4732.
- [54] Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Aso, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.*, 2003, 257, 245-251.
- [55] Avdeef, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability, and charge state). *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001, 1, 277-351.
- [56] Christel, A. S.; Bergstro, M.; Strafford, M.; Lazorova, L.; Avdeef, A.; Luthman, K.; Artursson, P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 558-570.
- [57] Lennernas, H.; Knutson, L.; Knutson, T.; Hussain, A.; Lesko, L.; Salmonson, T.; Amidon, G.L. The effect of amiloride on the *in vivo* effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002, 15, 271-277.
- [58] Galinis-Luciani, D.; Nguyen, L.; M.; Yazdani. Is PAMPA a useful tool for discovery? *J. Pharm. Sci.*, 2007, 96, 2886-2892.

ANEXO E

**Artigo aceito para publicação na revista
European Journal of Pharmaceutical Sciences**

Date: 17/12/2012
To: "Juliana Reis" juliana.reis@ache.com.br,ju_gene@hotmail.com
From: "European Journal of Pharmaceutical Sciences" ejps@sdu.dk
Subject: Your Submission

Ref.: Ms. No. EJPS-D-12-00463R2
 Lamivudine permeability study: a comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum
 European Journal of Pharmaceutical Sciences

Dear Mrs. Juliana Reis,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in European Journal of Pharmaceutical Sciences.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Martin Brandl, Dr. rer. nat. habil
 Editor In Chief
 European Journal of Pharmaceutical Sciences

Comments from the Editors and Reviewers:

Reviewer #3: As requested, the authors introduced a discussion dealing with an unexpected finding regarding PAMPA assays, providing plausible hypothesis for their observation. They state that further identification of the phenomena involved will be matter of future work.

Reviewer #5: Dear Prof. Brandl,
 Critically perusing the manuscript and also reviewers' comments and authors' answers, I think the present form of this paper is acceptable for publication. The study shows main mechanism of intestinal absorption (carrier mediated way) but also denotes complete permeability profile (mild paracellular and significant ABL limited contribution) of the anti HIV drug lamivudine by different in vitro and ex vivo model systems. However, in previous status of the manuscript contained several critical points which were noted by reviewers (primarily Rev. # 3), most of them were corrected or clarified by authors.

Yours sincerely,

George T. Balogh

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum

Q1 J.M. Reis^{a,1}, A.B. Dezan^a, T.M. Pereira^a, A. Avdeef^b, C.H.R. Serra^{a,*}

^a Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, 580 Prof. Lineu Prestes Av., Bl. 13, 05508-900 São Paulo, Brazil
^b in-ADME Research, 20 Second St., Cambridge, MA 02141, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2012

Received in revised form 27 November 2012

Accepted 17 December 2012

Available online xxxx

Keywords:

Permeability

Lamivudine

PAMPA

In situ perfusion

Franz cell

Jejunum *ex vivo*

ABSTRACT

In order to reach the bloodstream and thus the target receptor, an orally-administered drug must first cross the intestinal barrier, which can occur via a paracellular, passive transcellular, or carrier-mediated uptake and/or efflux process (active or concentration gradient-driven). Our work aimed to explore the transport mechanism of the antiretroviral lamivudine (deoxycytidine nucleoside analogue), using a tri-compartmental strategy: *in vitro*, an *ex vivo* and an *in situ* method, represented by PAMPA, rat jejunum patches and rat Single Pass Intestinal Perfusion (SPIP), respectively. The determined permeability coefficients were compared with those from a published Caco-2 and MDCK study. Computational prediction of human jejunal permeability was explored, using various non-human permeability coefficients as descriptors. The *ex vivo* technique was performed in Franz-type diffusion cells, mounted with male Wistar rat jejunum segment patches. PAMPA was performed with an acceptor solution simulating the binding of serum proteins, an artificial membrane impregnated with egg lecithin/cholesterol and a gradient of pH between donor and acceptor solutions. The SPIP was conducted by proximal jejunum cannulation and drug perfusion in a constant flow rate of 0.2 mL/min. The outcomes of our studies showed the following predicted pattern for lamivudine effective jejunal permeability: $P_{eff}^{Caco-2} > P_{eff}^{SPIP} > P_{eff}^{ex vivo} > P_{Caco-2} \approx P_{MDCK} \approx P_{PAMPA}$, strongly suggesting that this compound has carrier-mediated uptake as its dominant transport mechanism. Notwithstanding, Caco-2 cells may indicate an under-expression of uptake transporters and possibly an over-expression efflux transporters, compared to that found in the rat jejunum.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

Q3

1. Introduction

Identifying compounds with sufficient membrane permeability is an important goal during lead optimization of new chemical entities (Li et al., 2008). Following oral administration, a dissolved drug may cross the intestinal barrier by a single or a combination of several pathways, including passive paracellular diffusion, passive transcellular diffusion, and/or carrier-mediated uptake/efflux (active or concentration gradient-driven), before entering systemic circulation (Fujikawa et al., 2005; Shugarts and Benet, 2009).

There are many known uptake transporters, whose substrates include amino acids, peptides, and nucleosides. Efflux transporters include the well-studied P-glycoprotein (P-gp), which is responsible for secreting drugs out of the cell (Kim and Benet, 2004). P-gp substrates are generally hydrophobic molecules, often cationic (Giacomini et al., 2010). Other efflux transporters comprise multi-drug resistance proteins (MRPs) and breast cancer-related protein (BCRP) (Chan et al., 2004; Quevedo et al., 2011).

Current approaches to characterize drug permeability draw on various models: octanol–water partition coefficients, artificial membrane permeability, *ex vivo/in vitro* (tissue- or cultured cell-based), *in situ* and *in vivo* intestinal perfusion, as well as *in silico* methods (Bohets et al., 2001).

The established *in vitro* permeability assay in pharmaceutical research is based on cellular monolayer systems, such as Caco-2 and MDCK. The Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) has evolved as an adjunct to the cellular methods (Kansy et al., 1998). PAMPA is a low-cost, high-throughput permeability method. Since the majority of drugs are thought to be absorbed primarily or partially by passive transport, the rate of permeation through a simple artificial membrane is likely to provide an indication of a drug's absorption potential (Kansy et al., 1998; Balimane et al., 2000; Avdeef et al., 2005; Fujikawa et al., 2005; Masungi et al., 2008; Li et al., 2008; Nirasay et al., 2011; Buckley et al., 2012).

Ex vivo assays using excised rat intestinal segment patches have the advantage of expressing the vast majority of influx and efflux transporters found *in vivo*. Rat intestinal segment patches can be used to establish correlation between rats and humans (Tukker, 2000; Trapani et al., 2004; Zakelj et al., 2006; Cao et al., 2008; Pretorius and Bouic, 2009). Models which employ vertical

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418.
 E-mail addresses: ju_gene@hotmail.com (J.M. Reis), chserra@usp.br (C.H.R. Serra).

¹ Tel.: +55 11 87825524.

diffusion chambers, such as Franz cells, are widely used in skin permeation studies (Lopez et al., 2000; Ropke et al., 2002; Heraia et al., 2007). However, there are few studies of drug intestinal permeability using such apparatus (Nicolazzo and Finnin, 2008; Rajpal et al., 2009).

The *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) involves perfusion of drug solution through isolated cannulated intestinal segments in the proximal portion at constant flow. Samples are collected from distal portion at regular intervals (Balimane et al., 2000; Komiya et al., 1980). Absorption is assessed based on the drug's disappearance from the perfused intestinal segment. The concentration difference of the inlet and outlet flow is used to calculate the permeability (Balimane et al., 2000; Sutton et al., 2001; Cook and Shenoy, 2003; Volpe, 2010).

Lamivudine is a deoxycytidine nucleoside analogue that inhibits viral replication and is used both in the treatment of chronic hepatitis B infection and (in association with zidovudine) in treatment of HIV (Chimalakonda et al., 2007). Lamivudine is a white crystalline solid (mp 160–162 °C) with saturation solubility (20 °C) of 70 mg/mL in distilled water and a reported pKa of 4.3 (Pereira et al., 2007). Despite lamivudine being quite polar, with an octanol–water log *P* = −1.44 (GSK Material Safety Data Sheet, 8/27/99), it is well absorbed. Oral bioavailability of lamivudine is reported to be between 80% and 88% (Li and Chan, 1999; Abraham et al., 2002; Kano et al., 2005; Kuo and Chen, 2006). Only about 5–10% of 3TC is metabolized to the pharmacologically inactive trans-sulfoxide metabolite and excreted via the kidneys (Strauch et al., 2011). The majority of lamivudine (approximately 70%) is eliminated unchanged in the urine via the organic cationic transport system, and its elimination is primarily via the kidneys (70%), with minimal hepatic metabolism (Li and Chan, 1999; Strauch et al., 2011).

Although lamivudine is widely used, there are few studies of its intestinal transport mechanism. Lindenberg et al. (2004) described a Biopharmaceutic Classification System (BCS) analysis, but the designation of lamivudine was inconclusive. Whether it is a BCS class I or III could not be decided in the absence of a better understanding of the permeability mechanism. Later, a correlation study between *in vitro* uptake methods and human absorption hypothesized an active Na⁺ dependent carrier transport for lamivudine (Oulianova et al., 2007). Table 1 summarizes the currently studied transporters related to lamivudine absorption.

This study aims at exploring lamivudine mechanism of transport using a combination of PAMPA, *ex vivo* assay in rat jejunum using Franz-cell chamber and rat jejunum *in situ* SPIP. The results are compared to published *in vitro* cellular data (Souza et al., 2009) and extrapolated to human intestinal permeability using a computational model (Avdeef and Tam, 2010).

2. Experimental methods and calculation

2.1. Chemicals

Lamivudine used in this study was generously donated by FURP (São Paulo, Brazil), and used as received. Metoprolol, ranitidine, fluorescein, brilliant cresyl blue and lucifer yellow were purchased

from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). PAMPA protocol followed the original method proposed by Kansy et al. (1998) with some modifications, and it will be called here as “CHO-Lecithin” model. Egg lecithin 60% grade and cholesterol (CHO) were both purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), and were stored at −20 °C when not used. The 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 in PAMPA donor compartment was prepared with NaH₂PO₄, KH₂PO₄ and NaOH from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The acceptor solution consisted of 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 0.5% (w/v) glycocholic acid, to simulate the binding of serum proteins. The donor compartment was divided into the following pH values and respective compositions: 3.0 and 4.5 (10 mM citric acid, adjusted with 1 M NaOH); 6.0 and 7.4 (10 mM phosphate, adjusted accordingly); and 9.0 (sodium tetraborate). All the reagents used for acceptor and donor solutions were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Pampa

The donor 96-well microtitre plate (MAIPN4550) and the acceptor 96-well filter plate (MATRNPS50, 125 μm thick filters, 0.45 μm pores) were from Millipore. Samples and markers were diluted from a stock solution in DMSO to a final concentration of 100 μM. CHO-Lecithin model was performed as follows: an amount of 200 μL from the diluted samples was transferred to the donor compartment, containing a pH gradient (3.0, 4.5, 6.0, 7.4 and 9.0). In the acceptor compartments, the PVDF membranes were coated with 5 μL of a phospholipid mixture containing 10% (w/v) egg lecithin and 5% (w/v) cholesterol (CHO), prior to the addition of 200 μL of acceptor solution, prepared with 0.5% (w/v) glycocholic acid in pH7.4 phosphate buffer, into each well.

The donor–acceptor sandwich was formed and allowed to incubate for 15 h in a sealed box under constant humidity, no agitation and temperature of 37 °C. After incubation, the acceptor solutions were sampled and assayed against the initial donor solution concentrations by a multi-wavelength UV plate reader (Tecan Infinite M200) in a range of 250–500 nm with 10 nm intervals.

The donor-to-acceptor effective permeability, *P_e*, was calculated as (Avdeef, 2003)

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A \cdot (t - \tau_{ss}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_V} \right) \cdot \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1 + r_V^{-1}}{1 - R_M} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \quad (1)$$

The aqueous volume ratio is $r_V = V_D/V_A$ (typically ≈ 1 in PAMPA), where the donor- and acceptor-well volumes (0.200 cm³) are *V_D* and *V_A*, respectively. The membrane area is *A* (0.3 cm²). The apparent filter porosity is $\varepsilon_a = 0.76$ (Nielsen and Avdeef, 2004). The sample concentrations (mol/cm³) in the donor well at time *t* = 0 and the acceptor well at time = *t* (s) are *C_D*(0) and *C_A*(*t*), respectively. *R_M* (values from 0 to 1) is the mole fraction of sample ‘lost’ to the membrane, defined in mole (m) units as:

$$R_M = 1 - \left(\frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}} \right) - \left(\frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}} \right) \quad (2)$$

Table 1
List of active and efflux carriers that may interact with lamivudine (3TC).

3TC as substrate	3TC as inhibitor	Ref.
breast cancer-related protein (BCRP)		Takano et al., 2006
Organic anion transporting polypeptide (OAT1)		Wada et al., 2000; Dobson et al., 2008
Organic cation transporter (OCT)	Multi-drug resistance proteins (MRP)	Varatharajan and Thomas, 2009; Minuesa et al., 2009
P-glycoprotein (P-gp)		Souza et al., 2009; Pal et al., 2010

Please cite this article in press as: Reis, J.M., et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. Eur. J. Pharm. Sci. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.025>

The steady-state time needed to saturate the membrane with solute, τ_{ss} , was estimated as $(54 R_M + 1)$ **60 s** (Avdeef, 2003).

In order to ensure membrane integrity, an evaluation using the markers brilliant cresyl blue (high permeability) and lucifer yellow (low permeability) was done right after PAMPA experiments (as suggested in PC1545EN00 from Millipore, 2005).

2.3. Animals

Rats (male Wistar) weighing **250–300 g** were treated under a protocol approved by University Ethics Committee (Ethics Committee on Animal Experimentation of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil) for both *ex vivo* and *in situ* assays, under the protocol numbers 180 and 235, respectively. Before each experiment, rats were fasted for 18 and 12 **h** (*ex vivo* and *in situ*, respectively) with free access to water (Langguth et al., 1997; Sutton et al., 2001; Kim et al., 2006; Jain et al., 2007; Dahan et al., 2009). The segment of intestine used was the jejunum, which was selected considering a distance of **25–60 cm** from pyloric sphincter (Legen and Kristl, 2003).

2.4. *Ex vivo* tissue diffusion

After decapitation, the intestinal segments (jejunum) were quickly removed and placed in ice-cold **Ringer–Krebs** solution at pH 6.8 for **20 min**, following the study conducted by Legen and Kristl (2003). The jejunal segments were opened and carefully placed on the Franz-type diffusion cells previously filled with **Ringer–Krebs** solution free of drug at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in acceptor chamber with a volume of 7 mL, under constant oxygenation with a mixture of O_2 and CO_2 (95:5) (Hidalgo et al., 1993; Hillgren et al., 1995; Legen and Kristl, 2003; Legen et al., 2005; Zakelj et al., 2006). The exposed apparent surface area was 0.20 cm^2 .

To verify the tissue viability, measurement of transepithelial electrical resistance (TEER) was performed using Millicel[®]-ERS (Millipore Corporation, USA) and the integrity of the tissue was evaluated using the markers metoprolol (high permeability) and fluorescein (low permeability). Due to lack of a standardized TEER procedure for the Franz-cell assay, we adopted an acceptance range of **70–110 $\Omega\text{ cm}^2$** (assuming the flat-surface approximation) based on other works that used intestinal segments (Mineo et al., 2002; Menon and Barr, 2003; Thomas et al., 2006). Tissues out of this range were discarded. TEER was measured again at the end of the test and tissues presenting lower values than $30\text{ $\Omega\text{ cm}^2$ were discarded (Lennernäs et al., 1997; Li et al., 2006).$

Jejunum segment patches were positioned on Franz-type diffusion cells between donor and acceptor chambers. In the apical-to-basolateral (**A > B**) experiments, the apical (luminal) side faced the upper (donor) compartment. In the basolateral-to-apical (**B > A**) experiments, the luminal side faced the receptor compartment. The system was equilibrated at 37°C with 200 rpm magnetic stirring in the lower chamber. An amount of **5 mL** of solution containing lamivudine solubilized in **Ringer–Krebs** solution ($300\text{ $\mu\text{g mL}^{-1}$) was transferred to the donor chamber (apical side), while the **Ringer–Krebs** solution free of drug was added to the acceptor chamber (basolateral side), as described above.$

A mixture of O_2 and CO_2 (95:5%) was bubbled into the donor (upper) chamber, which promoted membrane oxygenation and contributed to the stirring in the donor solution. After the equilibrium time, samples (**1 mL**) were collected from the acceptor chamber at 15 min intervals (samples at 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 **min**). Fresh **Ringer–Krebs** solution at 37°C was added to maintain constant acceptor volume. The collected samples were frozen at -20°C until quantification by HPLC.

The apparent permeability (cm/s) was calculated from the equation:

$$P_{app} = \left(\frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{C_D(0)} \quad (3)$$

where $\Delta Q/\Delta t$ is the permeation rate ($\mu\text{mol/min}$), A is the surface area (cm^2) and $C_D(0)$ ($\mu\text{mol/cm}^3$) is the starting concentration of the tested drug. The apparent permeability represents the diffusion rate across membrane as a function of both surface area and drug concentration on the donor side (Zakelj et al., 2006; Dahan and Hoffman, 2007; Lennernäs, 2007; Dahan and Amidon, 2009; Uchida et al., 2008).

2.5. *In situ* SPIP

Rats were anesthetized with an intra-muscular injection of **ketamine–xilazine** mixture and placed on heated surface maintained at 37°C . A laparotomy was performed through a midline incision of **3–4 cm** to expose the small intestine and the segment, approximately 10 cm of proximal jejunum portion, was carefully cannulated on two ends. A pH 6.5 perfusion solution containing 48 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 28 mM Na_2HPO_4 , 43 mM NaH_2PO_4 , **35 mM** mannitol, **1 g/L** PEG-4000, 10 mM D-glucose (Jain et al., 2007) was pumped by a peristaltic pump (Minipuls-3, Gilson, France) through the intestine. A blank perfusion solution was pumped at a flow rate of 0.5 mL/min in order to clean out any residual debris. After this, the perfusion solution containing a known concentration of lamivudine was perfused through the intestinal lumen at a constant flow rate (0.2 mL/min) for **120 min**. The concentration of lamivudine used in the perfusion studies was determined by dividing the highest dose by 250 mL. This volume should be taken with the dose in order to represent the maximal drug concentration present in the intestine. Considering the highest dose as 300 mg, the lamivudine concentration was **1.2 mg/mL** (United States, 2011).

To reach steady state conditions, the perfusion was carried out for **1 h**. After that, samples were taken in **15 min** intervals for **2 h** (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, and 120 **min**).

All samples were assayed by HPLC and the chromatographic conditions were the same as described for the *ex vivo* experiment (item 2.3). At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the length of the segment was measured. The net water flux in the *in situ* perfusion studies (water absorption and efflux in the intestinal segment) was determined by gravimetric method (Sutton et al., 2001).

The effective permeability (P_{eff}) was calculated from the equation

$$P_{eff} = -\frac{Q_{in}}{A} \cdot \ln \frac{C_{out}}{C_{in}} \quad (4)$$

where Q_{in} = flux (mL/min) of the inlet perfusate, A = intestinal area available for absorption, C_{out} = outlet drug concentration, and C_{in} = inlet drug concentration.

2.6. Quantitative drug analysis

The samples from the *ex vivo* and *in situ* perfusion assays were analyzed by HPLC method previously validated following ICH protocol (2005). A Merck HPLC model LaChrom with UV detector was used. The detection wavelength was 270 nm. The mobile phase consisted of 7% ACN and 3% methanol in a 20 mM phosphate buffer (pH 4.5), and it was pumped at 0.7 mL/min through a 15 cm $\times$ 4.6 mm **C18** column at 35°C . The retention time for lamivudine was 4.9 min and the quantification limit employed was 10 ng/mL for the *ex vivo* studies and 10 $\mu\text{g/mL}$ for SPIP. (Kano et al., 2005). There was not sample preparation technique and the matrix effect in chromatograms was not observed in the wavelength applied and in the retention time of the drug studied, as showed in Fig. 1.

The chromatographic method was linear in the range of 10–1000 ng/mL for *ex vivo* studies and 10–200 µg/mL for *in situ* studies, as demonstrated in Fig. 2. Table 2 shows accuracy and precision of the method.

Statistical comparison of permeation parameters were performed with analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests ($p < 0.05$ was considered to be statistically significant).

2.7. Model used for predicting human jejunal permeability

The effective permeability of the human jejunum, P_{eff} , can be represented by:

$$\frac{1}{P_{\text{eff}}} = \frac{1}{k_{\text{VF}}} \cdot \left(\frac{1}{P_{\text{ABL}}} + \frac{1}{P_{\text{C}}^{6.5} + P_{\text{para}}} \right) \quad (5)$$

where the permeability terms (cm s^{-1}) are: P_{ABL} = aqueous boundary layer, P_{C} = transcellular, and P_{para} = paracellular. Traditionally, the ‘smooth-cylinder’ approximation is used to define the *in vivo* P_{eff} scale, where the true surface area is larger due to fold and villus structures of the small intestine. The villus-fold surface area expansion scale factor is k_{VF} . From histological studies, $k_{\text{VF}} \sim 30$ for humans and ~ 5 for rats (DeSesso and Williams, 2008). P_{C} represents the permeation of the epithelial cell barrier between the lumen and the blood; P_{para} is the paracellular permeability through water channels between cells; P_{ABL} is the effective ABL (Aqueous Boundary Layer) permeability under the ‘distended-cylinder’ condition in the SPIP assay, and is equal to $D_{\text{aq}}/h_{\text{ABL}}$, where D_{aq} is the aqueous diffusivity of the solute, which can be related to the molecular weight, and h_{ABL} is the thickness of the aqueous boundary layer, which depends on the perfusion flow rate (Avdeef, 2010). $P_{\text{C}}^{6.5}$ can be hypothetically assigned as the Caco-2 (or MDCK) cellular permeability at pH 6.5, with all cell-based ABL, filter, and paracellular contributions ‘removed’ from the P_{app} term used to define it. Alternatively, $P_{\text{C}}^{6.5}$ can be estimated from rat intestinal segment patch (Franz cell) measurement, after correcting the rat experimental P_{app} for P_{ABL} and P_{para} effects, or from PAMPA membrane permeability values, $P_{\text{m}}^{6.5}$ (when the expected predominant *in vivo* permeation mechanism is passive).

For the paracellular part in Eq. (5), Avdeef and Tam (2010) proposed the dual-pore population equation

$$P_{\text{para}} = \frac{\epsilon}{\delta} \cdot D_{\text{aq}} \cdot F(r_{\text{HYD}}/R) \cdot E(\Delta\phi) + \left(\frac{\epsilon}{\delta} \right)_2 \cdot D_{\text{aq}} \quad (6)$$

where ϵ/δ is the porosity of paracellular junction pores divided by the rate-limiting paracellular pathlength (high-capacity, size-restricted, cation-selective) and $(\epsilon/\delta)_2$ is the secondary porosity-

pathlength ratio (low-capacity, size- and charge-independent). The $E(\Delta\phi)$ term is a function of the potential drop, $\Delta\phi$, across the electric field created by negatively-charged residues lining the junction pores. $F(r_{\text{HYD}}/R)$ is the Renkin hydrodynamic sieving function for cylindrical water channels, defined as a function of the molecular hydrodynamic radius (r_{HYD}) and junction pore radius (R), both usually expressed in Å units,

$$F(r_{\text{HYD}}/R) = (1 - r_{\text{HYD}}/R)^2 \cdot [1 - 2.104(r_{\text{HYD}}/R) + 2.09(r_{\text{HYD}}/R)^3 - 0.95(r_{\text{HYD}}/R)^5] \quad (7)$$

Values of r_{HYD} were estimated from the Sutherland-Stokes-Einstein spherical-particle equation (Avdeef, 2010):

$$r_{\text{HYD}} = \left(0.92 + \frac{21.8}{\text{MW}} \right) \cdot \frac{k_{\text{B}}T}{6\pi\eta D_{\text{aq}}} \cdot 10^{+8} \quad (8)$$

where k_{B} = Boltzmann constant, T = absolute temperature, and η = solvent kinematic viscosity ($0.00696 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 37°C).

2.8. Relationship between five permeability models

The predictions of human jejunal permeability, P_{eff} , were compared based on (a) PAMPA (this study), (b) Caco-2 (Souza et al., 2009), (c) MDCK-MDR1 (Souza et al., 2009), (d) rat *ex vivo* intestinal segment patches in apical-to-basolateral ($A > B$) and basolateral-to-apical ($B > A$) directions (this study) and (e) rat jejunum *in situ* SPIP (this study). Specifically, $P_{\text{C}}^{6.5}$ in Eq. (5) was estimated by one of the five above measured permeability values, and P_{eff} was calculated, as described by Avdeef and Tam (2010). The comparisons can have at least five outcomes (assuming MDCK generally has lower expression of transporters compared to Caco-2):

- Case 1: If the predominant transport mechanism were passive, then all the model predictions ideally would indicate the same value: $P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{rat jejunum}}$.
- Case 2: If efflux were to affect transport significantly and Caco-2 were to have efflux transporter expression level comparable to that found in the rat intestine, then $P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{rat jejunum}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}}$.
- Case 3: If carrier-mediated uptake were the dominant transport mechanism and Caco-2 were to have transporter expression level comparable to that found in the rat intestine, then $P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{rat jejunum}}$.
- Case 4: If carrier-mediated uptake were the dominant transport mechanism and Caco-2 had under-expression of transporter, compared to that found in the rat intestine, then $P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{rat jejunum}}$.

Our study was designed to identify one of the above transport mechanism case outcomes associated with lamivudine.

3. Results and discussion

Lamivudine is a hydrophilic compound with low molecular weight (229 g mol^{-1}) and is predominantly uncharged at $\text{pH} > 5$, narrowing the expected options for crossing the intestinal barrier by either carrier-mediated uptake transporters or via the paracellular route. Since PAMPA has neither paracellular channels nor transporters, one would expect PAMPA permeability to be low, compared to that of rat intestine segments. The published *in vitro* cellular permeability of lamivudine is low to moderate (Souza et al., 2009), and can be associated with paracellular and/or carrier-mediated transport route, but the level of transporter expression in the model cells may not match that found *in vivo*. By comparing the various permeability models, it may be possible to

Fig. 1. HPLC-UV chromatogram of lamivudine and didanosine (internal standard) in Ringer-Krebs solution.

Please cite this article in press as: Reis, J.M., et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. Eur. J. Pharm. Sci. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.025>

Fig. 2. Analytical curves of lamivudine in HPLC-UV chromatographic method for *ex vivo* studies (A) and *in situ* perfusion studies (B).

Table 2

Precision and accuracy of the HPLC detection method of lamivudine in *ex vivo* and SPIP models.

	Concentration		Precision (%)		Accuracy (%)	
			Intraday	Interday	Intraday	Interday
<i>ex vivo</i>	ng/mL	20	3.67	4.55	102.33	102.78
		500	0.92	3.89	95.70	99.36
		750	1.89	2.22	100.03	101.77
SPIP	μg/mL	25	1.85	2.58	101.10	99.90
		125	1.34	1.07	100.39	100.89
		150	0.74	1.95	101.47	100.76

Table 3

Lamivudine permeability, P_e , obtained by the methods PAMPA, rat perfusion *in situ* and Franz-Cell chamber with rat gastrointestinal *ex vivo* ($A > B$ and $B > A$). All values are expressed in 10^{-6} cm/s units. Standard Deviation (SD) values were calculated from five replicates.

Method	P_e (SD)		
	Lamivudine	Metoprolol	Negative control ^a
PAMPA	1.75 (0.32)	12.3 (2.0)	2.28 (0.11)
Rat intestine perfusion	6.16 (0.52)	10.6 (1.1)	0.01 (0.002)
<i>in situ</i>			
Rat intestine <i>ex vivo</i> ($A > B$)	90.1 (3.9)	147.9 (2.3)	8.51 (0.24)
Rat intestine <i>ex vivo</i> ($B > A$)	4.74 (0.38)	4.48 (0.24)	13.8 (1.5)

^a Negative controls for PAMPA in pH 7.4, rat perfusion *in situ* and rat intestine segment tests were ranitidine, fluorescein and fluorescein, respectively. $k_{eff} = 5$ for rats (DeSesso and Williams, 2008) were used to scale the apparent *ex vivo* and the effective *in situ* permeability.

reveal the transport mechanism (Alt et al., 2004; Masungi et al., 2008).

3.1. PAMPA analysis

The PAMPA permeability of lamivudine (Table 3) was determined to be $P_e^{6.5} = 1.78 (\pm 0.21) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹. The negative marker, ranitidine, having a greater P_e (CHO-Lecithin model) than that of lamivudine ($P_e^{6.5} = 2.32 (\pm 0.17) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹), suggested that lamivudine was near the lower limit of detection in the PAMPA assay. Similar PAMPA results have been published for ranitidine (Zhu, 2002; Chen et al., 2007; Verma et al., 2007). The high-permeability marker, metoprolol (CHO-Lecithin model) ($P_e^{6.5} = 12.3 (\pm 2.0) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹), appears to be limited by the aqueous boundary layer and thus its permeability results are quite variable in the literature, as expected (Karlsson and Artursson, 1991; Sugano et al., 2002, 2004; Zhu et al., 2002; Avdeef et al., 2005; Balimane et al., 2005; Flaten et al., 2006; Fujikawa et al., 2007; Reis et al., 2010).

The permeability vs. pH curve is shown in Fig. 4. Curiously, the results somehow deviated from what it would be expected by the pH partition theory. There are two possible explanations for the results obtained: (1) the permeability at pH 3.0 must have been higher than expected due to a possibly leaky membrane. Transient aqueous pores that occur widely in artificial lipid membranes, but not in real biological membranes, have been described in the literature (Li et al., 2012); (2) the permeability at pH values from 4.5 to 9.0 may have been lower than predicted by the pH partition theory. This last hypothesis can be grounded on the basis of an excess amount of solvent (dodecane) in the solution-based artificial membrane, which may present an extra barrier for the permeating 3TC. Also, the excess amount of solvent possibly acted like a trap for 3TC (Chen et al., 2007). Nevertheless, these hypotheses will be further explored in future works.

3.2. Analysis of Caco-2/MDCK data from literature

The Souza et al. (2009) study of lamivudine used the MDCK transfected with human MDR1 (P-gp) and Caco-2 cell lines, in both cases, with and without the P-gp inhibitor GF120918 (0.5 μM). The average efflux ratio dropped from 2.5 to 2.3 as a result of the inhibitor, which could be indicative of a non-P-gp (e.g., MRP or BCRP) mild efflux specificity with lamivudine. However, lamivudine apical-to-basolateral ($A > B$) permeability was 17 times lower in the MDCK-MDR1 system, compared the Caco-2 systems (0.06×10^{-6} cm s⁻¹ vs. 1.0×10^{-6} cm s⁻¹, respectively). This could be suggestive of a lamivudine uptake transporter present in the Caco-2 system at a higher level of expression, compared to the MDCK-MDR1 system.

The parameters used to model paracellular transport in the Souza et al. study were based on the Garberg et al. (2005) Caco-2 data analysis: $\epsilon/\delta = 1.11$ cm⁻¹, $R = 11.1$ Å, $\Delta\phi = -43$ mV (Avdeef, 2010). With these parameters as input into the pCEL-X program (*in-ADME* Research: <http://www.in-ADME.com/pCEL-X.html>), the paracellular permeability of lamivudine in the Caco-2 data of Souza et al. was predicted to be 1.3×10^{-6} cm s⁻¹ (Eq. (6)). With this as a fixed parameter, the apparent intrinsic transcellular permeability was refined to be $0.53 (\pm 0.40) \times 10^{-6}$ cm s⁻¹ (which might be a sum of uptake and passive terms).

Similarly, from the Garberg et al. MDCK (NCI) data, the paracellular parameters were estimated to be: $\epsilon/\delta = 0.74$ cm⁻¹, $R = 10.7$ Å, $\Delta\phi = -43$ mV (Avdeef, 2010). With these parameters as input into pCEL-X, the paracellular permeability of lamivudine in the MDCK-MDR1 data of Souza et al. was predicted to be 0.82×10^{-6} cm s⁻¹ (Eq. (6)). However, the actual P_{app} is lower than that value. So, the Souza et al. MDCK-MDR1 cells have tighter junctions than predicted from the Garberg et al. study. It was thus possible to determine the paracellular permeability directly from the Souza data, provided that the transcellular permeability is set to 0.04×10^{-6}

Fig. 3. Permeability results comparison between PAMPA, Franz-Cell chamber with rat jejunum segment patches (*ex vivo*) and rat jejunum *in situ* perfusion. All values were standardized in logarithmic scale and are represented in $\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ units. Negative controls for PAMPA, *ex vivo* and *in situ* were ranitidine, fluorescein and fluorescein, respectively.

cm s^{-1} , the lowest P_{app} value reported by Souza. With this latter value as a fixed parameter, the paracellular permeability was refined to be $0.09 (\pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. The refined P_{para} is consistent with a reduced $R = 6.2 \text{ \AA}$. So, in the Souza study, MDCK-MDR1 cells apparently form considerably tighter junctions than those of Caco-2 cells.

If the MDCK-MDR1 transcellular permeability is an accurate estimation of the passive transcellular permeability, a re-analysis of the Caco-2 P_{app} with transcellular permeability fixed at $0.04 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (rather than the apparent $0.53 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), made it possible to refine the P_{app} data and to determine the Caco-2 uptake permeability of $0.49 (\pm 0.41) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (for $5 \mu\text{M}$ lamivudine).

3.3. Rat intestinal segment *ex vivo* (Franz-cell) analysis

Although widely used for skin permeation studies, this is the first attempt to consider the Franz cells method for intestinal permeability studies using rat jejunum patches. Franz cells is described in United States Pharmacopeia and its apparatus allows the experiment to be carried under stirring conditions. The magnetic stirring is capable of reducing the unstirred water layer, when applicable. Even though the results for 3TC diverge from other methods, recent studies with different drugs have demonstrated a good correlation between *ex vivo* and *in situ* perfusion models (Chimalakonda et al., 2007).

If the estimated $k_{VF} = 5$ for rats (DeSesso and Williams, 2008) were used to scale the apparent *ex vivo* permeability, 'flat-surface' $P_{appA \rightarrow B}$ value for lamivudine would be $90 (\pm 4) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, and for metoprolol and fluorescein would be $148 (\pm 2) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and $8.5 (\pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectively. The reliability of the Franz-cell patches was confirmed by the results from positive and negative controls (Table 3). Furthermore, TEER values remained within the range adopted before and after the tests, ensuring consistency of data obtained. In this study, the measured TEER was 83, 87 and $90 \Omega \text{ cm}^2$ before the experiment and 57, 53 and $51 \Omega \text{ cm}^2$ at the end of the experiment for fluorescein, metoprolol and lamivudine, respectively. This can be observed through the permeated amount of lamivudine and the control substances, which was constant through the time of study. Thus, there was no saturation of the intestinal membrane and the viability was

successfully controlled during the test. Fig. 3 summarizes the permeability results for lamivudine, the positive and negative controls compared by PAMPA, rat *ex vivo* and *in situ*.

To determine $P_C^{ex vivo A \rightarrow B}$, it was assumed that $P_{para} = 8.5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (fluorescein). P_{ABL} was calculated by pCEL-X (assuming 200 rpm stirring rate) to be $282 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. With these two permeability values entered as fixed contributions, $P_C^{ex vivo A \rightarrow B}$ of lamivudine was refined to be $137 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Similar analysis for the metoprolol control yielded $P_C^{ex vivo A \rightarrow B} = 155 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. According to the pCEL-X analysis of the *ex vivo* data, at pH 6.5, the factors controlling the transport of lamivudine included: 62% transcellular, 4% paracellular, and 34% aqueous boundary layer. For metoprolol, the values were 57% transcellular, 5% paracellular, and 38% aqueous boundary layer.

Regarding the basolateral-to-apical experiment, the scaled apparent *ex vivo* permeability, $P_{appB \rightarrow A}$ value for lamivudine, meto-

Fig. 4. Permeability ($\log P_e$) profile in PAMPA vs. pH for lamivudine. The solid curves refer to the effective ("measured") permeability, $\log P_e$. The dashed curves refer to the membrane ("pH partition") permeability, $\log P_m$. The highest possible $\log P_m$ value is the intrinsic permeability, $\log P_0$. The dash-dot-dot lines correspond to the paramembrane permeability ("water leakage"), $\log P_{para}$. The dotted lines correspond to the aqueous boundary layer permeability, $\log P_{ABL}$.

Fig. 5. Comparison between apical-to-basolateral ($A > B$) and basolateral-to-apical ($B > A$) permeability for metoprolol, lamivudine and fluorescein (negative control) using Franz-Cell chamber with rat jejunum segment patches (*ex vivo*). All values were standardized in logarithmic scale and are represented in $\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ units.

prol and fluorescein was $4.7 (\pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, $4.5 (\pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and $13.8 (\pm 1.5) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectively. These results show negligible efflux effect on the permeability of both metoprolol and lamivudine. On the other hand, efflux transporters showed to significantly affect fluorescein permeability, confirming previous data from the literature (Prosperi et al., 1985; Saengkhue et al., 2003; Berginc et al., 2007). A comparison between the $A > B$ and $B > A$ pathways for lamivudine, metoprolol and fluorescein is shown in the Fig. 5.

3.4. Rat *in situ* SPIP studies

Still considering a $k_{VF} = 5$ for rats, the effective permeability, $P_{\text{eff}}^{\text{in situ}}$, for lamivudine, metoprolol and fluorescein was $6.2 (\pm 0.5)$, $10.6 (\pm 1.1)$ and $0.01 (\pm 0.002) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectively. This indicates a relatively high permeability for lamivudine. This method presented similar results for metoprolol as those from PAMPA, suggesting the passive transcellular as its dominant transport pathway. Also, it supports the hypothesis of a good correlation between both techniques, which was previously described in the literature (Bermejo et al., 2004; Avdeef et al., 2007).

Curiously, the *ex vivo* values were considerably higher than those from *in situ* perfusion, even if considering that both methods apply animal jejunum tissue and thus may present similar level of uptake and efflux transporters expression. These observed permeability differences between the *ex vivo* and *in situ* perfusion methods can be explained. Franz cells apparatus, as a vertical chamber system, naturally allows the influence of driving forces on permeability rate, leading it to higher values than those from *in situ* perfusion. Additionally, bubbling of gases (O_2 95%; CO_2 5%) on donor chamber, in order to keep the cell viability, and magnetic stirring on acceptor chamber, improved solution homogeneity in both compartments.

3.5. Prediction of human jejunal permeability

The human jejunal paracellular and aqueous boundary layer parameters (Eqs. (6)–(8)) were taken from Avdeef and Tam (2010): $\varepsilon/\delta = 0.53 \text{ cm}^{-1}$, $(\varepsilon/\delta)_2 = 0.027 \text{ cm}^{-1}$, $R = 11.2 \text{ \AA}$, $\Delta\phi = -30.6 \text{ mV}$, and $h_{\text{ABL}} = 4675 \text{ \AA}$ (Loc-I-Gut human jejunum assay). (The human intestine is less leaky than the *ex vivo* rat assay indicates. However, due to the efficient *ex vivo* stirring, $h_{\text{ABL}} = 300 \text{ \AA}$ in Franz-cell data.) For lamivudine, the above parameters produce $P_{\text{para}} = 0.89 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and $P_{\text{ABL}} = 18 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Since lamivudine is uncharged at pH 7.4, $E(\Delta\phi) = 1$ term in Eq. (6).

Table 4

Effective permeability, P_{eff} , and factors controlling lamivudine permeability calculated for PAMPA, Caco-2, MDCK, *ex vivo* and SPIP techniques. All values were calculated by pCEL-X™ software.

Assay	$P_{\text{eff}} (\times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1})$	Factors (%)		
		Transcellular	Paracellular	ABL
PAMPA	0.35	18	76	6
Caco-2	0.44	34	58	7
MDCK	0.30	4	91	5
<i>ex vivo</i>	5.40	12	0	88
SPIP	1.70	63	9	28

Using the PAMPA, MDCK-MDR1, Caco-2, *ex vivo*, and SPIP $P_{\text{C}}^{6.5}$ (1.94, 0.04, 0.53, 155, and 6.2, in units of $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectively) along with the above P_{para} and P_{ABL} , the ‘smooth-cylinder’ effective human jejunal permeability at pH 6.5, according to Eq. (5) with k_{VF} taken as 33.5 (Avdeef and Tam, 2010), the pCEL-X calculated $P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}} = 0.82 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (59% transcellular, 27% paracellular, 13% ABL), $P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}} = 0.30 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (4% transcellular, 91% paracellular, 5% ABL), $P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} = 0.44 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (34% transcellular, 58% paracellular, 7% ABL), $P_{\text{eff}}^{\text{ex vivo}} = 5.4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (12% transcellular, 0% paracellular, 88% ABL), and $P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} = 1.7 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (63% transcellular, 9% paracellular, 28% ABL). These values are resumed in the Table 4.

The *ex vivo* analysis seems to suggest that the predicted human jejunal permeability of lamivudine is largely ABL-limited (88%). If the permeability of lamivudine were entirely passive transcellular, the predicted P_{eff} would have a value close to that of atenolol (Lindahl et al., 1996), with paracellular as the dominant mechanism (76–91%). The P_{eff} predicted from Caco-2, being comparable to PAMPA value but considerably below the rat *ex vivo* value, may suggest that a lower level of expression of an uptake transporter is associated with Caco-2, compared to the *ex vivo* system. Alternatively, an over-expression of efflux transporter (e.g., BCRP) in this cell-based method can account for the discrepancy in the permeability result (Maubon et al., 2007).

4. Conclusion

Lamivudine is a hydrophilic drug with low molecular weight, which shows high permeability in *ex vivo* rat jejunum segments (Franz cell) and very low passive permeability in MDCK-MDR1 cells and PAMPA. Human jejunal permeability was predicted using five estimates of transcellular permeability (PAMPA, Caco-2/MDCK, *ex vivo* Franz, SPIP). The results show the following permeability profile for lamivudine: $P_{\text{eff}}^{\text{ex vivo A>B}} > P_{\text{eff}}^{\text{SPIP}} > P_{\text{eff}}^{\text{ex vivo B>A}} > P_{\text{eff}}^{\text{Caco-2}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{MDCK}} \approx P_{\text{eff}}^{\text{PAMPA}}$. Thus, the outcome of our analysis is most consistent with Case 4 in Section 2.7.

Hence, the study strongly suggests that lamivudine is primarily transported via carrier-mediated mechanism, besides from having a mild paracellular contribution and being significantly ABL limited *in vivo*. Moreover, it is suggested that Caco-2 cells may under-predict some uptake or over-predict some efflux transporters needed for lamivudine to cross intestine barrier.

Nevertheless, as the *ex vivo* assay using intestine patches in Franz cell devices were published for the first time in this study, further investigations need to be carried out, including the work extension of rat intestine *ex vivo* experiments, in order to understand the high results reported.

5. Uncited references

ChEMBL: European Bioinformatics Institute (2012), Fagerholm et al. (1996), Helms et al. (2010), Schanker et al. (1958), Zakelj et al. (2004).

Acknowledgements

We thank the financial support provided by FAPESP, CAPES and CNPq (São Paulo, Brazil).

References

- Abraham, M.H., Zhao, Y.H., Le, J., Hersey, A., Luscombe, C.N., Reynolds, D.P., Beck, G., Sherborne, B., Cooper, L., 2002. On the mechanism of human intestinal absorption. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 595–605.
- Alt, A., Potthast, H., Moessinger, J., Sickmüller, B., Oeser, H., 2004. Biopharmaceutical characterization of sotalol-containing oral immediate release drug products. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 145–150.
- Avdeef, A., 2003. Absorption and Drug Development. Wiley-Interscience, Hoboken.
- Avdeef, A., 2010. Leakiness and size exclusion of paracellular channels in cultured epithelial cell monolayers – interlaboratory comparison. *Pharm. Res.* 27, 480–489.
- Avdeef, A., Tam, K.Y., 2010. How well can the Caco-2/Madin-Darby Canine Kidney models predict effective human jejunal permeability? *J. Med. Chem.* 53, 3566–3584.
- Avdeef, A., Artursson, P., Neuhoof, S., Lazarova, L., Gräsö, J., Tavelin, S., 2005. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pK_{flux} method. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 333–349.
- Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Faller, B., Kansy, M., Sugano, K., Yamauchi, Y., 2007. PAMPA – Critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.* 96, 2893–2909.
- Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A., 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 301–312.
- Balimane, P.V., Pace, E., Chong, S., Zhu, M., Jemal, M., Pelt, C.K.V., 2005. A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for PAMPA sample analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 8–16.
- Bermejo, M., Avdeef, A., Ruiz, A., Nalda, R., Ruell, J.A., Tsintman, O., González, L., Fernández, C., Sánchez, G., Garrigues, T.M., Merino, V., 2004. PAMPA – a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluorquinolones. *J. Pharm. Sci.* 21, 429–441.
- Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Beijsterveldt, L.V., Anciaux, K., Verboven, P., Meuldermans, W., Lavrijen, K., 2001. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 367–383.
- Buckley, S.T., Fischer, S.M., Fricker, G., Brandl, M., 2012. *In vitro* models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 235–250.
- Cao, X., Yu, L.X., Sun, D., 2008. Drug absorptions principles. In: Krishna, R., Yu, L. (Eds.), *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Springer, New York, pp. 75–100.
- Chan, L.M.S., Lowes, S., Hirst, B.H., 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 25–51.
- ChEMBL: European Bioinformatics Institute. Compound Report Card for Lamivudine. <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/index.php/compound/inspect/CHEMBL141>> (14.05.2012).
- Chimalakonda, K.C., Agarwal, H.K., Kumar, A., Parang, K., Mehvar, R., 2007. Synthesis, analysis, *in vitro* characterization, and *in vivo* disposition of a lamivudine–dextran conjugate for selective antiviral delivery to the liver. *Bioconjug. Chem.* 18, 2097–2108.
- Cook, T.J., Shenoy, S.S., 2003. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology* 184, 125–133.
- Dahan, A., Amidon, G.L., 2009. Segmental dependent transport of low permeability compounds along the small intestine due to P-glycoprotein: the role of efflux transport in the oral absorption of BCS class III drugs. *Mol. Pharm.* 6, 19–28.
- Dahan, A., Hoffman, A., 2007. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: the ability of *in vitro* lipolysis and consecutive *ex vivo* intestinal permeability data to predict *in vivo* bioavailability in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 96–105.
- Dahan, A., West, B.T., Amidon, G.L., 2009. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPIP) approach in the rat. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 320–329.
- DeSesso, J.M., Williams, A.L., 2008. Contrasting the gastrointestinal tracts of mammals: factors that influence absorption. *Ann. Rep. Med. Chem.* 43, 353–371.
- Dobson, P.D., Kell, D.B., Paul, D., 2008. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 205–220.
- Fagerholm, U., Johansson, M., Lennernäs, H., 1996. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm. Res.* 13, 1336–1342.
- Flaten, G.E., Dhanikula, A.B., Luthman, K., Brandl, M., 2006. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 80–90.
- Fujikawa, M., Ano, R., Nakao, K., Shimizu, R., Akamatsu, M., 2005. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 4721–4732.
- Fujikawa, M., Nakao, K., Shimizu, R., Akamatsu, M., 2007. QSAR study on permeability of hydrophobic compounds with artificial membranes. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3756–3767.
- Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R.D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J.E., Raub, T.J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.-O., Osterbergh, T., 2005. *In vitro* models for the blood–brain barrier. *Toxicol. In Vitro* 19, 299–334.
- Giacomini, M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236.
- Helms, H.C., Waagepetersen, H.S., Nielsen, C.U., Brodin, B., 2010. Paracellular tightness and claudin-5 expression is increased in the BCEC/astrocyte blood–brain barrier model by increasing media buffer capacity during growth. *AAPS J.* 12, 759–770.
- Heraia, H., Gratieria, T., Thomazineb, J.A., Bentleya, M.V., Lopez, R.F.V., 2007. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *Int. J. Pharm.* 329, 88–93.
- Hidalgo, I.J., Ryan, F.M., Marks, G.J., Smith, P.L., 1993. pH-dependent transepithelial transport of cephalixin in rabbit intestinal mucosa. *Int. J. Pharm.* 98, 83–92.
- Hillgren, K.M., Kato, A., Borchardt, R.T., 1995. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Med. Res. Rev.* 15, 83–109.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. Validation of analytical procedures: text and methodology: Q2(R1). S.I.: ICH, 2005. 17p. <http://www.ich.org/fileadmin/Public/Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2011.
- Jain, R., Duvvuri, S., Kansara, V., Mandava, N.K., Mitra, A.K., 2007. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *Int. J. Pharm.* 336, 233–240.
- Kano, E.K., Serra, C.H.R., Koono, E.E., Andrade, S.S., Porta, V., 2005. Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies. *Int. J. Pharm.* 297, 73–79.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 41, 1007–1010.
- Karlsson, J., Artursson, P., 1991. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *Int. J. Pharm.* 71, 55–64.
- Kim, W.Y., Benet, L.Z., 2004. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression *in vitro*. *Pharm. Res.* 21, 1284–1293.
- Kim, J.S., Mitchell, S., Kijek, P., Tsume, Y., Hilfinger, J., Amidon, G.L., 2006. The suitability of an *in situ* perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Mol. Pharm.* 3, 686–694.
- Komiyai, I., Park, J.Y., Kamani, A., Ho, N.F.H., Higuchi, W.I., 1980. Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes. *Int. J. Pharm.* 4, 249–262.
- Kuo, Y.C., Chen, H.H., 2006. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate–sulfolipidylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the *in vitro* blood–brain barrier. *Int. J. Pharm.* 327, 160–169.
- Langguth, P., Kubis, A., Krumbiegel, G., 1997. Intestinal absorption of the quaternary trospium chloride: permeability-lowering factors and bioavailabilities for oral dosage forms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 265–272.
- Legen, I., Kristl, A., 2003. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 87–94.
- Legen, I., Salobir, M., Kerc, J., 2005. Comparison of different intestinal epithelia as models for absorption enhancement studies. *Int. J. Pharm.* 291, 183–188.
- Lennernäs, H., 2007. Animal data: the contributions of the Ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1103–1120.
- Lennernäs, H., Nylander, S., Ungell, A.L., 1997. Jejunal permeability: a comparison between the Ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans. *Pharm. Res.* 14, 667–671.
- Li, X., Chan, W.K., 1999. Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 39, 81–103.
- Li, F., Hong, L., Mau, C.I., Chan, R., Hendricks, T., Dvorak, C., Yee, C., Harris, J., Alfredson, T., 2006. Transport of levovirin prodrugs in the human intestinal Caco-2 cell line. *J. Pharm. Sci.* 95, 1318–1325.
- Li, C., Nair, N., Liu, T., Li, F., Pichardo, J., Agrawal, S., Chase, R., Tong, X., Uss, A.S., Bogen, S., Njoroge, G., Morrison, R.A., Cheng, K.C., 2008. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1186–1197.
- Lindahl, A., Sandström, R., Ungell, A.-L., Abrahamsson, B., Knutson, T.W., Knutson, L., Lennernäs, H., 1996. Jejunal permeability and hepatic extraction of fluvastatin in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60, 493–503.
- Lindenberg, M., Kopp, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 265–278.
- Lopez, R.F.V., Collett, J.H., Bentley, M.V.L.B., 2000. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. *Int. J. Pharm.* 200, 127–132.

Please cite this article in press as: Reis, J.M., et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, *ex vivo* and *in situ* Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.025>

- Masungi, C., Mensch, J., Dijck, A.V., Borremans, C., Willems, B., Mackie, C., Noppe, M., Brewster, M.E., 2008. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie* 63, 194–199.
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O., 2007. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real time PCR. *Fund. Clin. Pharmacol.* 21, 659–663.
- Menon, R.M., Barr, W.H., 2003. Comparison of cefibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified Ussing chambers. *Biopharm. Drug Dispos.* 24, 299–308.
- Millipore, PC1545EN00 – Membrane Integrity test for Lipid-PAMPA Artificial Membranes 2005. <[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/\\$FILE/PC1545EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/$FILE/PC1545EN00.pdf)>. (6.11.2011).
- Minoo, H., Hara, H., Shigematsu, N., Okuhara, Y., Tomita, F., 2002. Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions *in vitro*. *J. Nutr.* 132, 3394–3399.
- Minuesa, G., Volk, C., Molina-Arcas, M., Gorboulev, V., Erkizia, I., Arndt, P., Clotet, B., Pastor-Anglada, M., Koelsell, H., Martinez-Picado, J., Transport of Lamivudine [(-)-β-L-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine] and High-Affinity Interaction of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Human Organic Cation Transporters 1, 2 and 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 252–261.
- Nicolazzo, J.A., Finnin, B.C., 2008. *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. In: Ehrhardt, C., Kim, K.-J. (Eds.), *Drug Absorption Studies: in situ, in vivo and in silico Models*. Springer, New York, pp. 89–111.
- Nielsen, P., Avdeef, A., 2004. PAMPA – a drug absorption *in vitro* model. 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 33–41.
- Nirasa, S., Mouget, Y., Marcotte, L., Claverie, J.P., 2011. Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model PAMPA membranes. *Int. J. Pharm.* 421, 170–175.
- Oulianova, N., Cheng, D., Huebert, N., Chen, Y., 2007. Human oral drugs absorption is correlated to their *in vitro* uptake by brush border membrane vesicles. *Int. J. Pharm.* 336, 115–121.
- Pal, D., Kwatra, D., Minocha, M., Paturi, D.K., Budda, B., Mitra, A.K., 2010. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci.* 88, 959–971.
- Pereira, B.G., Vianna-Soares, C.D., Righi, A., Pinheiro, M.V., Flores, M.Z., Bezerra, E.M., Freire, V.N., Lemos, V., Caetano, E.W., Cavada, B.S., 2007. Identification of lamivudine conformers by Raman scattering measurements and quantum chemical calculations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1885–1889.
- Pretorius, E., Bouic, P.J.D., 2009. Permeation of four oral drugs through human intestinal mucosa. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 10, 270–275.
- Prosperi, E., Croce, A.C., Bottiroli, G., Supino, R., 1985. Influence of daunorubicin on membrane permeability properties: detection by means of intracellular accumulation and efflux of fluorescein. *Chem. Biol. Int.* 54, 271–280.
- Quevedo, A.M., Nieto, L.E., Briñon, M.C., 2011. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. *Eur. J. Pharm. Sci.* doi: 10.1016/j.ejps.2011.04.007. (14.08.2011).
- Rajpal, S., Mittal, G., Sachdeva, R., Chhillar, M., Ali, R., Agrawal, S.S., Kashyap, R., Bhatnagar, A., 2009. Development of atropine sulphate nasal drops and its pharmacokinetic and safety evaluation in healthy human volunteers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 206–211.
- Reis, J.M., Sinkó, B., Serra, C.H.R., 2010. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) – is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? *Mini. Rev. Med. Chem.* 10, 1071–1076.
- Ropke, C.D., Kaneko, T.M., Rodrigues, R.M., Silva, V.V., Barros, S., Sawada, T.C.H., Kato, M.J., Barros, S.B.M., 2002. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulation. *Int. J. Pharm.* 249, 109–116.
- Saengkhae, C., Loetchutin, C., Garnier-Suillerot, A., 2003. Kinetic analysis of fluorescein and dihydrofluorescein effluxes in tumour cells expressing the multidrug resistance protein, MRP1. *Bio. Pharm.* 65, 969–977.
- Schanker, L.S., Tocco, D.J., Brodie, B.B., Hogben, C.A.M., 1958. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 123, 81–88.
- Shugarts, S., Benet, L.Z., 2009. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm. Res.* 26, 2039–2054.
- Souza, J., Benet, L.Z., Huang, Y., Storpirtis, S., 2009. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 98, 4413–4419.
- Strauch, S., Jantravid, E., Dressman, J.B., Junginger, H.E., Kopp, S., Midha, K.K., Shah, V.P., Stavchansky, S., Barends, D.M., 2011. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: lamivudine. *J. Pharm. Sci.* 100, 2054–2063.
- Sugano, K., Takata, N., Machida, M., Saitoh, K., Terada, K., 2002. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int. J. Pharm.* 241, 241–251.
- Sugano, K., Nabuchi, Y., Machida, M., Asoh, Y., 2004. Permeation characteristics of a hydrophilic basic compound across a bio-mimetic artificial membrane. *Int. J. Pharm.* 275, 271–278.
- Sutton, S.C., Rinaldi, M.T.S., Vukovinsky, K.E., 2001. Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model. *AAPS Pharm. Sci.* 3, 1–5.
- Takano, M., Yumoto, R., Murakami, T., 2006. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol. Ther.* 109, 137–161.
- Thomas, K.E., Sapone, A., Fasano, A., Vogel, S.N., 2006. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are myD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J. Immunol.* 176, 2512–2521.
- Trapani, G., Franco, M., Trapani, A., Lopodota, A., Latrofa, A., Gallucci, E., Micelli, S., Liso, G., 2004. Frog intestinal sac: a new *in vitro* method for the assessment of intestinal permeability. *J. Pharm. Sci.* 93, 2909–2919.
- Tukker, J.J., 2000. *In vitro* methods for the assessment of permeability. In: Dressman, J.B., Lennernas, H. (Eds.), *Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment*. Marcel Dekker, New York, pp. 51–72.
- Uchida, M., Fukazawa, T., Yamazaki, Y., Hashimoto, H., Miyamoto, Y., 2008. A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay. *J. Pharm. Toxicol. Methods* 59, 39–43.
- UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Drugs @ FDA: FDA approved drug products. <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>>. (14.03.2011).
- Varatharajan, L., Thomas, S.A., 2009. The transport of anti-HIV drugs across blood–CNS interfaces: Summary of current knowledge and recommendations for further research. *Antiv. Res.* 82, A99–A109.
- Verma, R.P., Hansch, C., Selassie, C.D., 2007. Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21, 3–22.
- Volpe, D.A., 2010. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 12, 670–678.
- Wada, S., Tsuda, M., Sekine, T., Cha, S.H., Kimura, M., Kanai, Y., Endou, H., Rat multispecific organic anion transporter 1 (rOAT1) transports zidovudine, acyclovir, and other antiviral nucleoside analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 844–849.
- Zakelj, S., Legen, I., Veber, M., Kristl, A., 2004. The influence of buffer composition on tissue integrity during permeability experiments *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 272, 173–180.
- Zakelj, S., Sturm, K., Kristl, A., 2006. Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 313, 175–180.
- Zhu, V., Jiang, L., Chen, T.M., Hwang, K.K., 2002. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 399–407.